



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE AISLADOS DE *Fusarium spp.* PROVENIENTES DE VAINILLAS DEL TONACAPAN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOQUÍMICO

P R E S E N T A

CRISTIAN JOSUÉ SÁNCHEZ GUZMÁN

ASESOR INTERNO: M.C. OSWALDO CASTOR
ORTIZ ZAMORA

ASESOR EXTERNO: DR. RICARDO SANTILLÁN
MENDOZA

MISANTLA, VERACRUZ

AGOSTO, 2022



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

FECHA: 30 de Agosto de 2022.

ASUNTO: **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE TESIS PROFESIONAL.**

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hago constar que el (la) C:

CRISTIAN JOSUÉ SÁNCHEZ GUZMÁN

pasante de la carrera de INGENIERÍA BIOQUÍMICA con No. de Control 172T0039 ha cumplido satisfactoriamente con lo estipulado por el **Manual de Procedimientos para la Obtención del Título Profesional de Licenciatura** bajo la opción **Titulación Integral (Tesis Profesional)**

Por tal motivo se **Autoriza** la impresión del **Tema** titulado:

“GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE AISLADOS DE FUSARIUM SPP. PROVENIENTES DE VAINILLAS DEL TONACAPAN”

Dándose un plazo no mayor de un mes de la expedición de la presente a la solicitud del Acto de Recepción para la obtención del Título Profesional.

ATENTAMENTE


MII. GRACIELA GUADALUPE AGUILERA ÁLVAREZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



Archivo.

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo de investigación a mi madre, Angélica Guzmán Alonso, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi formación, por creer en mí y sobre todo por impulsarme a siempre seguir mis sueños y a mi padre Cristino Sánchez Hernández, por el apoyo que me brindó para concluir mi formación.

Agradecimientos

Al Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico por el financiamiento recibido para la realización del proyecto 15 1755/2021 “Diseño y validación de marcadores moleculares para la detección del agente causal de la fusariosis en vainilla mediante genómica comparativa”.

Al Dr. Mauricio Luna Rodríguez, colaborador del proyecto 15 1755/2021, por la donación de algunos aislados de *Fusarium* de vainilla provenientes de la región del Totonacapan, investigador de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UV.

Al INIFAP Campo Experimental Ixtacuaco por permitirme trabajar en el Laboratorio Diagnóstico Fitosanitario para la realización del proyecto.

Al Dr. Ricardo Santillán Mendoza, por la confianza de permitirme ser parte de este proyecto de investigación.

Resumen

El problema principal al que se enfrentan los productores de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews) de la región del Totonacapan es a la pérdida de cosechas causada por el hongo “*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*”, patógeno causante de la “Fusariosis”, enfermedad cuya sintomatología es la presencia de pudrición negra y marchitamiento de raíces y tallos, que en casos severos puede conllevar a la muerte de las plantas. La relevancia del estudio del patógeno es crucial, debido a la presumible escasez de variabilidad genética de la vainilla, condición que vuelve a los cultivos igual de susceptibles a dicho patógeno, pues se estima que en el mundo la mayoría de los cultivos provienen de esquejes de la región del Totonacapan. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue la generación y caracterización morfológica y patogénica de una colección de aislados de *Fusarium* obtenidos de tejido vegetal de *V. planifolia* con síntomas de Fusariosis. Para ello, fue necesario llevar a cabo la colecta de muestras de vainilla con síntomas de pudrición y/o marchitamiento en la región del Totonacapan, Veracruz, mismas que fueron procesadas para el aislamiento de *Fusarium* spp. en el laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del C.E. Ixtacuaco, empleando medio de cultivo semiselectivo, posteriormente se realizó la purificación de los aislados mediante la técnica de punta de hifa; una vez purificados, se procedió a almacenar las cepas, las cuales se resguardaron en forma de discos de medio con micelio en microtubos conteniendo agua destilada estéril a una temperatura de 16 °C. En seguida, para la caracterización cultural y morfológica, una alícuota de 15 µl fue sembrada en medio SNA (Agar Spezieller Nährstoffarmer), donde se cultivó el micelio por 10 días y se realizaron observaciones de las características micro y macroscópicas cada 24 h a partir de las 72 h de crecimiento. Por último, la caracterización patogénica se realizó en hojas de vainilla en cámara húmeda, generando una incisión en las hojas e inoculando con discos de medio de cultivo con micelio, las observaciones se realizaron por 12 días cada 24 h. Como resultado se obtuvo una colección de 88 cepas de *Fusarium* de las cuales 65 se obtuvieron de 7 cultivos de *V. planifolia* distribuidos en la región del Totonacapan y 23 fueron donadas por la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, con los resultados de la caracterización cultural y morfológica se pudieron agrupar 45 cepas con características muy similares a *F. oxysporum*, sin embargo, no se puede afirmar con certeza que las muestras pertenezcan a

dicha especie, pues la pruebas de identificación empleando técnicas de biología molecular quedaron fuera del alcance del presente proyecto, pero es suficiente para afirmar que las cepas aisladas pertenecen al género *Fusarium*. Con la caracterización patogénica se logró obtener datos referentes a la virulencia de algunas cepas. Finalmente, al concluir el estudio se consiguió generar la colección de aislados de *Fusarium* spp. los resultados de la caracterización cultural y patogénica serán cruciales para estudios posteriores de genómica comparativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, actualmente la colección de aislados se encuentra resguardada en INIFAP C.E. Ixtacuaco, donde está disponible para posteriores investigaciones relacionadas con el estudio de la interacción *Fusarium*-vainilla.

Palabras clave: Fusariosis, *Vanilla planifolia*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, Caracterización cultural, morfológica y patogénica.

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivo general	5
1.3.1 Objetivos específicos.....	5
1.4 Hipótesis.....	5
1.6 Límites.....	5
Capítulo 2. Marco de referencia	6
2.1 Antecedentes	6
2.2 Marco Teórico	7
2.2.1 Vainilla	7
2.2.1.1 <i>Vanilla planifolia</i>	7
2.2.1.2 Distribución y Origen.....	8
2.2.1.3 Importancia.....	10
2.2.1.3.1 Industrial.....	10
2.2.1.3.2 Económica	10
2.2.1.3.3 Cultural	11
2.2.1.4 Producción	11
2.2.2 <i>Fusarium</i>	13
2.2.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	14
2.2.2.1.1 Características microscópicas.....	14
2.2.2.1.2 Mecanismo de infección.....	16
Capítulo 3. Metodología	17

Colecta de muestras de vainilla con pudrición.....	17
Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp. a partir de tejido vegetal de vainilla.....	18
Purificación de <i>Fusarium</i> spp. en medio selectivo.	19
Almacenamiento de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. (Mejores candidatos).	20
Caracterización cultural y morfológica.....	21
Almacenamiento de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. (Producto final).....	22
Caracterización patogénica.	22
Capítulo 4. Resultados	23
Caracterización morfológica	23
Colección de aislados	24
Pruebas de patogenicidad.....	25
Conclusiones y Recomendaciones.....	28
Conclusiones	28
Recomendaciones.....	29
Bibliografía	30
Anexos	38
Anexo I. Mapas de los sitios de colecta de vainillas con pudrición.....	38
Anexo II. Fichas técnicas.	45
Fungicida: Clorotalonil (Tetracloroisoflalonitrilo).....	45
Antibiótico (Estrepto LER Extra Forte)	46
Anexo III. Colección de aislados	47
Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp.	47
Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Cepas resistentes a Clorotalonil.....	53
Anexo IV. Preparación de medios de cultivo.....	58
Preparación de medio de cultivo: Agar Papa Dextrosa deshidratado (PDA).....	58

Preparación de medio de cultivo: Agar Peptona Clorotalonil (PCA).....	59
Preparación de medio de cultivo: Agar agua.....	61
Preparación de medio de cultivo: Agar SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar).	62

Índice de Figuras

Figura 1	Cuerpo, flor y fruto de la vainilla.....	8
Figura 2	Región del Totonacapan.....	9
Figura 3	Caracteres morfológicos de <i>F. oxysporum</i>	16
Figura 4	Muestra de vainilla con síntomas de pudrición y marchitamiento.....	17
Figura 5	Siembra de tejido vegetal de vainilla con pudrición.....	18
Figura 6	Micelio transferido de medio Agar Peptona con Clorotalonil a medio agar agua.....	19
Figura 7	Purificación del micelio transferido de medio Agar Agua a medio SNA con la técnica punta de hifa.....	20
Figura 8	Primeras cepas almacenadas.....	21
Figura 9	Estructuras fúngicas desarrolladas en medio PDA y SNA.....	23
Figura 10	Colección de aislados.....	25
Figura 11	Ubicación del sitio de colecta 1: Alto Lucero de Gutiérrez Barrios....	38
Figura 12	Ubicación del sitio de colecta 2: Tlapacoyan.....	39
Figura 13	Ubicación del sitio de colecta 3 y 4: San Rafael.....	40

Figura 14	Ubicación del sitio de colecta 5: Papantla.....	41
Figura 15	Ubicación del sitio de colecta 6 y 7: Tecolutla.....	42
Figura 16	Municipios de origen de muestras donadas por la Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas. Xalapa.....	43
Figura 17	Presentación y composición del fungicida Bravo 720.....	46
Figura 18	Presentación comercial del antibiótico Estrepto LER Extra Forte 4MUI.....	46

Índice de Gráficos

Gráfico 1	Producción de Vainilla a nivel mundial en el año 2020.....	12
Gráfico 2	Producción de Vainilla a nivel nacional en el año 2019.....	13

Índice de Tablas

Tabla 1	Rangos de virulencia. Parte 1.....	26
Tabla 2	Rangos de virulencia. Parte 2.....	27
Tabla 3	Clorotalonil: Generalidades.....	45
Tabla 4	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 1.....	47
Tabla 5	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 2.....	48

Tabla 6	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 3.....	49
Tabla 7	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 4.....	50
Tabla 8	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 5.....	51
Tabla 9	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 6.....	52
Tabla 10	Colección de aislados de <i>Fusarium</i> spp. Parte 7.....	53
Tabla 11	Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 1.....	53
Tabla 12	Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 2.....	54
Tabla 13	Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 3.....	55
Tabla 14	Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 4.....	56
Tabla 15	Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 5.....	57
Tabla 16	Reactivos para la Preparación de Medio Agar Papa Dextrosa (PDA).....	59
Tabla 17	Reactivos para la Preparación de Medio Agar Peptona Clorotalonil (PCA). Parte 1.....	60
Tabla 18	Reactivos para la Preparación de Medio Agar Peptona Clorotalonil (PCA). Parte 2.....	61
Tabla 19	Reactivos para la Preparación de Medio Agar Agua.....	62
Tabla 20	Reactivos para la Preparación de Medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). Parte 1.....	63
Tabla 21	Reactivos para la Preparación de Medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). Parte 2.....	64

Capítulo 1. Introducción

El género *Fusarium* se define como un grupo de hongos filamentosos, muchos de los cuales son considerados fitopatógenos, fue descrito por primera vez por Link en 1809 (Leslie y Summerell, 2006). Las especies de este género, especialmente aquellas que son fitopatógenas, tienen una gran importancia comercial debido a que son responsables de considerables pérdidas de cosechas anualmente, pues suelen afectar a un amplio número de especies de importancia agrícola (Nelson *et al.*, 1982). De acuerdo con Babadoost (2018) en su tabla “Especies de *Fusarium*, huéspedes y distribución geográfica”, dentro del género, las especies *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* destacan por ser las únicas que afectan a una amplia diversidad de plantas y por encontrarse presentes en casi todo el planeta, a diferencia de otras especies que se limitan a ciertas regiones geográficas y cultivos.

Además de encontrarse ampliamente distribuidos, *F. oxysporum* y *F. solani*, comparten características morfológicas y nichos ecológicos que las vuelven muy semejantes y difíciles de diferenciar (Leslie y Summerell, 2006), otra particularidad que comparten estas especies son los huéspedes, por ejemplo, la vainilla resulta encontrarse dentro del amplia gama de hospedantes de dichos patógenos, pues se ha reportado la presencia de los mismos en cultivos de las principales zonas productoras de vainilla del mundo, catalogando a *F. oxysporum* como el patógeno principal de la vainilla y a *F. solani* como el segundo patógeno asociado al cultivo (Koyyappurath *et al.*, 2016). En el laboratorio, a nivel macroscópico, pueden diferenciarse mediante su cultivo en placa en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) pues *F. oxysporum* suele presentar micelio abundante de color blanco con tonos purpura o lila pálidos mientras que *F. solani* se caracteriza por presentar micelio escaso de color blanco a crema, a nivel morfológico la característica determinante de *F. oxysporum* son las monofiálides cortas, caso contrario a su homóloga (Leslie y Summerell, 2006), por lo que en ocasiones se debe tomar en cuenta el tiempo de desarrollo del micelio para realizar un correcto análisis morfológico y no confundir dichas estructuras, monofiálides cortas con monofiálides en crecimiento.

En la región del Totonacapan, ubicada en la zona Golfo-Centro de México, se ha reportado a la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* como el agente causal de la Fusariosis en

vainilla (*Vanilla planifolia*) manifestándose como pudrición negra en tallos y raíces, causando la marchitez de las plantas (Adame-García *et al.*, 2015), trayendo como consecuencia la pérdida de plantíos y la reducción en la producción de las cosechas. El problema con *Fusarium* en la región del Totonacapan toma aún más relevancia debido a que como indican Lubinsky *et al.* (2008) a nivel mundial, la vainilla tiene sus orígenes en esta zona y el que ésta sea un cultivo de propagación clonal trae como consecuencia que exista poca variabilidad genética, por lo que a su vez la mayoría de los cultivos se vuelven igual de susceptibles a dicho patógeno. De este modo, surge la necesidad de generar una colección de aislados de *Fusarium* obtenidos a partir de tejido vegetal dañado de vainillas de la región del Totonacapan, pues esto serviría como punto de partida para la generación de conocimiento que ayude en la creación de propuestas más eficientes para el control y eliminación del hongo, mediante estrategias de genómica comparativa de aislados patogénicos y no patogénicos.

Tomando en cuenta lo anterior surgió el presente proyecto de investigación, teniendo como objetivo principal generar una colección de aislados de *Fusarium* obtenidos de vainillas de la región del Totonacapan, y como objetivos secundarios caracterizar morfológica y patogénicamente a las cepas aisladas. A fin de cumplir satisfactoriamente los objetivos del proyecto, este se desarrolló en el laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del INIFAP Campo Experimental Ixtacuaco, al mismo tiempo que se documentó en 4 capítulos; en el primero “Introducción” se detallan los problemas a resolver, los objetivos, la justificación del proyecto y las limitantes, a continuación, en el segundo capítulo, “Marco de Referencia”, se abordan todos los conceptos y antecedentes relacionados al tema para poder tener un conocimiento más amplio acerca de las bases del proyecto, en el siguiente capítulo, “Desarrollo”, se explica a detalle la metodología utilizada, desde la colecta de muestras en las distintas zonas de la región, así como el procesamiento de las mismas y las técnicas empleadas en el laboratorio para la obtención de las cepas aisladas, por último, en el cuarto capítulo se muestran los “Resultados” y las conclusiones generados a lo largo del desarrollo del proyecto, adicionalmente y con el fin de entender mejor estos resultados y conclusiones, así como de mostrar más detalles acerca del desarrollo del proyecto se presenta una sección final de “Anexos”.

1.1 Planteamiento del problema

La vainilla, *Vanilla planifolia*, es una orquídea perenne y trepadora que puede llegar a medir hasta 50 m (Vargas-Hernández y Gámez-Vázquez, 2014), esta ha adquirido una posición muy importante en la industria alimentaria y cosmetológica debido a sus características organolépticas, volviéndose una de las especias más cotizadas del mundo, por otro lado, la Fusariosis es una enfermedad infecciosa de las plantas causada por hongos del género *Fusarium*, que también puede presentarse en animales y humanos inmunocomprometidos (Gerardon Batista *et al.*, 2020), esta es una enfermedad de preocupación para los agricultores pues de acuerdo con Srivastava *et al.* (2018) dentro del género *Fusarium* las “especies son muy destructivas ya que pueden afectar a casi todos los órganos de la planta y producir una amplia gama de síntomas”. Los síntomas de la Fusariosis varían según la especie infectante y la especie que hospeda, en vainilla, de acuerdo con Adame-García *et al.* (2015) genera síntomas que pueden llevar a la pérdida de la planta, como clorosis en hojas y pudrición de tallo y raíz.

