

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**“DINÁMICA TEMPORAL DE *Fusarium* spp.
ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA
(*Vanilla planifolia* Jacks.), EN LA REGIÓN DEL
TOTONACAPAN, VERACRUZ”**

HÉCTOR GONZÁLEZ REYES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Ing. Héctor González Reyes, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis DINÁMICA TEMPORAL DE Fusarium spp. ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA (Vanilla planifolia Jacks.), EN LA REGIÓN DEL TONACAPAN, VERACRUZ

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 12 de Noviembre de 2018



Firma del
Alumno (a)



Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **“Dinámica Temporal de *Fusarium* spp. Asociado a la Marchitez de la Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.), en la Región del Totonacapan, Veracruz”** realizada por el alumno **“Héctor González Reyes”**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



DRA. MARÍA DEL PILAR RODRÍGUEZ GUZMAN

ASESOR (A)



DRA. MARÍA DE JESÚS YÁÑEZ MORALES

ASESOR



DR. JOSÉ ALBERTO SALVADOR ESCALANTE ESTRADA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2018.

DINÁMICA TEMPORAL DE *Fusarium* spp. ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks.), EN LA REGIÓN DEL TOTONACAPAN, VERACRUZ

Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

El cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia*) es una actividad de importancia económica para el trópico húmedo en México y la región del Totonacapan es la principal zona productora a nivel nacional. Uno de los problemas que limita la producción es la marchitez de la vainilla causada por *Fusarium oxysporum*. Los estudios en aspectos epidemiológicos aún están incipientes y por tal razón se llevó a cabo ésta investigación con el objetivo de conocer la dinámica temporal de la enfermedad en relación a la fenología del cultivo y las condiciones climatológicas. Se eligieron tres vainillales de cinco años de edad ya establecidos bajo sistema de manejo rústico (SR), sistema convencional (SC) y tutor naranjo (STN). Se seleccionaron 30 plantas en cada plantación y se evaluó densidad de inóculo (DI=cantidad de propágulos g⁻¹ de suelo de rizósfera), incidencia y severidad en raíces; del hospedante se cuantificó el número de entrenudos, hojas, frutos y se midió longitud de tallos durante el periodo mayo a diciembre de 2016. Se registró la temperatura del ambiente, humedad relativa y precipitación pluvial de la zona. En el ciclo febrero a diciembre de 2017, se dio continuidad a las evaluaciones sólo para el sistema convencional y al inicio de la floración se hizo una aplicación única de lombricomposta, *Trichoderma* sp. nativo, caldo bordelés, lombricosposta+*Trichoderma* sp. y un testigo y se evaluó su efecto sobre el comportamiento de la enfermedad. En el periodo mayo a diciembre 2016, la densidad de inóculo, incidencia y severidad alcanzaron niveles máximos durante las etapas de amarre y desarrollo de frutos. El progreso temporal de la DI e incidencia fue descrito por el modelo monomolecular. La DI presentó tasas de incremento (r_M) 0.005, 0.006 y 0.023 generando epidemias significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) en los tres sistemas de manejo. La incidencia se ajustó al modelo con tasas de crecimiento (r_M) 0.005, 0.005 y 0.006 para los huertos SR, SC y STN respectivamente y las epidemias fueron estadísticamente iguales sólo entre el SR y SC. La severidad más frecuente fue de clase 4 (38%) y la comparación de índices de severidad y ABCPE mostraron diferencias significativas entre SC-STN y SR-STN. Las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante se ajustaron al modelo logístico en los tres sistemas de producción y sólo la biomasa fue significativamente diferente en los tres sistemas. De los tres huertos, el SR presentó el mayor