A nivel mundial se ha reportado la Fusariosis en vainilla en cultivos de los principales países productores del mundo como lo son Madagascar e Indonesia (Koyyappurath *et al.*, 2016), que de acuerdo con datos de la FAO en 2020 ocuparon respectivamente el primer y segundo lugar en producción de la orquídea, seguidos muy por detrás de países como México, Papúa Nueva Guinea y China continental (Base de Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAOSTAT, 2020). En México esta enfermedad también se ha reportado, pues se tiene registro de su presencia en vainillales de Nayarit (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017), en la región de la Huasteca Potosina (Hernández-Martínez *et al.*, 2020) y en la región del Totonacapan, Veracruz (Adame-García *et al.*, 2015).

El presente proyecto de investigación centra su atención en las cepas de *Fusarium* causantes de pudrición y marchitamiento en cultivos de vainilla de la región del Totonacapan, pues esta zona tiene especial importancia por ser el centro de origen de la vainilla (Lubinsky *et al.*, 2008), por albergar a los municipios con la mayor producción a nivel nacional de acuerdo con el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2019) y por producir vainilla de alta calidad.

Debido a los largos tiempos de espera para cosechar, los productores de vainilla de la región suelen enfrentarse a tres principales problemas; las inclemencias del tiempo, las plagas y las enfermedades, estas últimas suelen ser las que más afectan a los cultivos y la más común de ellas es la Fusariosis que representa un potencial peligro no solo por lo destructivo del patógeno sino también debido a la poca variabilidad genética que existe de la vainilla, pues esto vuelve a la mayoría de los cultivos igual de vulnerables a la enfermedad.

Para los productores la vulnerabilidad de la orquídea a *Fusarium* se refleja en la disminución en las cosechas, la reducción de los cultivos y un menor rendimiento, así como en la inversión de capital para evitar la propagación y estragos del hongo, por su parte, para la vainilla como especie, *Vanilla planifolia*, al ser un cultivo de propagación clonal y contar con poca variabilidad genética además de encontrarse dentro de la categoría de “En peligro” según la UICN, Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, (Vega *et al.*, 2020) el patógeno representa una verdadera amenaza.

Actualmente, en esta región se llevan a cabo diversas investigaciones en torno al patógeno y la forma en que interactúa con el cultivo, sin embargo, para los investigadores el tiempo que lleva la generación de aislados fúngicos, desde la toma de muestras en campo hasta la purificación en laboratorio, juega en contra al momento de desarrollar sus propios proyectos pues esto incluso puede hacerlos limitarse a conseguir muestras de unos pocos cultivos, por lo que generar una colección de aislados de *Fusarium* obtenidos de diversos vainillales distribuidos por toda la región del Totonacapan ayudaría a solucionar este problema, asegurando una buena variedad de cepas fúngicas y optimizando los tiempos de investigación.

1.2 Justificación

Generar una colección de aislados de las especies de *Fusarium* asociadas al tejido con pudrición y marchitamiento de vainillas de la región del Totonacapan tiene como principal aporte sentar las bases para futuros estudios sobre la interacción patógeno-hospedante, pues una colección como esta puede ser utilizada como punto de partida en proyectos de investigación para la generación de conocimiento en torno al patógeno, como los son estudios

Capítulo I. Introducción de genómica comparativa, en donde se esclarezcan los mecanismos genéticos que participan durante la interacción con la vainilla y la generación de propuestas más eficientes para el control y eliminación del hongo, por otra parte, también sería muy útil para reducir y optimizar los tiempos de investigación pues el tiempo que toma desde la colecta de muestras de vainilla infectada en campo hasta la purificación del patógeno en laboratorio podría ser utilizado en otras actividades.

1.3 Objetivo general

Generar y caracterizar una colección de aislados de *Fusarium* spp. provenientes de vainillas de la región del Totonacapan con síntomas de pudrición de raíces y marchitamiento de tallos.

1.3.1 Objetivos específicos

1. Aislar, purificar y preservar cepas de *Fusarium* spp. a partir de vainilla con síntomas de pudrición y marchitamiento.
2. Identificar cultural y morfológicamente las especies del género *Fusarium* aisladas.
3. Caracterizar patogénicamente las cepas obtenidas y clasificarlas de acuerdo con el grado de virulencia.
4. Analizar la resistencia, tolerancia y susceptibilidad de las cepas de *Fusarium* al fungicida Clorotalonil.

1.4 Hipótesis

Fusarium oxysporum es la especie prevaleciente en el tejido con síntomas de pudrición de raíces y marchitamiento de tallos de vainillas en la región del Totonacapan.

1.6 Límites

Al desarrollar el presente proyecto de investigación la principal limitante fue el tiempo, el cual correspondió a seis meses, como consecuencia de esto la colección de cepas no alcanzó el número de muestras que se tenía contemplado en un principio, lo que además, afectó la realización de la caracterización molecular de los aislados, por último, la falta de una cámara bioclimática, generó la necesidad de implementar diversas estrategias al momento de hacer crecer las cepas en placa y de llevar a cabo las pruebas de patogenicidad.

Capítulo 2. Marco de referencia

2.1 Antecedentes

Debido a la amenaza que representa el género *Fusarium* para la industria agrícola y al interés que estos hongos han despertado en los investigadores, a la fecha existen diversas investigaciones en torno a estos patógenos y la forma en que afectan a diversos cultivos, incluida la vainilla.

Actualmente, se sabe que una de las enfermedades que más se presenta en las orquídeas es la Fusariosis, la cual es causada por distintas especies de hongos del género *Fusarium* como, por ejemplo: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. subglutinans* y *F. fractiflexum* las cuales se han reportado en orquídeas de todo el mundo, aunque principalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Srivastava *et al.*, 2018).

A nivel mundial, en los principales países y zonas productoras vainilleras como Madagascar, Indonesia, Isla Reunión (Francia) e Isla Raiatea (Polinesia Francesa), donde se cultivan especies como *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* y *Vanilla pompona*, se han reportado distintas especies de *Fusarium*, sin embargo, es *F. oxysporum* es por mucho la más frecuente y virulenta, por detrás se ubica *F. solani*, aunque con menor frecuencia (Koyyappurath *et al.*, 2016; Pinaría *et al.*, 2010)

En México, también se han reportado distintas especies de *Fusarium* en vainillales de Nayarit, la Huasteca Potosina, SLP y en la región del Totonacapan, Veracruz, las especies de las que se tiene registro son: *F. solani* en Nayarit, *F. proliferatum* en la región del Totonacapan y *F. oxysporum* en las tres regiones, esta última siendo la más frecuente y la especie que causa la enfermedad (Adame-García *et al.*, 2015; Casillas-Isiordia *et al.*, 2017; Hernández-Martínez *et al.*, 2020).

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Vainilla

Dentro de la familia de las orquídeas se encuentra el género *Vanilla* (Fig. 1), un género con más de 100 especies, de las cuales 12 se ubican en México y cuya distribución pertenece a los climas tropicales (Reyes-López *et al.*, 2014). Son 15 las especies de vainillas aromáticas, pero solo son 3 las que tienen un valor económico: *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis*, la primera es más susceptible a las enfermedades, por otro lado, las dos últimas son cosechadas a pequeña escala, y de estas, la última se caracteriza por producir un sabor diferente por lo que el valor es superior a *V. planifolia*, esto se debe a que posiblemente podría ser un híbrido creado por el hombre (Korthou y Verpoorte, 2007).

2.2.1.1 *Vanilla planifolia*

La especie más cultivada de vainilla a nivel mundial es *Vanilla planifolia* (Reyes-López *et al.*, 2014), que de acuerdo con la descripción de Vargas-Hernández y Gámez-Vázquez (2014), esta es una planta trepadora de tallo flexible de uno a dos cm de diámetro, de color verde brillante, el cual parece estar constituido por segmentos en zigzag de 10 a 15 cm de longitud que en conjunto forman la planta, la cual puede medir hasta 50 m, por su parte, las hojas se caracterizan por ser flexibles, elípticas y suculentas, en cuanto a las flores, estas se presentan en inflorescencia o racimos que nacen de las axilas de las hojas, son de color blanco-amarillento, en total puede haber de 10 a 15 racimos de flores por planta, cada uno conformado por 10 flores o más, las flores abren de uno a tres por racimo cada mañana en la primavera y mueren por la tarde cuando son polinizadas dando lugar al fruto, este es una cápsula dehiscente, carnosa y alargada que puede medir entre 15 a 25 cm de largo y 10 a 15 mm de diámetro, conforme el fruto va madurando pasa de un color verde a amarillo y finalmente a café.

Para poder cosechar las vainas o frutos de las vainillas deben pasar entre seis y nueve meses. Posterior a la cosecha es necesario aplicar un tratamiento conocido como “Beneficiado” o “Curado”, este proceso consta de cuatro pasos; escaldado, sudado, secado y acondicionado, puede llegar a durar hasta cinco meses y tiene como objetivo el desarrollo de los compuestos

Capítulo 2. Marco de referencia aromáticos que caracterizan a la vainilla, la vainillina y el ácido vainílico, los cuales se encuentran dentro de las vainas verdes en forma de compuestos glucosídicos sin propiedades organolépticas, por lo que necesitan de una hidrólisis para poder ser activados, misma que ocurre durante las fases de escaldado y sudado. (Odoux, 2000; Odoux y Grisoni, 2010).

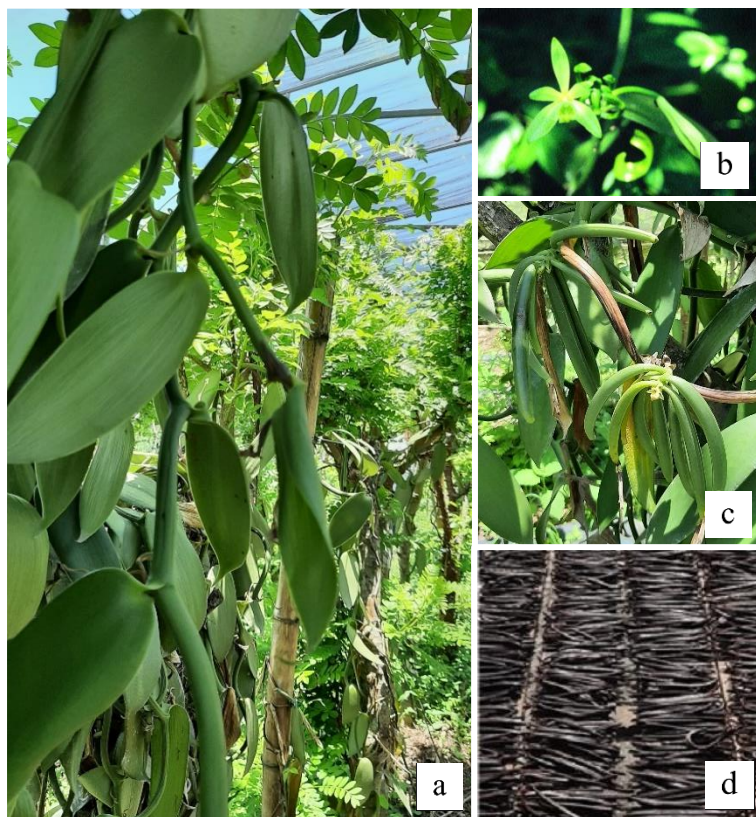


Figura 1. Cuerpo, flor y fruto de la vainilla. a) Estructura del cuerpo de la vainilla, tallos y hojas; b) Racimo de flores de vainilla, solo un capullo ha abierto, tomada de Hernández-Apolinar, 2002; c) Dos racimos de vainas de vainilla, se observa pudrición en el tallo que une los racimos; d) Vainilla beneficiada (Curada), tomada de Cervantes-Castillo *et al.*, 2018.

2.2.1.2 Distribución y Origen

La especie *Vanilla planifolia* se distribuye en las regiones con clima cálido con temperaturas entre 20 y 30 °C, aunque pueden tolerar hasta un máximo de 33 °C y un mínimo no menor a 10 °C, crece en suelos con un pH de 6 a 7, a una altura sobre el nivel del mar de 0 a 600 m,

Capítulo 2. Marco de referencia con precipitaciones promedio de 1200 mm anuales, con buen drenaje, humedad relativa alta (80%) y sombra de alrededor del 50% (Fouché y Jouve, 1999; Mata *et al.*, 2007).

En cuanto a su origen, de acuerdo con lo establecido por Lubinsky *et al.* (2008) se sabe que en Mesoamérica se encuentra la vainilla procedente de Papantla y la vainilla procedente de Oaxaca y la zona maya, estos constituyen dos grupos de diversidad genética, de los cuales el último, se encuentra erosionado y siendo *V. tahitensis* en el pacífico su cultivar más próximo, por otro lado, también se sabe que la vainilla que se cultiva en las regiones del Océano Índico está relacionada con la vainilla de Papantla pues solo se han encontrado diferencias por las mutaciones somáticas, debido a que *V. planifolia* es un cultivo de propagación clonal que se ha extendido por todo el mundo, se puede decir con certeza que Papantla en la región del Totonacapan es el centro de origen de dicha especie. Esta zona no se encuentra del todo establecida, pues su área será distinta dependiendo de la fuente de consulta, sin embargo, se llama región del Totonacapan a todos aquellos municipios con influencias de la cultura Totonaca, los cuales están ubicados principalmente en el centro-norte del estado de Veracruz y norte del estado de Puebla.

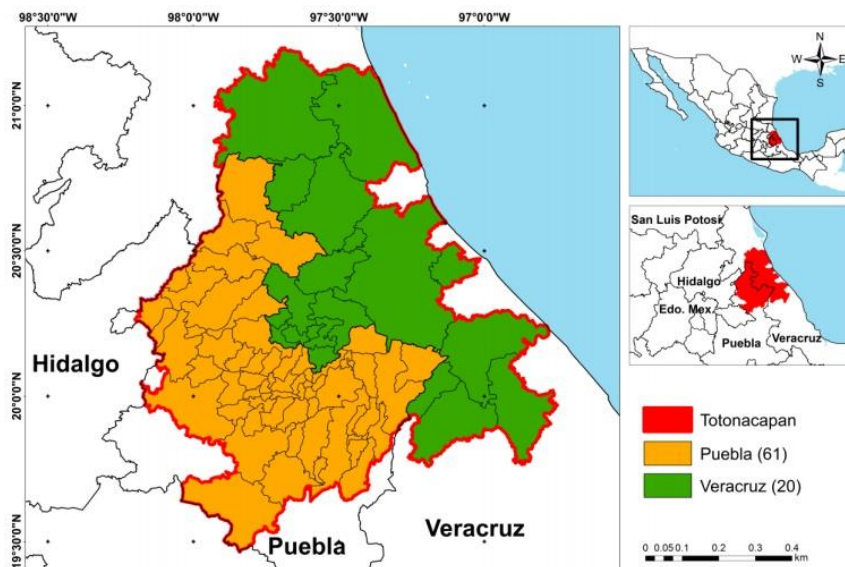


Figura 2. Región del Totonacapan. Para el presente proyecto de investigación solo se tomó en cuenta a algunos municipios de la región del Totonacapan del estado de Veracruz. Tomado de Santillán-Fernández *et al.*, 2020.

2.2.1.3 Importancia

2.2.1.3.1 Industrial

De acuerdo con Korthou y Verpoorte (2007), de todos los compuestos fenólicos que en conjunto dan lugar al olor de la vainilla, la vainillina es el más representativo y con frecuencia se utiliza para sustituir al extracto de la orquídea, pues al formar parte de la vainilla ambas tienen propiedades organolépticas muy semejantes y que resultan ser muy agradables, sin embargo, a pesar de las semejanzas la gente prefiere los productos a base de extracto, independientemente de esto último, la vainilla es el sabor más popular del mundo y es usada en la industria como aromatizante y saborizante, por ejemplo, se utiliza en la industria alimentaria para la elaboración de: helados, chocolates, pasteles, bebidas a base de cola y productos lácteos, también es usada en la industria cosmetológica y en la industria de los cigarrillos.

En cuanto a la vainillina, esta es utilizada para la elaboración de los mismos productos que el extracto de vainilla, comida, bebidas, perfumes, cosméticos y medicinas (Priefert *et al.*, 2001), sin embargo, en la industria este compuesto proviene principalmente de síntesis química y de procesos microbiológicos (Schrader *et al.*, 2004), además, se han demostrado los efectos antimicrobianos de la vainillina en ciertos hongos y bacterias (Tipparaju *et al.*, 2004), lo que vuelve a la vainillina un potencial conservante de alimentos (Fitzgerald *et al.*, 2004), por último, se ha demostrado que el compuesto posee propiedades antimutagénicas, entre otras de interés biológico (Durant y Karran, 2003).

2.2.1.3.2 Económica

En el comercio global, según los datos proporcionados por el Centro de Comercio Internacional (2020), ITC por sus siglas en inglés, las exportaciones de vainilla en el año 2020 superaron los 900 millones de dólares, siendo Madagascar el principal exportador superando los 500 millones de dólares, muy por detrás se ubicaron países como Francia, Alemania, Indonesia y Papúa Nueva Guinea, de los cuales ninguno superó los 100 millones de dólares, a pesar de ser un importante productor, en ese mismo año México solo obtuvo 523 mil dólares por las exportaciones de dicho producto.

Por otra parte, en México, de acuerdo con el SIAP (2019), en el año 2019 fueron los estados de Veracruz, Puebla, Oaxaca y San Luis Potosí quienes en conjunto lograron que el valor de la producción nacional de vainilla estuviera por encima de los 43 millones de pesos, además, según estimaciones de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2017) el valor de las exportaciones, basándose en precios de 2016, para 2024 será de 5.05 millones de dólares y para 2030 de 7.81 millones de dólares.

2.2.1.3.3 Cultural

Rain y Lubinsky (2010) mencionan que probablemente en las tribus de Mesoamérica la vainilla se incorporó entre unos 2000 a 2500 años antes de la llegada de los españoles a México, y que esta era vista con connotaciones sagradas y religiosas, siendo considerada un regalo de los dioses al igual que el maíz y el cacao, además, es posible que los nativos le hayan dado un uso medicinal para trastornos pulmonares, estomacales y para extraer el veneno de algunos insectos, así como para tratar infecciones en heridas.

Actualmente, el cultivo de vainilla en México se encuentra muy ligado a la cultura Totonaca, prueba de ellos son las leyendas, rituales y tradiciones culturales que tienen a la vainilla como protagonista (Reyes-López *et al.*, 2014), sin embargo, esto no quiere decir que en otros pueblos originarios la hayan dejado de lado.

De acuerdo con Rodríguez-López (2016), actualmente en las Tierras Bajas Mayas el término *siis bik* esta asociado a diversas especies de vainilla, incluida *V. planifolia*, en estas zonas el uso que se le da es para perfumarse en ceremonias y fiestas mayas, asimismo, la planta sigue teniendo un uso medicinal, siendo utilizada por parteras para tratar diversos malestares, entre ellos calenturas derivadas del parto.

2.2.1.4 Producción

Los datos proporcionados por FAOSTAT (2020), indican que en el año 2020 la producción mundial de vainilla fue de 7614 toneladas, siendo Madagascar e Indonesia los países que más aportaron a esta cifra, con 2975 y 2306 toneladas respectivamente, seguidos de estos, aunque muy por detrás se ubicaron México con 589 toneladas, Papúa Nueva Guinea con 495 toneladas y China continental con 433 toneladas.

Capítulo 2. Marco de referencia

La producción de vainilla en México en 2019 fue de 521.86 toneladas, siendo los estados de Veracruz, Puebla, Oaxaca y San Luis Potosí quienes conformaron la producción nacional, aunque fueron los municipios de Papantla, Gutiérrez Zamora, Tecolutla y San Rafael ubicados en la región del Totonacapan del estado de Veracruz quienes en conjunto aportaron más de la mitad de la producción nacional de ese año (SIAP, 2019).

A pesar de ser el tercer productor a nivel mundial la producción de vainilla en México es pobre, pues tan solo en 2020, esta no representó ni una tercera parte de lo que produjeron Madagascar o Indonesia (FAOSTAT, 2020). Santillán-Fernández *et al.* (2018) afirmaron que “el país no ha podido incrementar su productividad a nivel internacional, principalmente por la escasa superficie sembrada y la falta de transferencia de tecnología para impulsar el desarrollo del sector” (p. 50), además, debido a los largos tiempos de espera para cosechar los productores deben enfrentarse a las inclemencias del tiempo, las plagas y las enfermedades.

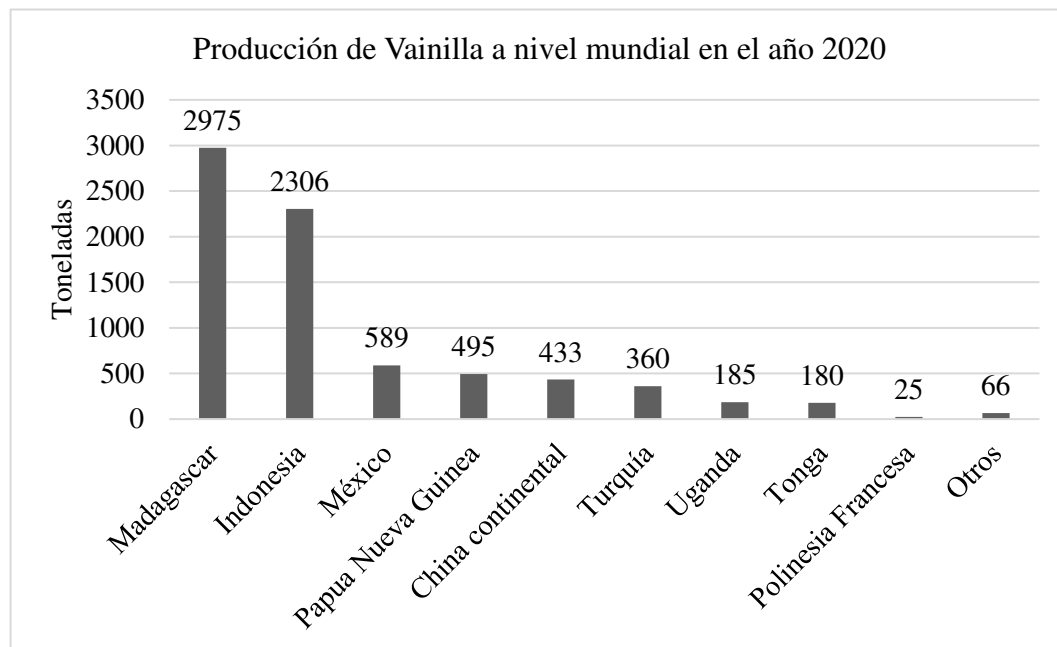


Gráfico 1. Producción de Vainilla a nivel mundial en el año 2020. En el gráfico se puede observar como la mayor parte de la producción mundial de vainilla recae en solo dos países. Elaboración propia a partir de datos de FAOSTAT, 2020.

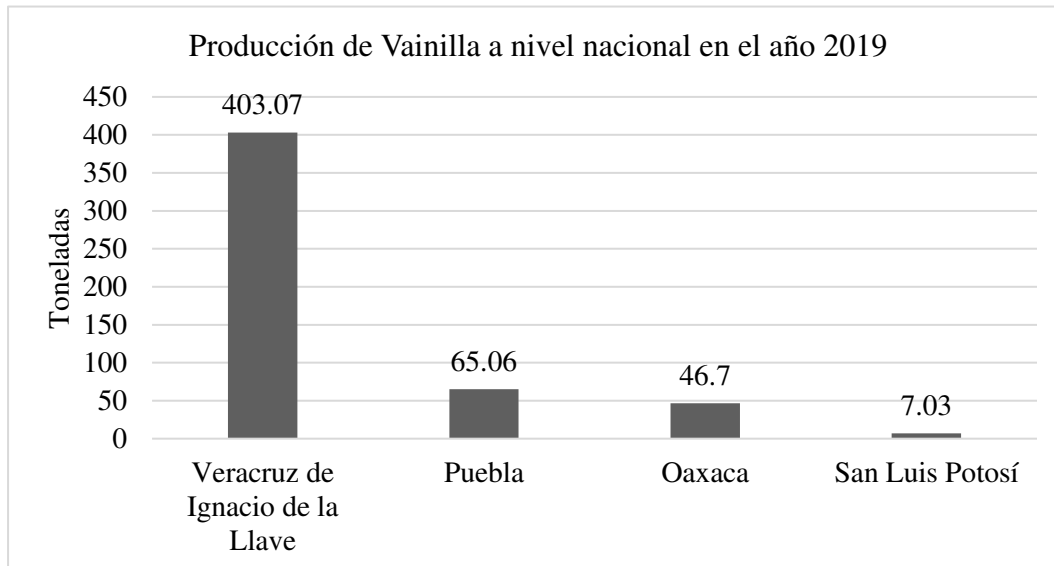


Gráfico 2. Producción de Vainilla a nivel nacional en el año 2019. En el gráfico se puede observar como la mayor parte de la producción nacional proviene del estado de Veracruz. Elaboración propia a partir de datos del SIAP, 2019.

2.2.2 *Fusarium*

Como ya se ha mencionado anteriormente la palabra *Fusarium* se usa para denominar a un género de hongos ascomicetos filamentosos, el cual tiene relevancia debido a que dentro de este género existen varias especies que son de importancia agrícola pues se han clasificado como fitopatógenas (Ma *et al.*, 2013).

Entre las especies de *Fusarium* que se han reportado en cultivos de vainilla se encuentran: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. concentricum*, *F. mangiferae*, *F. decemcellulare*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. napiforme*, *F. polyphialidicum*, *F. pseudocircinatum*, *F. semitectum* y *F. subglutinans*, las primeras cinco se han reportado en cultivos de Madagascar, Isla Reunión e Isla Raiatea, mientras que todas con excepción de *F. concentricum* se han aislado de cultivos de Indonesia, sin embargo, son las especies *F. solani* y *F. oxysporum* las que se han reportado con mayor frecuencia y siendo esta última el agente causal de la enfermedad de pudrición de raíces y marchitamiento de tallos (Koyyappurath *et al.*, 2016).

2.2.2.1 *Fusarium oxysporum*

De acuerdo con Leslie y Summerell. (2006) la especie *F. oxysporum* es un hongo saprófito que cuenta con distribución global pues se ha aislado de la mayoría de suelos del mundo, pues esta se puede dispersar por el viento, el suelo, semillas y plantas infectadas, además, los insectos y las algas también se encuentran dentro de su ciclo de dispersión, adicionalmente, resulta ser patógena para muchas plantas, por lo que dentro de su género es la especie con el mayor potencial para causar estragos económicos, incluso existen formas especiales denominadas como “*forma specialis* (f. sp.)”, es decir, que son exclusivas de un hospedante, de estas se han reportado más de 100, así por ejemplo, se le denomina *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* a la causante de la pudrición de raíz y tallo en vainilla.

En cuanto a las condiciones o requerimientos de desarrollo, se encontró que las cepas de *Fusarium oxysporum* tienen un crecimiento óptimo en un rango de temperatura que va de los 23 a los 28 °C, necesitan un ambiente de humedad que va de entre el 74 al 80%, así como un pH de 6 a 7 y no les favorece la luz, pues suelen desarrollarse más rápido en la oscuridad (Benaouali *et al.*, 2014).

2.2.2.1.1 Características microscópicas

Las características del cultivo de *F. oxysporum* en PDA (Agar Papa Dextrosa) fueron descritos por Leslie y Summerell. (2006) de la siguiente manera:

La morfología de la colonia en PDA varía mucho. Los micelios pueden ser flocosos, escasos o abundantes y varían en color de blanco a violeta pálido. En algunos aislados se producen abundantes macroconidias de color naranja pálido o violeta pálido en una masa central de esporas. Algunos aislados pueden producir abundantes esclerocios pequeños de color marrón pálido, azul a azul-negro o violeta. *F. oxysporum* suele producir un pigmento de color violeta pálido a oscuro o magenta oscuro en el agar, pero algunos aislados no producen ningún pigmento. Algunos aislados de *F. oxysporum* mutan fácilmente a la forma pionera o a una colonia micelial plana y "húmeda" de aspecto amarillo a naranja cuando se cultivan en PDA. (p. 212)

Al microscopio, algunas de las estructuras que caracterizan a *F. oxysporum* también fueron descritas por Leslie y Summerell. (2006) indicando que; aunque en ocasiones suelen ser escasos o inexistentes, la mayoría de las veces los aislados producen esporoquios de color naranja pálido donde abundan las macroconidias, estas últimas por lo general suelen tener tres septos, son de longitud corta a media, rectas a ligeramente curvadas, relativamente delgadas y de paredes finas, su célula apical suele ser cónica y cuervada, en ocasiones con un ligero gancho, mientras que su célula basal tiene forma puntiaguada o de pie, por otro lado se encuentran las microconidias, las cuales nacen de células conidiógenas de tipo monofialide corta, generalmente no tienen septos, son de forma ovalada o elíptica, abundan en el micelio aéreo y se presentan en falsas cabezas, por último, están las clamidosporas, estas pueden tener paredes lisas o rugosas, formarse solas o en pares, también pueden encontrarse en racimos o en cadenas cortas y pueden ser terminales o intercalares en hifas aéreas, en cuanto a su ubicación, se pueden hallar sumergidas o en la superficie, estas se forman rápido y de forma abundante aunque en algunos aislados pueden desarrollarse lentamente o no desarrollarse.

Para poder identificar a la especie en cuestión se ha establecido que:

Las características morfológicas críticas de *F. oxysporum* incluyen la producción de microconidias en falsas cabezas sobre fialides cortas formadas en las hifas, la producción de clamidosporas y la forma de las macroconidias y las microconidias... Los aislados de *F. oxysporum* son los más difíciles de distinguir de los de *F. solani* y *F. subglutinans*. *F. solani* forma microconidias en falsas cabezas sobre monofilamentos muy largos formados en las hifas. *F. subglutinans* se distingue de *F. oxysporum* por la formación de microconidias a partir de polifialides y la ausencia de clamidosporas. Sin embargo, los polifialides son difíciles de encontrar en algunos aislados de *F. subglutinans*, y las clamidosporas pueden formarse lentamente en algunos aislados de *F. oxysporum*, por lo que puede ser necesaria una observación cuidadosa y paciente para distinguir estas especies morfológicamente. (Leslie y Summerell, 2006, p. 213).

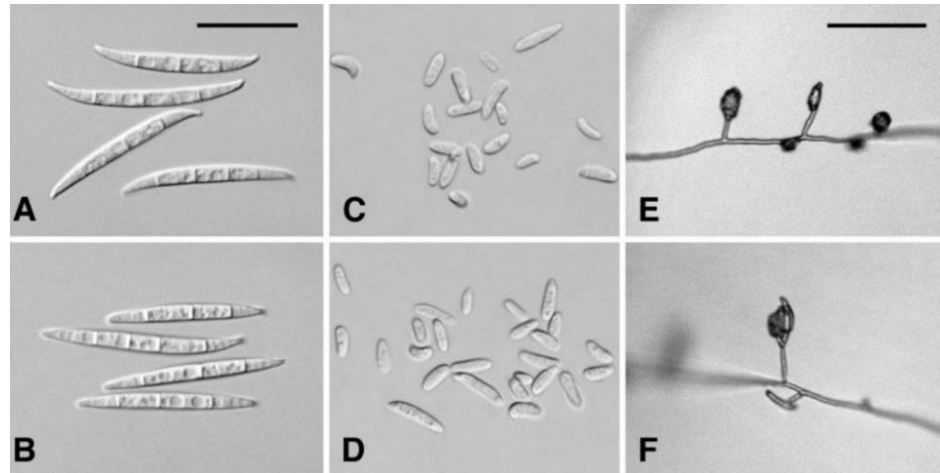


Figura 3. Caracteres morfológicos de *F. oxysporum*. En los paneles A y B se muestran “Macroconidias”, en los paneles C y D se muestran “Microconidias”, para tener una referencia del tamaño, la barra de escala en el panel A equivale a 25 μm , en los paneles E y F se muestran microconidias desarrolladas *in situ* en Agar Hojas de Clavel, la barra de escala equivale a 50 μm . Tomado de Leslie y Summerell, 2006.

2.2.2.1.2 Mecanismo de infección

El mecanismo de infección de *F. oxysporum* en vainilla comienza con la penetración del patógeno a través de los pelos de las raíces, una vez que llega al sistema vascular la planta ve comprometida su capacidad de absorber nutrientes y en las células corticales ocurre una rápida plasmólisis, todo esto da como resultado el pardeamiento y la muerte de raíces subterráneas y posteriormente de las raíces aéreas, a continuación son el tallo y hojas los que se marchitan, provocando el colapso y muerte de la planta (Koyyappurath *et al.*, 2015a; Koyyappurath *et al.*, 2015b; Srivastava *et al.*, 2018).

Capítulo 3. Metodología

Colecta de muestras de vainilla con pudrición.

El tejido vegetal de vainilla se colectó en cinco municipios de la región del Totonacapan, el cual correspondió a tallos y raíces que presentaban síntomas de pudrición y marchitamiento, signos característicos de la Fusariosis. Las muestras tenían un tamaño de 10 a 15 cm y contaban con una parte sana y otra enferma, su almacenamiento se hizo por separado en bolsas de plástico rotuladas para evitar la contaminación cruzada. Una vez realizada la colecta, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Se registraron los datos del sitio de colecta tales como las coordenadas geográficas, altura al nivel del mar y clima de la región, así como las condiciones de establecimiento del cultivo. La información de los sitios de colecta de muestras está disponible en el Anexo I.



Figura 4. Muestra de vainilla con síntomas de pudrición y marchitamiento. a) Muestra de tallo basal de vainilla que presenta síntomas de pudrición y marchitamiento, en la imagen se puede observar como la muestra ha sido dañada en solo una parte y cuenta con una sección sana b) Para la colecta de muestras también se tomaron en cuenta las raíces terrestres y aéreas, en la imagen se puede observar una raíz aérea que ha sido dañada en su totalidad.

Aislamiento de *Fusarium* spp. a partir de tejido vegetal de vainilla.

Una vez en laboratorio, se tomaron trozos de 2 a 3 cm de largo de las muestras de vainilla colectadas, mismos a los que se les dio un tratamiento con soluciones de detergente y cloro en concentraciones de 1% y 5%, respectivamente, para eliminar los agentes físicos externos y contaminantes biológicos. Posteriormente bajo condiciones asépticas se tomaron pequeños fragmentos de tallo no mayores a 5 mm² y fueron sembrados en medio de cultivo Agar Peptona con Clorotalonil (Tetracloroisofaltonitrilo), este último se utilizó debido a que se ha demostrado que es un fungicida al que *F. oxysporum* es resistente (González-Oviedo, 2019), por lo que su uso impide el crecimiento de otros hongos, pero no de *Fusarium*, a su vez se utilizó “Estrepto LER Extra Forte 4MUI”, una mezcla de los antibióticos Penicilina, Estreptomomicina y Dicloxacilina, para evitar el crecimiento bacteriano. (Anexo II)

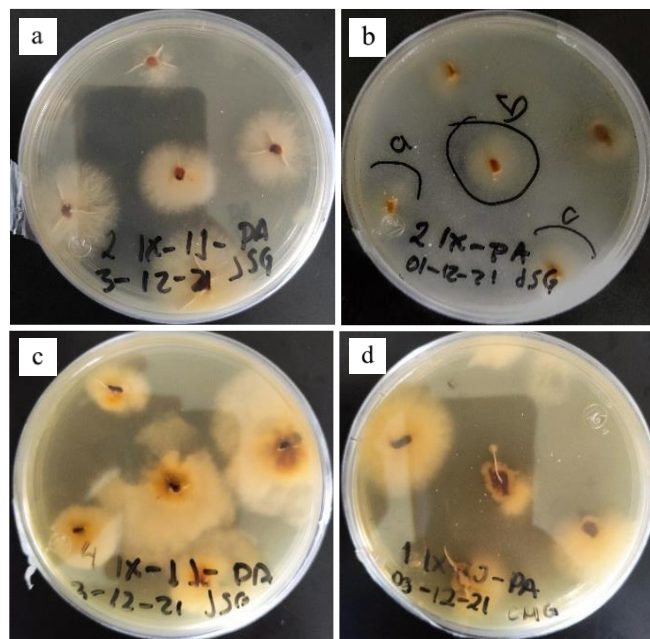


Figura 5. Siembra de tejido vegetal de vainilla con pudrición. Muestras de tejido vegetal sembrado en Agar Peptona con Clorotalonil, por cada placa se sembraron 5 explantes de tejido vegetal enfermo. Las imágenes, de 48 a 72 horas después del sembrado, muestran el desarrollo de micelio a partir de los tejidos vegetales. a) El crecimiento de micelio a partir del tejido vegetal es el esperado, pues las colonias fúngicas presentan características similares a *Fusarium* spp. b) Selección de colonias. Generalmente se seleccionaron de 2 a 3 colonias

Capítulo 3. Metodología
por placa, se tomaron en cuenta aquellas cuyas características eran más similares a *Fusarium* y aquellas cuyo micelio no hubiese invadido a otro. c) Crecimiento de contaminantes en placa. Aquellas placas en donde crecieron contaminantes fúngicos fueron descartadas en el proceso de selección. d) En el centro de la placa se observa un círculo pequeño blanco, por sus características se consideró como contaminación bacteriana, ocasionada probablemente por un error en el proceso de lavado o sembrado del tejido.

Purificación de *Fusarium* spp. en medio selectivo.

Aproximadamente de 48 a 72 horas después de la siembra cuando el tejido de vainilla sembrado presentó crecimiento de micelio, se transfirieron las colonias a otros medios de cultivo. Primero se seleccionaron aquellas colonias fúngicas cuyas características culturales se asemejaron a *Fusarium* (color blanco o amarillo suave, micelio radial con estructuras ramificadas y crecimiento algodonoso moderado), posteriormente, de las colonias seleccionadas se tomaron fragmentos de las orillas no mayores a 5 mm² los cuales fueron transferidos a medio Agar Agua. Transcurridas 48 h, las cepas fueron transferidas a medio sintético bajo en nutrientes SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), mediante la técnica de punta de hifa, con el objetivo de obtener cultivos de *Fusarium* puros.

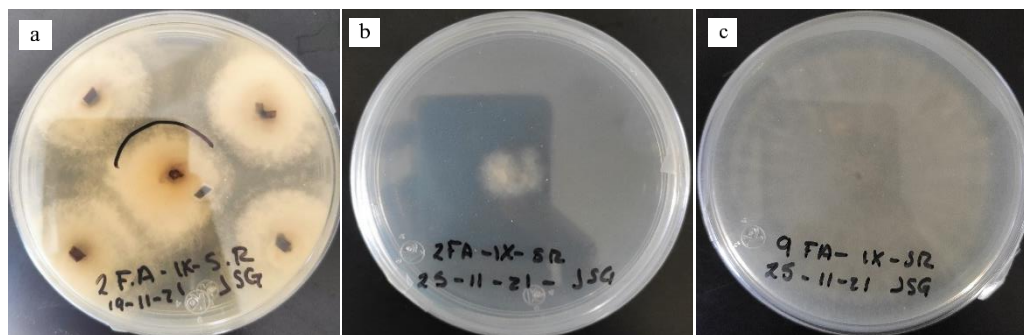


Figura 6. Micelio transferido de medio Agar Peptona con Clorotalonil a medio agar agua. Transferencia del micelio que creció alrededor del tejido vegetal en medio Agar Peptona con Clorotalonil a medio Agar Agua. a) Sección de aproximadamente 5 mm² retirada de las orillas del micelio que creció a partir del tejido vegetal b) Transcurridos de 48 a 72 horas se observa como el micelio no prolifero ni adquirió las características culturales propias de *Fusarium* spp. por lo que se descarta c) Transcurridos de 48 a 72 horas se observa como el micelio prolifero y adquirió las características culturales propias de *Fusarium* spp.

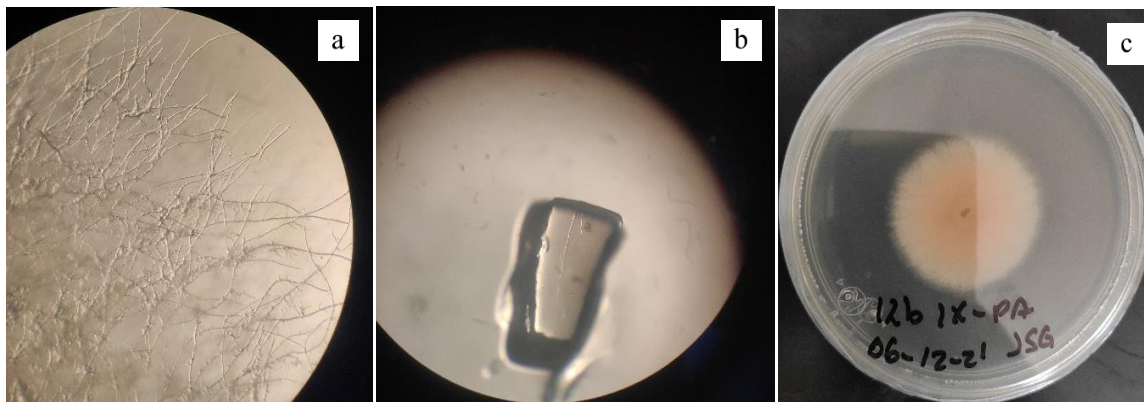


Figura 7. Purificación del micelio transferido de medio Agar Agua a medio SNA con la técnica punta de hifa. Transferencia de hifas crecidas en medio Agar Agua a medio SNA, se utilizó esta técnica con el objetivo de obtener cepas provenientes de una sola hifa. a) Ramificación de hifas en placa b) Fragmento de agar con una punta de hifa hialina listo para ser sembrado en medio SNA c) Crecimiento en medio SNA de las muestras transferidas. Imágenes tomadas con un microscopio estereoscópico.

Almacenamiento de los aislados de *Fusarium* spp. (Mejores candidatos).

A partir de los cultivos de *Fusarium* transferidos a medio SNA, se cortaron discos de 8 mm de diámetro de medio con micelio, seleccionando el micelio de las orillas de la placa debido a que este era el micelio más joven. Los discos (aproximadamente seis por placa) fueron colocados en microtubos de 2 ml con 1 ml de agua destilada estéril, una vez transferidos, los microtubos fueron rotulados asignándoles un código de acuerdo con su lugar de procedencia, la persona encargada de la colecta y/o el productor del cultivo, a su vez fueron almacenados a 16°C, donde estuvieron disponibles para ensayos posteriores.

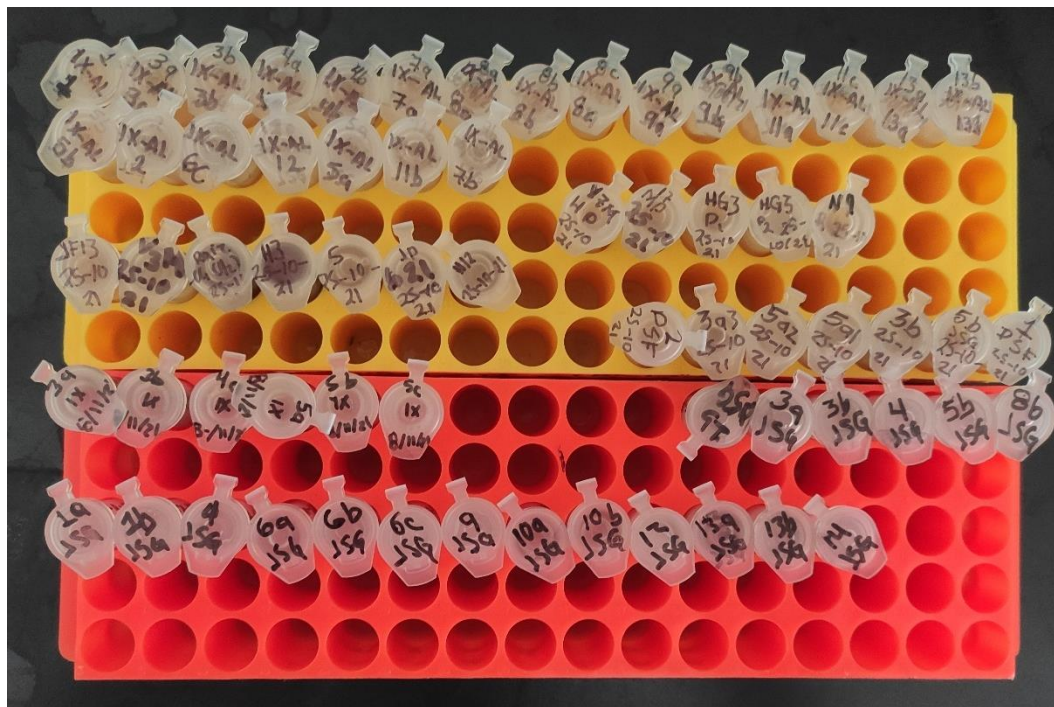


Figura 8. Primeras cepas almacenadas. El código utilizado en estas se basa en las iniciales de las localidades de origen, así como de los encargados de llevar a cabo la colecta y de los productores de las plantaciones.

Caracterización cultural y morfológica.

Los aislados fúngicos se inocularon en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) a 26°C y siete días después de la inoculación fueron registradas sus características culturales, tales como, la forma del micelio, el color, el tamaño de crecimiento radial y cualquier otra característica que fuese perceptible a simple vista. Además, fue necesario realizar la caracterización morfológica, para la cual, los aislados fúngicos fueron sembrados en medio SNA, también a 26°C durante siete días, se hizo especial énfasis en encontrar las características determinantes de la especie *F. oxysporum*, para ello se hizo uso del microscopio compuesto, los aspectos más importantes a tomar en cuenta fueron que las microconidias se presentaran en falsas cabezas y que las monofiálides fueran cortas.

Almacenamiento de los aislados de *Fusarium* spp. (Producto final)

Una vez obtenidos los resultados de la caracterización cultural y morfológica, se tomaron en cuenta sólo aquellas cepas cuyas características eran semejantes a las de *Fusarium* spp. y en especial a *F. oxysporum*, a partir de estas, una alícuota de 15 µl de agua se sembró en cada placa seleccionada y posteriormente se extrajo ya con micelio y se sembró nuevamente en medio SNA, transcurridos aproximadamente 10 días, de los nuevos cultivos de *Fusarium* se tomaron discos de 8 mm de diámetro, seleccionando el micelio más joven de las orillas. Los discos (aproximadamente seis) fueron colocados en microtubos de 2 ml con 1 ml de agua destilada estéril, una vez transferidos, los microtubos fueron rotulados con un nuevo código y almacenados a 16°C, donde están disponibles para investigaciones posteriores.

Caracterización patogénica.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron sobre hojas de vainilla obtenidas del Banco de Germoplasma de INIFAP Ixtacuaco. Una vez que se cortaron las hojas se llevaron al laboratorio para eliminar los agentes físicos externos y contaminantes biológicos para lo cual se les dio un tratamiento con soluciones de detergente y cloro en concentraciones de 1% y 5%, respectivamente. Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo dentro de cámaras húmedas, las cuales consistieron en contenedores de plástico con tapa a las que se asperjó con alcohol etílico como método de desinfección, una vez secas, se colocó un par de toallitas sobre la base y se humedecieron con agua estéril, después se les colocó encima una tapadera de una caja Petri que serviría como base para las hojas de vainilla, a continuación, se realizó una incisión en forma de cruz en medio de la hoja, se secó la savia y sobre la lesión se colocó un disco de agar con micelio con el micelio de cara a la lesión, se cerró el contenedor y se registraron los cambios cada 24 horas durante 12 días, es importante mencionar que por cada cepa aislada se realizaron pruebas de patogenicidad en 3 hojas de vainillas.

Capítulo 4. Resultados

Caracterización morfológica

Con la caracterización morfológica se logró observar estructuras generales y específicas, por ejemplo, fue posible identificar hifas, microconidias y fiálides, con lo cual se identificó el género *Fusarium* en la mayoría de los aislados y con base en esto se descartaron aquellas cepas cuyas características morfológicas no correspondieran a las establecidas en la literatura para *Fusarium* spp., además, en algunos casos debido a la observación de características específicas fue posible aproximarse a la identificación de la especie *F. oxysporum*, aunque esto no se puede afirmar con total certeza debido a la falta de pruebas de biología molecular, las cuales quedaron fuera del alcance del proyecto, sin embargo, lo que sí se puede afirmar es que las cepas seleccionadas para conformar la colección de aislados si corresponden al género *Fusarium*.

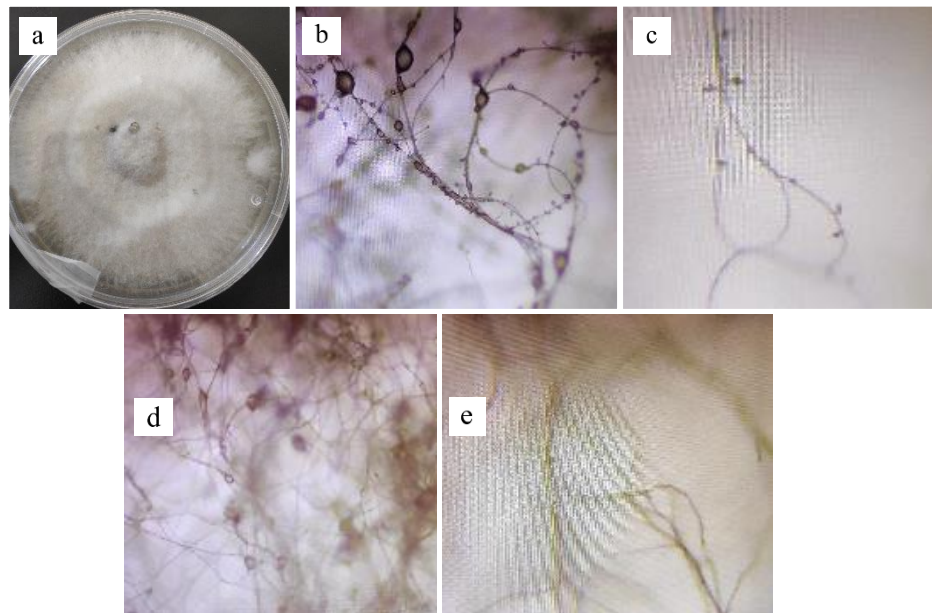


Figura 9. Estructuras fúngicas desarrolladas en medio PDA y SNA. En las imágenes se pueden observar las estructuras macro y microscópicas desarrolladas por las cepas aisladas a partir de vainillas con síntomas de pudrición. a) Crecimiento en medio PDA de una cepa de *Fusarium*, la mayoría de las cepas se desarrollaron de manera similar en este medio de cultivo, se puede observar el crecimiento algodonoso y radial del micelio, aunque en la

imagen es difícil apreciar, la cepa presentó un color crema con una muy ligera tonalidad de violeta claro. b) Micelio de una cepa de *Fusarium* desarrollada en medio SNA, apreciado con un aumento 4x, aunque con poca definición, se pueden observar microconidias. c) Misma cepa del panel “b” observada en aumento 10x, se pueden apreciar muy bien los cuerpos de las microconidias y el tamaño muy corto de las monofialides, lo cual es característico de la especie *F. oxysporum*. d y e) Micelio de una cepa fúngica desarrollada en medio SNA observada con un aumento de 4x y 10x, respectivamente, debido a sus características se descarta la posibilidad de que pertenezca a *Fusarium* spp. Las cepas que no presentaron características semejantes a *Fusarium* spp. fueron descartadas.

Colección de aislados

Se logró generar una colección de aislados de 88 cepas de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de vainillas con síntomas de pudrición y marchitamiento de cultivos ubicados en los municipios de Tlapacoyan, San Rafael, Papantla, Tecolutla y Gutiérrez Zamora pertenecientes a la región del Totonacapan, y de municipios cercanos a esta, como Alto Lucero de Gutiérrez Barrios, Juchique de Ferrer y Vega de Alatorre. De las 88 cepas, 65 fueron aisladas gracias a los resultados obtenidos en la caracterización cultural y morfológica, las 23 restantes fueron proporcionadas por la Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas.

Las cepas actualmente se preservan a 16°C en el INIFAP C.E. Ixtacuaco, es importante mencionar que además de la colección principal de cepas, se hizo una colección secundaria o duplicado con un etiquetado distinto solo para aquellas cepas que presentaran resistencia a Clorotalonil (45 en total). Durante la realización del presente proyecto se utilizaron distintos códigos para poder distinguir a las cepas con las que se trabajó, sin embargo, debido a que el primer sistema de nomenclatura se volvió complejo, al finalizar el proyecto se decidió implementar una nomenclatura que resultara más fácil de utilizar, entonces, a cada cepa se le asignó un código que comienza con las letras “IXF”, “IX” por Ixtacuaco, lugar donde se ubica el laboratorio donde se resguardan y “F” por *Fusarium*, seguido se les asignó un número del 1 al 88 y para la colección total de aislados se colocó la letra “a” al final, mientras que para la colección con las cepas resistentes a Clorotalonil se colocó la letra “b” al final.

En el Anexo III se muestran los códigos de las cepas, tanto para la colección de aislados general como para la colección de aislados secundaria, y su lugar de procedencia.

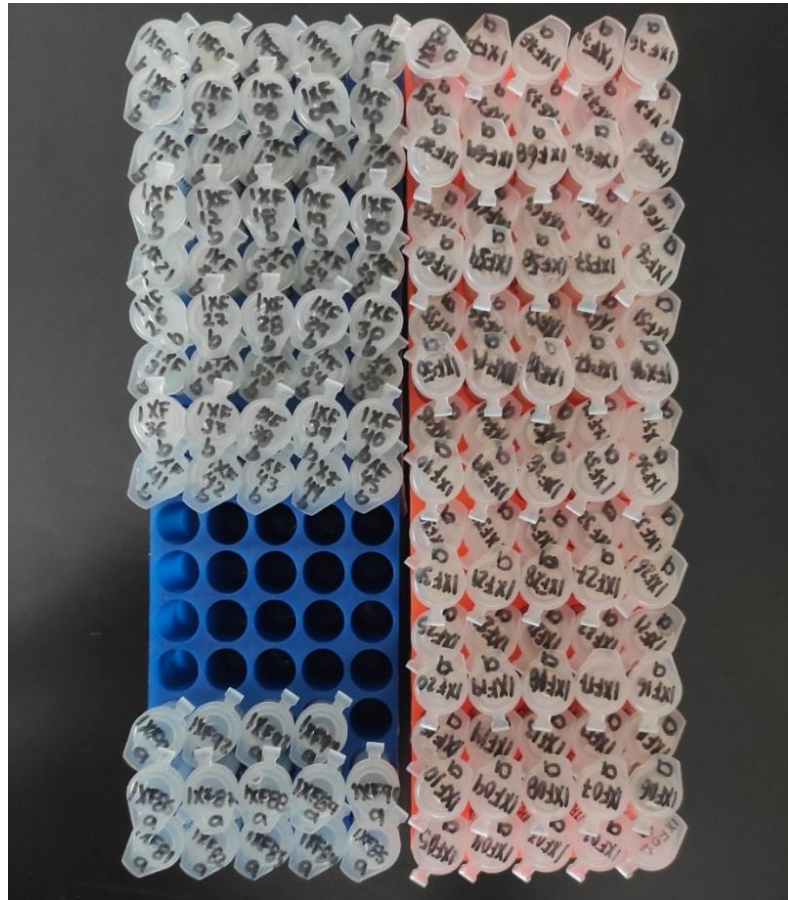


Figura 10. Colección de aislados. Todas las cepas aisladas, en la gradilla naranja y en la sección con pocos microtubos de la gradilla azul se encuentran todas las cepas de la colección general de aislados de *Fusarium spp.*, mientras que en la sección con más microtubos de la gradilla azul se encuentran los duplicados que presentaron mayor resistencia a Clorotalonil.

Pruebas de patogenicidad

Para las cepas que presentaron algún nivel de virulencia, esta comenzó con la expansión moderada del micelio fuera del agar, sobre la hoja, posteriormente comenzó el cambio de color alrededor del punto de inoculación, de verde a café oscuro y en algunos casos hasta llegar a negro, indicando el inicio de la pudrición, la cual siempre tuvo un avance más rápido hacia la base o el ápice en comparación con los lados.

Debido al tiempo limitado del proyecto solo se realizó la caracterización patogénica para algunas cepas, 51 en total, se determinaron niveles de virulencia de acuerdo con el avance de la pudrición al finalizar los días correspondientes al ensayo en las hojas de vainilla. Los rangos de virulencia y la cantidad de cepas que entraron dentro de dicha categoría fueron: 0% (18), <25% (9), 25% - 50% (7), 50% - 75% (4), 75% - 100% (13), donde 0% indicaba que no produjo daño a la hoja, mientras que 100% representaba la pudrición completa. Se tomó en cuenta el daño que se generó en los tres ensayos por cepa para poder ubicarlas dentro de alguno de los rangos. La relación de las cepas y el daño se encuentra en el Anexo III.

Tabla 1

Rangos de virulencia. Parte 1
















Nivel de virulencia	Cepa	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0%	IXF5 3 a			
<25%	IXF4 1 a			
25% - 50%	IXF5 0 a			

Tabla 2

Rangos de virulencia. Parte 2

Nivel de virulencia	Cepa	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
50 - 75%	IXF1 2 a			
75 - 100 %	IXF5 7 a			

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Al finalizar el presente proyecto de investigación se logró generar una colección de aislados fúngicos con un total de 88 cepas, obtenidas de distintos vainillales ubicados en la región del Totonacapan, gracias a los resultados generados durante la caracterización cultural y morfológica se logró concluir que todas las cepas de la colección pertenecen al género *Fusarium* e inferir que la especie *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, causante de la Fusariosis en vainilla se encuentra presente dentro de la colección, debido a que varias cepas presentaron microconidias en falsas cabezas unidas al micelio por medio de monofiálides cortas, lo cual de acuerdo con la literatura es propio de la especie, a pesar de estas observaciones no se puede afirmar con total seguridad la presencia de dicha especie debido a la falta de análisis de identificación molecular, los cuales quedaron fuera del alcance del proyecto. Sin embargo, actualmente, en otro trabajo de tesis se está realizando la identificación molecular de los aislados de la colección.

Respecto a las pruebas de patogenicidad, el tiempo fue una limitante, por lo que solo se pudo realizar ensayos de patogenicidad para 51 cepas, de estas, al menos 33 cepas lograron que se desarrollara algún nivel de pudrición en las hojas de vainilla en condiciones *in vitro*, por lo que también se asume que estas cepas corresponden a la especie *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, además, los resultados de las pruebas de resistencia al fungicida Clorotalonil también señalan su presencia, pues al menos 45 cepas mostraron algún nivel de resistencia al fungicida.

En general, los resultados nos conducen a aceptar la hipótesis planteada, en donde *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* es la especie prevaleciente en el tejido con síntomas de pudrición de raíces y marchitamiento de tallos en vainillas de la región del Totonacapan.

Recomendaciones

Considerando los resultados del presente proyecto de investigación y con base en las conclusiones se recomienda:

- a) Los resultados de la caracterización morfológica deben corroborarse mediante la amplificación y secuenciación de genes nucleares, ribosomales y mitocondriales.
- b) Evaluar en condiciones *in vitro*, el nivel de virulencia de las cepas mediante su inoculación en raíces de plantas de vainilla, con el objetivo de corroborar lo que se realizó en hojas.
- c) Una vez identificadas las cepas, realizar un análisis de diversidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* mediante análisis de secuencias repetidas internas (ISSR) o de ADN amplificado al azar (RAPD).
- d) Identificar mediante genómica comparativa las diferencias entre las cepas con distinto grado de virulencia sobre raíces y tallos de vainilla.
- e) Diseñar una base de datos actualizable que contenga información completa de cada una de las cepas presentes en la colección de aislados.
- f) Diseñar y validar unos marcadores moleculares para la identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* agente causal de la Fusariosis en vainilla.

Bibliografía

- Adame-García, J., Rodríguez-Guerra, R., Iglesias-Andreu, L. G., Ramos-Prado, J. M., & Luna-Rodríguez, M. (2015). Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences*, 93(3), 669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Adler Pharma. (2021). *Ficha Técnica: Estrepto LER Extra Forte 4MUI*. Adler Pharma: <https://adler-la.com/producto/clase/farmaceuticos/antibioticos/estrepto-ler-extra-forte-4m-2/>
- Adler Pharma. (2021). *Ficha Técnica: Estrepto LER Extra Forte 4MUI [Fotografía]*. Adler Pharma: <https://adler-la.com/producto/clase/farmaceuticos/antibioticos/estrepto-ler-extra-forte-4m-2/>
- Adler Pharma. (2021). *Ficha Técnica: Estrepto LER Extra Forte 4MUI [Tabla]*. Adler Pharma: <https://adler-la.com/producto/clase/farmaceuticos/antibioticos/estrepto-ler-extra-forte-4m-2/>
- Agrizon. (2022). *Bravo 720 SC. [Fotografía]*. Agrizon: <https://www.e-agrizon.com/producto/bravo-720-sc-1-lt-2-agroquimico-fungicida-concentrada/>
- An American Vanguard Company. (2022). *BRAVO 720 Fungicida [Figura]*. AMVAC: https://www.amvac.com.mx/sites/default/files/_media/content/FT-Bravo%20720.pdf
- Babadoost, M. (2018). *Fusarium: Historical and continued importance*. En T. Askun (Ed.), *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74147>
- Base de Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). *Cultivos y Productos de Ganadería*. FAOSTAT: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>

- Benaouali, H., Hamini-Kadar, N., Bouras, A., Benichou, S., Kihal, M., & Henni, J.-E. (2014). Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici*. *Advances in Environmental Biology*, 8(10), 36-49.
- Casillas-Isiordia, R., Flores-de la Rosa, F. R., Can-Chulim, Á., Luna Esquivel, G., Rodríguez-Guerra, R., Ramírez-Guerrero, L. G., & Luna-Rodríguez, M. (2017). *Fusarium* sp. ASSOCIATED WITH *Vanilla* sp. ROT IN NAYARIT, MÉXICO. *ARPAN Journal of Agricultural and Biological Science*, 12(2), 43-50. <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/2207>
- Cervantes Castillo, A., Lima Morales, M., Delgado Alvarado, A., Herrera Cabrera, B., Arévalo Galarza, G., Soto Hernández, R., García Osorio, C., & Arévalo Galarza, M. L. (2018). Calidad de frutos vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) procedente de la Huasteca Potosina, México [Fotografía]. *Nova Scientia*, 10(21), 360-378. <https://doi.org/https://doi.org/doi.org/10.21640/ns.v10i21.1586>
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021a). *Alto Lucero de Gutiérrez Barrios*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2021/06/ALTO-LUCERO_2021.pdf
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021b). *Gutiérrez Zamora*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2020/12/Guti%C3%A9rrez-Zamora_2020.pdf
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021c). *Juchique de Ferrer*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2020/12/Juchique-de-Ferrer_2020.pdf
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021d). *Papantla*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2020/12/Papantla_2020.pdf

- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021e). *San Rafael*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2021/06/SAN-RAFAEL_2021.pdf
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021f). *Tecolutla*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2020/12/Tecolutla_2020.pdf
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021g). *Tlapacoyan*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2020/12/Tlapacoyan_2020.pdf
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz. (2021h). *Vega de Alatorre*. Cuadernillos municipales 2021: http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2020/12/Vega-de-Alatorre_2020.pdf
- Durant, S., & Karran, P. (2003). Vanillins-a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5501-5512. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg753>
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2004). The Potential Application of Vanillin in Preventing Yeast Spoilage of Soft Drinks and Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 67(2), 391-395. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.2.391>
- Fouché, J. G., & Jouve, L. (1999). *Vanilla planifolia*: history, botany and culture in Reunion island. *Agronomie*, 19(8), 689-703.
- Gerardon Batista, B., Antunes de Chaves, M., Reginatto, P., Jaconi Saraiva, O., & Meneghello Fuentefria, A. (2020). Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0037-8682-0013-2020>

- González-Oviedo, N. A. (2019). *Análisis genético de Fusarium oxysporum patógeno y no patógeno endófito de Vanilla planifolia Jacks., en relación a la susceptibilidad ante fungicidas [Tesis de maestría]*. Universidad Veracruzana.
- Hernández Apolinar, M. (2002). History and Ecology of Vanilla [Fotografía]. *Voices of Mexico*(60), 83-86.
<https://issuu.com/cisan.unam/docs/vom60?mode=mobile&embedId=3982563/1198913>
- Hernández-Martínez, J., Carranza-Álvarez, C., Maldonado-Miranda, J., & Martínez-Soto, D. (2020). Aislamiento de *Fusarium* de plantas de vainilla cultivadas en la Huasteca Potosina México. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 475-484.
<https://doi.org/https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2004-4>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (Diciembre de 2021). Marco Geoestadístico Nacional.
- International Trade Center. (2020). *Lista de los exportadores para el producto seleccionado*
 Producto: 0905 Vainilla. ITC TRADE MAP:
https://www.trademap.org/Country_SelProduct_TS.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c%7c0905%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c2%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1
- Korthou, H., & Verpoorte, R. (2007). *Vanilla. En R.G. Berger (Ed.), Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer.
- Koyyappurath, S., Atuahiva, T., Le Guen, R., Batina, H., Le Squin, S., Gautheron, N., Edelmann, V., Peribe, J., Jahiel, M., Steinberg, C., Liew, E., Alabouvette, C., Besse, P., Dron, M., Sache, I., Laval, V., & Grisoni, M. (2015a). *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathology*, 65(4), 612-625. [https://doi.org/ https://doi.org/10.1111/ppa.12445](https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.12445)
- Koyyappurath, S., Conéjéro, G., Dijoux, J., Lapeyre-Montès, F., Jade, K., Chiroleu, F., Gatineau, F., Verdeil, J., Besse, P., & Grisoni, M. (2015b). Differential responses of

- vanilla accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01125>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual [Fotografía]*. Blackwell Publishing.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández Hernández, J., Kim, S.-C., & Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2), 127-138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Ma, L.-J., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., Manners, J., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Mata, G., Silencio, L., González, M., Almaguer, V., Espinosa, R., Karla, V., Ortiz, B., & Fajardo, F. (2007). *Agricultura con sabor cítrico y aroma de vainilla en la región del Totonacapan*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Nelson, P., Toussoun, T., & Cook, R. (1982). General ecology of the fusaria. En *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy* (págs. 225-235). Pennsylvania State University Press.
- Odoux, E. (2000). Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits*, 55(2), 119-125.
- Odoux, E., & Grisoni, M. (2010). *Vanilla Curing en E. Odoux (Ed.), Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. CRC Press.

- Pinaria, A., Liew, E., & Burgess, L. (2010). *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology*, 39(2), 176-183. <https://doi.org/10.1071/ap09079>
- Priefert, H., Rabenhorst, J., & Steinbüchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 296–314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002530100687>
- Rain, P., & Lubinsky, P. (2010). *Vanilla Use in Colonial Mexico and Traditional Totonac Vanilla Farming en E. Odoux (Ed.), Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. CRC Press.
- Reyes-López, D., Flores-Jiménez, A., Huerta-Lara, M., Kelso-Bucio, H. A., Avendaño-Arrazate, C. H., Lobato-Ortiz, R., Aragón-García, A., & López-Olguín, J. F. (2014). Variación morfológica de fruto y semilla en cuatro especies del género *Vanilla*. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 205-218.
- Rodríguez López, T. (2016). *La vainilla (Vanilla planifolia): perfume y sabor de México que conquistó al mundo: II: Usos y cultivo*. Ensayos Desde el Herbario CICY 2016: https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2016/2016-06-23-Rodriguez-Lopez-La-vainilla-II.pdf
- Santillán Fernández, A., Salas Zúñiga, A., & Vásquez Bautizta, N. (2018). La productividad de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en México de 2003 a 2014. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(47), 50-69.
- Santillán Mendoza, R. (2018). Análisis filogenético, patogénico y diversidad genética de especies de *Fusarium* asociadas a malformación de caoba de hoja grande (*Swietenia macrophylla*). *Tesis de doctorado*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/3736
- Santillán-Fernández, A., Trejo Cabrera, M., Martínez Sánchez, A., Martínez Ángel, L., Vásquez Bautista, N., & Luis Mejía, S. (2020). Potencial productivo de *Vanilla*

- planifolia* Jacks en el Totonacapan, México, mediante técnicas geográficas [Mapa]. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 789-802. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1661>
- Schrader, J., Etschmann, M., Sell, D., Hilmer, J.-M., & Rabenhorst, J. (2004). Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds –. *Biotechnology Letters*, 26(6), 463–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019576.80594.0e>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). *Cultivos estratégicos con potencial de mercado. Vainilla Mexicana. Planeación Agrícola Nacional (2017-2030)*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/cultivos-estrategicos-con-potencial-de-mercado>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Srivastava, S., Kadooka, C., & Uchida, J. Y. (2018). *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiological Research*, 207, 118-195. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.002>
- Syngenta. (2021). *Bravo 720*. Syngenta: https://www.syngenta.com.ec/sites/g/files/zhg486/f/ec_ficha_tecnica_bravo_720_sc_dic17.pdf?token=1535984274
- Syngenta. (2021). *Bravo 720 [Tabla]*. Syngenta: https://www.syngenta.com.ec/sites/g/files/zhg486/f/ec_ficha_tecnica_bravo_720_sc_dic17.pdf?token=1535984274
- Tipparaju, S., Ravishankar, S., & Slade, P. J. (2004). Survival of *Listeria monocytogenes* in Vanilla-Flavored Soy and Dairy Products Stored at 8°C. *Journal of Food Protection*, 67(2), 378-382. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.2.378>

- Vargas Hernández, J., & Gámez Vázquez, H. (2014). *Producción de Vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina*. Autoediciones del Potosí S.A. de C.V. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/994.pdf>
- Vega, M., Hernández, M., Herrera-Cabrera, B., & Wegier, A. (2020). *Vanilla planifolia (amended version of 2017 assessment)*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T103090930A172970359.en>

Anexos

Anexo I. Mapas de los sitios de colecta de vainillas con pudrición.

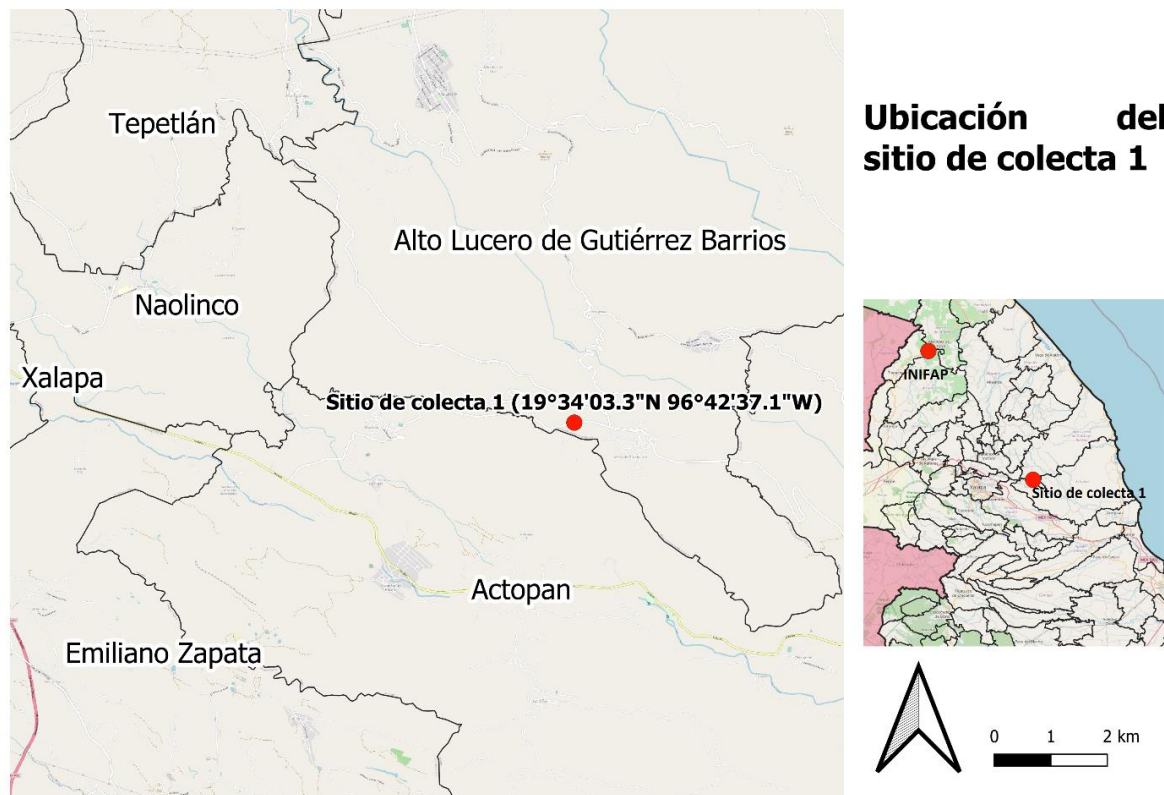


Figura 11. Ubicación del sitio de colecta 1: Alto Lucero de Gutiérrez Barrios. El sitio de colecta 1 se localiza en la comunidad Mesa de Guadalupe perteneciente al municipio de Alto Lucero de Gutiérrez Barrios, en las coordenadas $19^{\circ}34'03.3''$ N y $96^{\circ}42'37.1''$ W, a una altura de 879 m sobre el nivel del mar. Elaborado a partir de información del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI, 2021).

De acuerdo con el Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Veracruz (CEIEG, 2021a), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido subhúmedo con lluvias en verano (67%) y cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (15%), semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (9%), semicálido húmedo con lluvias todo el año (8%) y templado húmedo con abundantes lluvias en verano (1%), además, el rango de temperatura va de 14 a 26°C , mientras que el rango de precipitación va de 1100 a 1600 mm.



Figura 12. Ubicación del sitio de colecta 2: Tlapacoyan. El sitio de colecta 2 fue el Banco de Germoplasma de Vainilla de INIFAP CEIXTA, se localiza en la comunidad de Rojo Gómez perteneciente al municipio de Tlapacoyan, en las coordenadas 20°02'35.8" N y 97°05'48.2" W, a una altura de 97 m sobre el nivel del mar. Elaborado a partir de INEGI, 2021.

De acuerdo con CEIEG (2021g), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido húmedo con lluvias todo el año (48%), semicálido húmedo con lluvias todo el año (40%) y cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (12%), además, el rango de temperatura va de 22 a 24°C y el rango de precipitación va de 1900 a 3600 mm.

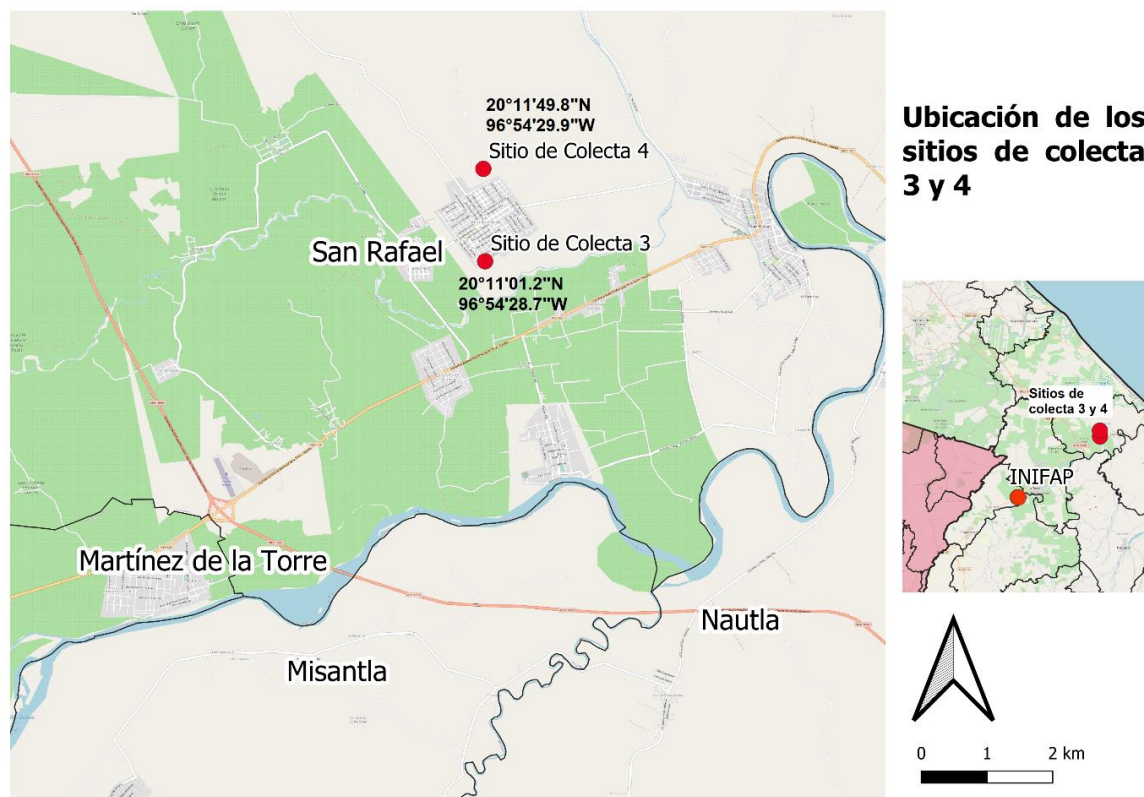


Figura 13. Ubicación del sitio de colecta 3 y 4: San Rafael. Los sitios de colecta 3 y 4 se localizan en la comunidad Puntilla Aldama perteneciente al municipio de San Rafael, el sitio de colecta 3 se ubica en las coordenadas 20°11'01.2" N y 96°54'28.7" W a una altura de 19 m sobre el nivel del mar, el sitio de colecta 4 se ubica en las coordenadas 20°11'49.8" N y 96°54'29.7" W a una altura de 13 m sobre el nivel del mar. Elaborado a partir de INEGI, 2021.

De acuerdo con CEIEG (2021e), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (98%) y cálido subhúmedo con lluvias en verano (2%)., además, el rango de temperatura va de 24 a 26°C y el rango de precipitación va de 1400 a 1600 mm.

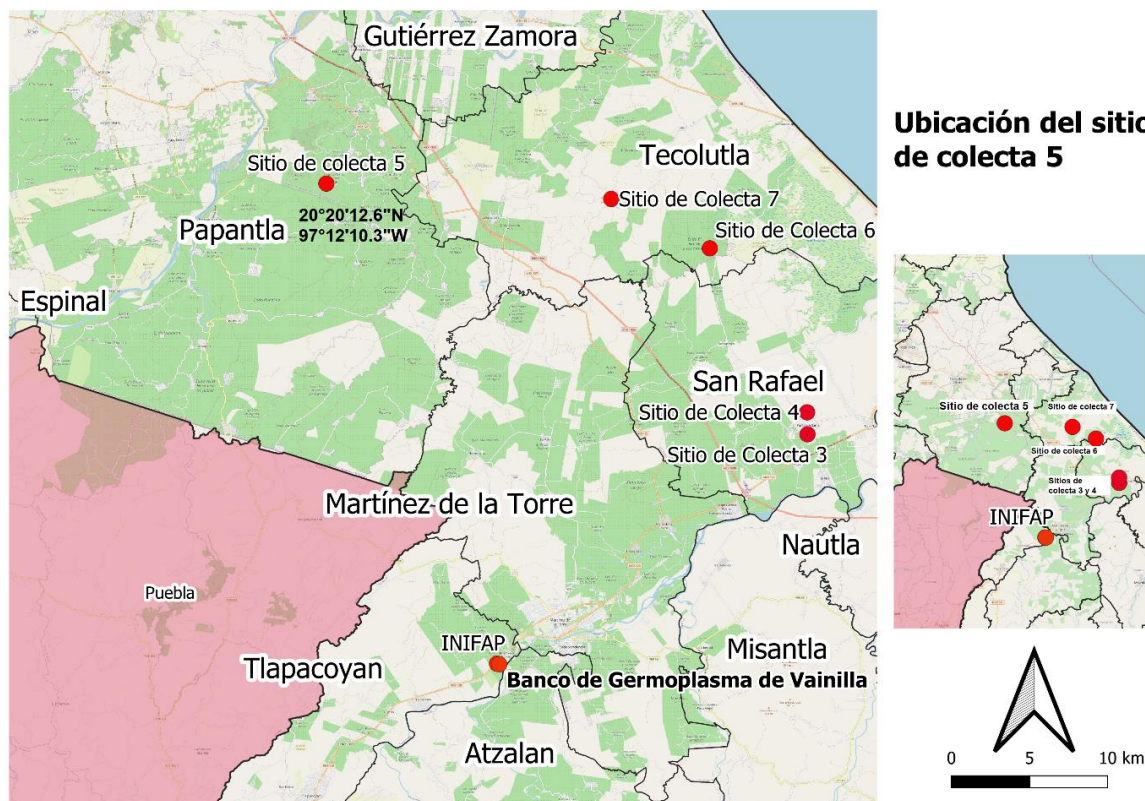


Figura 14. Ubicación del sitio de colecta 5: Papantla. El sitio de colecta 5 se localiza en la comunidad de Solteros de Juan Rosas perteneciente al municipio de Papantla, en las coordenadas $20^{\circ}20'12.6''N$ y $97^{\circ}12'10.3''W$, a una altura de 201 m sobre el nivel del mar. Elaborado a partir de INEGI, 2021.

De acuerdo con CEIEG (2021d), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (40%), cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (32%) y cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (28%), además, el rango de temperatura va de 24 a $26^{\circ}C$ y el rango de precipitación va de 1100 a 1600 mm.

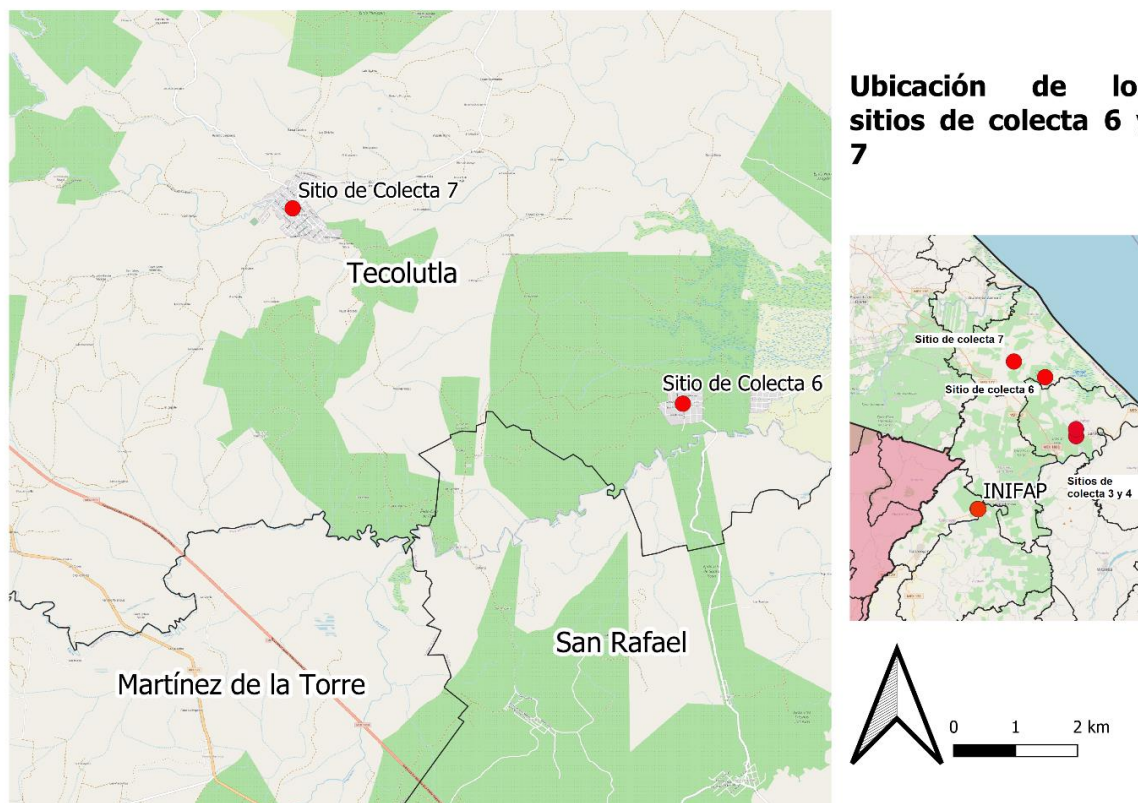


Figura 15. Ubicación del sitio de colecta 6 y 7: Tecolutla. Los sitios de colecta 6 y 7 se localizan en las comunidades de Fuerte de Anaya y Hueytepec, respectivamente, ambas pertenecientes al municipio de Tecolutla, el sitio de colecta 6 se ubica en las coordenadas $20^{\circ}17'53.3''N$ $96^{\circ}58'03.7''W$ a una altura de 20 m sobre el nivel del mar, el sitio de colecta 7 se ubica en las coordenadas $20^{\circ}19'35.1''N$ $97^{\circ}01'40.1''W$ a una altura de 30 m sobre el nivel del mar. Elaborado a partir de INEGI, 2021.

De acuerdo con CEIEG (2021f), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (98%) y cálido subhúmedo con lluvias en verano (2%), además, el rango de temperatura va de 24 a 26°C y el rango de precipitación va de 1400 a 1600 mm.

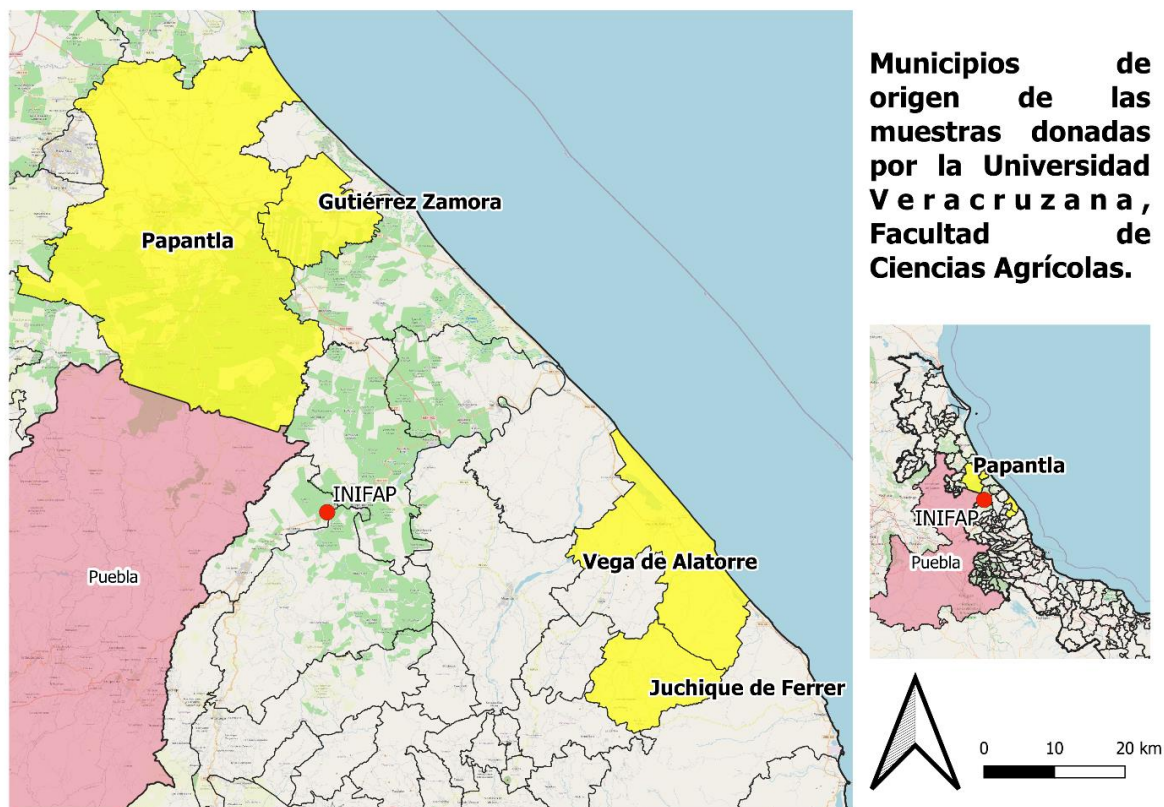


Figura 16. Municipios de origen de muestras donadas por la Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas. Xalapa. Los municipios de origen de las cepas proporcionadas por la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UV se encuentran ubicados entre los paralelos $19^{\circ} 44' N$ y $20^{\circ} 41' N$ y los meridianos $96^{\circ} 31' W$ y $97^{\circ} 32' W$ y a una elevación desde el nivel del mar hasta los 1900 m. Elaborado a partir de INEGI, 2021.

Los datos climáticos de los anteriores municipios son:

Juchique de Ferrer: De acuerdo con CEIEG (2021c), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: semicálido húmedo con lluvias todo el año (92%), cálido húmedo con lluvias todo el año (5%) y cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (3%), además, el rango de temperatura va de 16 a $24^{\circ}C$ y el rango de precipitación va de 1500 a 2000 mm.

Vega de Alatorre: De acuerdo con CEIEG (2021h), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano

(56%), cálido subhúmedo con lluvias en verano (33%), cálido húmedo con lluvias todo el año (8%) y semicálido húmedo con lluvias todo el año (3%), además, el rango de temperatura va de 22 a 26°C y el rango de precipitación va de 1400 a 2100 mm.

Gutiérrez Zamora: De acuerdo con CEIEG (2021b), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (96%) y cálido subhúmedo con lluvias en verano (4%), además, el rango de temperatura va de 24 a 26°C y el rango de precipitación va de 1100 a 1600 mm.

Papantla: De acuerdo con CEIEG (2021d), la proporción de los tipos de climas que se encuentran en la región es la siguiente: cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (40%), cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (32%) y cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (28%), además, el rango de temperatura va de 24 a 26°C y el rango de precipitación va de 1100 a 1600 mm.

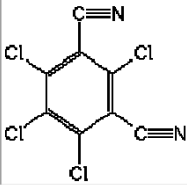
Anexo II. Fichas técnicas.

Fungicida: Clorotalonil (Tetracloroisofталонitrilo)

El fungicida utilizado durante el presente proyecto fue Clorotalonil (Tetracloroisofталонitrilo), conocido comercialmente como “BRAVO 720”, elaborado por AMVAC (American Vanguard Company), se sabe que su eficacia se debe a que “inhibe el proceso de respiración (conversión de carbohidratos en energía) de las células del hongo mediante un enlace rápido de las moléculas de Clorotalonil con grupos sulfidrilos” (Syngenta, 2021), esto gracias a que su mecanismo de acción es estimular la “conjugación y disminución de tioles, en particular del glutatión procedente de las células fungosas germinativas, llevando a la interrupción de la glicólisis y producción de energía, lo que termina en la muerte del hongo” (Syngenta, 2021).

Tabla 3

Clorotalonil: Generalidades.

2. GENERALIDADES	
Ingredientes Activos:	Chlorothalonil
Nombre Químico (IUPAC)*	Tetrachloroisophthalonitrile
Formulación:	Suspensión Concentrada
Concentración:	720 g/l de Chlorothalonil
Nombre Comercial:	BRAVO® 720 SC
Fórmula Estructural:	Chlorothalonil 
Fórmula Empírica:	C ₈ Cl ₄ N ₂
Peso Molecular:	265.89
Grupo Químico:	Cloronitrilo

*IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Tomado de Syngenta (2022)


	INGREDIENTE ACTIVO:	% EN PESO
	Clorotalonil: Tetracloroisoflato-nitrilo (Equivalente a 720 g de i.a./ L a 20°C)	54.0
	INGREDIENTES INERTES:	
	Diluyente, dispersante, antiespumante, estabilizador, y compuestos relacionados.	46.0
	TOTAL	100.0
	CONTENIDO NETO:	

Figura 17. Presentación y composición del fungicida Bravo 720. Elaborado a partir de AMVAC, 2022 y Agrizon, 2022.

Antibiótico (Estrepto LER Extra Forte)

Durante el presente proyecto de investigación, con el propósito de evitar la contaminación bacteriana en los medios de cultivos se utilizó una combinación antibiótica de Penicilina, Estreptomina y Dicloxacilina, la cual es conocida comercialmente con el nombre de “Espstrepto LER Extra Forte 4MUI” y elaborada por “Adler Animal Health”, y tal y como se indica en la ficha técnica del producto está indicada para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos como: *Estreptococos*, *Neumococos*, *Estafilococos*, *Corynebacterium*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Klebsiella* (Adler Pharma, 2021).



Fórmula 

Frasco con polvo estéril con 8 g contienen:

Penicilina G benzatina.....	2'700,000 UI
Penicilina G procaína.....	1'300,000 UI
Estreptomina sulfato.....	2.6 g
Dicloxacilina sódica.....	133 mg
Diclofenaco sódico.....	60 mg

Frasco con diluyente estéril contiene:

Clorfeniramina maleato.....	31 mg
Metamizol sódico.....	633 mg
Guaifenesina.....	307 mg
Ascorbato de sodio (Vitamina C).....	393 mg
Vehículo c.b.p.....	20 mL

Figura 18. Presentación comercial del antibiótico Estrepto LER Extra Forte 4MUI. Presentación y fórmula del antibiótico, en el frasco oscuro se encuentra el diluyente y en el frasco blanco el polvo estéril con los antibióticos. Elaborado a partir de (Adler Pharma, 2021).

Anexo III. Colección de aislados**Colección de aislados de *Fusarium* spp.**

Tabla 4

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 1

Todas las cepas			
Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF01 a	3a IXBGDR	0%	Banco de Germoplasma
IXF02 a	1b TTXSR	75%-100%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF03 a	1a FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF04 a	5a IXIJFAT	-	Fuerte de Anaya, Tecolutla
IXF05 a	4a IXBGDR	0%	Banco de Germoplasma
IXF06 a	3b IXBGDF	0%	Banco de Germoplasma
IXF07 a	3a TTXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF08 a	13a FAIXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF09 a	5a1 IXBGDF	0%	Banco de Germoplasma
IXF10 a	3b IXBGDR	0%	Banco de Germoplasma
IXF11 a	1b FAIXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF12 a	13b IXAL	50%-75%	Alto Lucero, Veracruz

Tabla 5

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 2

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF13 a	3b TTIXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF14 a	3a IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF15 a	3a3 IXBGDF	0%	Banco de Germoplasma
IXF16 a	5b IXIJFAT	-	Fuerte de Anaya, Tecolutla
IXF17 a	5b IXBGDR	75%-100%	Banco de Germoplasma
IXF18 a	5b IXBGDF	0%	Banco de Germoplasma
IXF19 a	10 IXPA	-	Papantla, Veracruz
IXF20 a	13a IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF21 a	N9 IXXN	0%	Recibidas de Xalapa
IXF22 a	5a IXBGDR	0%	Banco de Germoplasma
IXF23 a	5c IXBGDR	0%	Banco de Germoplasma
IXF24 a	11c IXAL	0%	Alto Lucero, Veracruz
IXF25 a	12 FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF26 a	V7MHP IXXN	75%-100%	Recibidas de Xalapa
IXF27 a	9 FAIXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael

Tabla 6

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 3

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF28 a	HG3P2 IXXN	50%-75%	Recibidas de Xalapa
IXF29 a	9b IXAL	50%-75%	Alto Lucero, Veracruz
IXF30 a	V3M IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF31 a	JP IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF32 a	HG3P1 IXXN	50%-75%	Recibidas de Xalapa
IXF33 a	5 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF34 a	2a IXIJHT	-	Hueytepec, Tecolutla
IXF35 a	6 IXPA	-	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF36 a	1a IXIJFAT	-	Fuerte de Anaya, Tecolutla
IXF37 a	13b FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF38 a	6a FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF39 a	8b TTIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF40 a	10a FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF41 a	4a IXAL	<25%	Alto Lucero, Veracruz
IXF42 a	4b IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz

Tabla 7

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 4

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF43 a	2PSF IXBGDF	25%-50%	Banco de Germoplasma
IXF44 a	10b FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF45 a	JF13 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF46 a	1PSF IXBGDF	75%-100%	Banco de Germoplasma
IXF47 a	14 FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF48 a	H3 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF49 a	Raíz U1(H2) IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF50 a	8a IXAL	25%-50%	Alto Lucero, Veracruz
IXF51 a	8b IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF52 a	3b IXIJFAT	-	Fuerte de Anaya, Tecolutla
IXF53 a	11a IXAL	0%	Alto Lucero, Veracruz
IXF54 a	17MP IXXN	-	Recibidas de Xalapa
IXF55 a	7a IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF56 a	8c IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF57 a	9a IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz

Tabla 8

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 5

Código de almacenamiento final	Código de almacenamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF58 a	5b TTIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF59 a	3b IXAL	25%-50%	Alto Lucero, Veracruz
IXF60 a	4 TTIXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF61 a	12a IXPA	-	Papantla, Veracruz
IXF62 a	12b IXPA	-	Papantla, Veracruz
IXF63 a	6b FAIXSR	75%-100%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF64 a	412 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF65 a	1 IXAL	<25%	Alto Lucero, Veracruz
IXF66 a	4 FAIXSR	75%-100%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF67 a	6c FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF68 a	5a2 IXBGDF	<25%	Banco de Germoplasma
IXF69 a	Fus1C7 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Gutierrez Zamora)
IXF70 a	Fus2C2 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Gutierrez Zamora)

Tabla 9

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 6

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF71 a	JF8 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Juchique de Ferrer)
IXF72 a	JF18 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Juchique de Ferrer)
IXF73 a	JF13 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Juchique de Ferrer)
IXF74 a	JF621 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Juchique de Ferrer)
IXF75 a	JF911 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Juchique de Ferrer)
IXF76 a	H4 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Papantla)
IXF77 a	H12 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Papantla)
IXF78 a	HG3C4 IXXADF	-	Recibidas de Xalapa (Papantla)
IXF79 a	V9M IXXNDF	-	Recibidas de Xalapa (Vega de Alatorre)
IXF80 a	1a IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF81 a	1b IXIJ2	-	Papantla, Veracruz

Tabla 10

Colección de aislados de Fusarium spp. Parte 7

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de Virulencia	Lugar de procedencia
IXF82 a	2a IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF83 a	2b IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF84 a	3a IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF85 a	3b IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF86 a	6a IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF87 a	6b IXIJ2	-	Papantla, Veracruz
IXF88 a	7a IXIJ2	-	Papantla, Veracruz

Colección de aislados de *Fusarium* spp. Cepas resistentes a Clorotalonil

Tabla 11

Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 1

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de virulencia	Lugar de procedencia
IXF01 b	11c IXAL	0%	Alto Lucero, Veracruz

Tabla 12

Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 2

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de virulencia	Lugar de procedencia
IXF02 b	12 FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF03 b	V7MHP IXXN	75%-100%	Recibidas de Xalapa
IXF04 b	9 FAIXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF05 b	HG3P2 IXXN	50%-75%	Recibidas de Xalapa
IXF06 b	9b IXAL	50%-75%	Alto Lucero, Veracruz
IXF07 b	V3M IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF08 b	JP IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF09 b	HG3P1 IXXN	50%-75%	Recibidas de Xalapa
IXF10 b	5 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF11 b	2a IXIJHT	-	Hueytepec, Tecolutla
IXF12 b	6 IXPA	-	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF13 b	1a IXIJFAT	-	Fuerte de Anaya, Tecolutla

Tabla 13

Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 3

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de virulencia	Lugar de procedencia
IXF14 b	13b FAIXSR	25%-50%	Alto Lucero, Veracruz
IXF15 b	6a FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF16 b	8b TTIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF17 b	10a FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF18 b	4a IXAL	<25%	Alto Lucero, Veracruz
IXF19 b	4b IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF20 b	2PSF IXBGDF	25%-50%	Banco de Germoplasma
IXF21 b	10b FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF22 b	JF13 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF23 b	1PSF IXBGDF	75%-100%	Banco de Germoplasma
IXF24 b	14 FAIXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF25 b	H3 IXXA	-	Recibidas de Xalapa

Tabla 14

Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 4

Código de almacenamiento final	Código de procesamiento en el Laboratorio	Nivel de virulencia	Lugar de procedencia
IXF26 b	Raíz U1(H2) IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF27 b	8a IXAL	25%-50%	Alto Lucero, Veracruz
IXF28 b	8b IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF29 b	3b IXIJFAT	-	Fuerte de Anaya, Tecolutla
IXF30 b	11a IXAL	0%	Alto Lucero, Veracruz
IXF31 b	17MP IXXN	-	Recibidas de Xalapa
IXF32 b	7a IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF33 b	8c IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF34 b	9a IXAL	75%-100%	Alto Lucero, Veracruz
IXF35 b	5b TTXSR	<25%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF36 b	3b IXAL	25%-50%	Alto Lucero, Veracruz
IXF37 b	4 TTXSR	0%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF38 b	12a IXPA	-	Papantla, Veracruz

Tabla 15

Colección de cepas resistentes a Clorotalonil. Parte 5

IXF39 b	12b IXPA	-	Papantla, Veracruz
IXF40 b	6b FAIXSR	75%-100%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF41 b	412 IXXA	-	Recibidas de Xalapa
IXF42 b	1 IXAL	<25%	Alto Lucero, Veracruz
IXF43 b	4 FAIXSR	75%-100%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF44 b	6c FAIXSR	25%-50%	Puntilla Aldama, San Rafael
IXF45 b	5a2 IXBGDF	<25%	Banco de Germoplasma

En esta colección a las cepas se les asignó su código en orden de menor a mayor resistencia a Clorotalonil, siendo la cepa IXF45b la que más proliferó en presencia de este.

Anexo IV. Preparación de medios de cultivo.

Preparación de medio de cultivo: Agar Papa Dextrosa deshidratado (PDA).

1. Usualmente se preparó medio PDA en cantidades de 300 ml.
2. Se enjuagaron y dejaron secar los materiales a utilizar (matraz Erlenmeyer de 500 ml, probeta de 500 ml, mosca magnética).
3. Con agua estéril la probeta se aforó a 300 ml y posteriormente se vertió en el matraz.
4. En la balanza analítica se pesaron 11.7 g de PDA deshidratado (MDC LAB).
5. Antes de verter el agar al matraz, este se llevó a un previo calentamiento y agitación, con el fin de evitar la formación de grumos.
6. Una vez disuelto el agar, se selló la boca del matraz con papel aluminio y se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 40 min.
7. Al sacar de la autoclave se dejó enfriar antes de llevar a la campana de flujo laminar.
8. La campana de flujo laminar fue asperjada con alcohol al 70%, se encendió el flujo de aire y se colocaron los materiales a manejar dentro de esta, todo lo que entró a la campana durante el procedimiento tenía que ser asperjado con alcohol (micropipeta, microtubo con el antibiótico, tubo cónico con el fungicida, bolsa de cajas Petri y matraz con el medio).
9. Cuando el matraz disminuyó su temperatura lo suficiente para ser tolerado en mano, se adicionó con ayuda de la micropipeta 2 µl de Estrepto LER Extra Forte 4MUI por cada ml de medio, para disolver el antibiótico, la agitación del medio fue sin despegar el matraz de la base de la campana, con movimientos rápidos pero cuidando no generar burbujas, posteriormente, se adicionó el Clorotalonil en proporción de 1 µl por ml de medio y se repitió el procedimiento de agitación.

10. El medió se vertió en cajas Petri, mismas que estuvieron abiertas aproximadamente 10 min o hasta su gelificación, posteriormente, las cajas se guardaron en bolsas para ser llevadas al refrigerador a 4°C para su posterior uso.

Tabla 16

Reactivos para la Preparación de Medio Agar Papa Dextrosa (PDA)

Ingredientes	Cantidad por preparar	
	300 ml	1000 ml
PDA deshidratado (MDC LAB)	11.7 g	39 g
Estrepto LER Extra Forte 4MUI	600 µl	2 ml
Clorotalonil	300 µl	1 ml

Modificado de Cuadro 2. Ingredientes para preparar medio agar papa dextrosa, de Santillán Mendoza, R. (2018, p. 95).

Preparación de medio de cultivo: Agar Peptona Clorotalonil (PCA).

1. Usualmente se preparó medio PCA en cantidades de 300 ml.
2. Se enjuagaron y dejaron secar los materiales a utilizar (matraz Erlenmeyer de 500 ml, probeta de 500 ml, mosca magnética).
3. Con agua estéril la probeta se aforó a 280 ml y posteriormente se vertió en el matraz.
4. En la balanza analítica se pesaron todos los ingredientes.
5. El matraz se llevó a agitación y se agregaron todos los ingredientes de acuerdo con el orden en la tabla.
6. La mezcla de compuestos se aforo a 300 ml y, utilizando calor y agitación, se adicionó el agar para evitar la formación de grumos.

7. Una vez disuelto el agar, se selló la boca del matraz con papel aluminio y se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 40 min.
8. Al sacar de la autoclave se dejó enfriar antes de llevar a la campana de flujo laminar.
9. La campana de flujo laminar fue asperjada con alcohol al 70%, se encendió el flujo de aire y se colocaron los materiales a manejar dentro de esta, todo lo que entró a la campana durante el procedimiento tenía que ser asperjado con alcohol (micropipeta, microtubo con el antibiótico, tubo cónico con el fungicida, bolsa de cajas Petri y matraz con el medio).
10. Cuando el matraz disminuyó su temperatura lo suficiente para ser tolerado en mano, se adicionó con ayuda de la micropipeta Clorotalonil en proporción de 1 µl por ml de medio, para disolver el fungicida, la agitación del medio fue sin despegar la base del matraz de la campana, con movimientos rápidos, pero cuidando no generar burbujas, posteriormente, se adicionó el 2 µl de Estrepto LER Extra Forte 4MUI por cada ml de medio y se repitió el procedimiento de agitación.
11. El medió se vertió en cajas Petri, mismas que estuvieron abiertas aproximadamente 10 min o hasta su gelificación, posteriormente, las cajas se guardaron en bolsas para ser llevadas al refrigerador a 4°C para su posterior uso.

Tabla 17

Reactivos para la Preparación de Medio Agar Peptona Clorotalonil (PCA). Parte 1

Orden	Ingredientes	Cantidad por preparar	
		300 ml	1000 ml
1	KH ₂ PO ₄	0.3 g	1 g
2	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15 g	0.5 g
3	Peptona de Caseína (MDC LAB)	4.5 g	15 g
4	Agar bacteriológico (MDC LAB)	6 g	20 g

Tabla 18

Reactivos para la Preparación de Medio Agar Peptona Clorotalonil (PCA). Parte 2

Orden	Ingredientes	Cantidad por preparar	
		300 ml	1000 ml
5	Clorotalonil	300 µl	1 ml
6	Estrepto LER Extra Forte 4MUI	600 µl	2 ml

Modificado de Cuadro 3. Ingredientes para preparar medio agar peptona PCNB, de Santillán Mendoza, R. (2018, p. 97).

Preparación de medio de cultivo: Agar agua.

1. Usualmente se preparó medio agar agua en cantidades de 300 ml.
2. Se enjuagaron y dejaron secar los materiales a utilizar (matraz Erlenmeyer de 500 ml, probeta de 500 ml, mosca magnética).
3. Con agua estéril la probeta se aforó a 300 ml y posteriormente se vertió en el matraz.
4. En la balanza analítica se pesaron 6 g de agar bacteriológico (MDC LAB).
5. Antes de verter el agar al matraz, este se llevó a un previo calentamiento y agitación, con el fin de evitar la formación de grumos.
6. Una vez disuelto el agar, se selló la boca del matraz con papel aluminio y se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 40 min.
7. Al sacar de la autoclave se dejó enfriar antes de llevar a la campana de flujo laminar.
8. La campana de flujo laminar fue asperjada con alcohol al 70%, se encendió el flujo de aire y se colocaron los materiales a manejar dentro de esta, todo lo que entró a la campana

durante el procedimiento tenía que ser asperjado con alcohol (micropipeta, microtubo con el antibiótico, tubo cónico con el fungicida, bolsa de cajas Petri y matraz con el medio).

9. Cuando el matraz disminuyó su temperatura lo suficiente para ser tolerado en mano, se adicionó con ayuda de la micropipeta 2 μ l de Estrepto LER Extra Forte 4MUI por cada ml de medio, para disolver el antibiótico, la agitación del medio fue sin despegar el matraz de la base de la campana, con movimientos rápidos pero cuidando no generar burbujas.

10. El medió se vertió en cajas Petri, mismas que estuvieron abiertas aproximadamente 10 min o hasta su gelificación, posteriormente, las cajas se guardaron en bolsas para ser llevadas al refrigerador a 4°C para su posterior uso.

Tabla 19

Reactivos para la Preparación de Medio Agar Agua

Ingredientes	Cantidad por preparar	
	300 ml	1000 ml
Agar bacteriológico (MDC LAB)	6 g	20 g
Estrepto LER Extra Forte 4MUI	600 μ l	2 ml

Elaborado a partir de Santillán Mendoza, R. (2018, p.99)

Preparación de medio de cultivo: Agar SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar).

1. Usualmente se preparó medio SNA en cantidades de 300 ml.
2. Se enjuagaron y dejaron secar los materiales a utilizar (matraz Erlenmeyer de 500 ml, probeta de 500 ml, mosca magnética).
3. Con agua estéril la probeta se aforó a 280 ml y posteriormente se vertió en el matraz.
4. En la balanza analítica se pesaron todos los ingredientes.

5. El matraz se llevó a agitación y se agregaron todos los ingredientes de acuerdo con el orden en la tabla.
6. La mezcla de compuestos se aforo a 300 ml y, utilizando calor y agitación, se adicionó el agar para evitar la formación de grumos.
7. Una vez disuelto el agar, se selló la boca del matraz con papel aluminio y se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 40 min.
8. Al sacar de la autoclave se dejó enfriar antes de llevar a la campana de flujo laminar.
9. La campana de flujo laminar fue asperjada con alcohol al 70%, se encendió el flujo de aire y se colocaron los materiales a manejar dentro de esta, todo lo que entró a la campana durante el procedimiento tenía que ser asperjado con alcohol (micropipeta, microtubo con el antibiótico, tubo cónico con el fungicida, bolsa de cajas Petri y matraz con el medio).
10. Cuando el matraz disminuyó su temperatura lo suficiente para ser tolerado en mano, se adicionó con ayuda de la micropipeta 2 µl de Estrepto LER Extra Forte 4MUI por cada ml de medio, para disolver el antibiótico, la agitación del medio fue sin despegar el matraz de la base de la campana, con movimientos rápidos pero cuidando no generar burbujas.
11. El medió se vertió en cajas Petri, mismas que estuvieron abiertas aproximadamente 10 min o hasta su gelificación, posteriormente, las cajas se guardaron en bolsas para ser llevadas al refrigerador a 4°C para su posterior uso.

Tabla 20

Reactivos para la Preparación de Medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). Parte 1

Orden	Ingredientes	Cantidad por preparar	
		300 ml	1000 ml
1	KH ₂ PO ₄	0.3 g	1 g
2	KNO ₃	0.3 g	1 g

Tabla 21

Reactivos para la Preparación de Medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). Parte 2

3	KCl	0.15 g	0.5 g
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15 g	0.5 g
5	Glucosa	0.06 g	0.2 g
6	Sacarosa	0.06 g	0.2 g
7	Agar bacteriológico (MDC LAB)	6 g	20 g

Modificado de Cuadro 4. Ingredientes para preparar medio SNA, de Santillán Mendoza, R. (2018, p. 98).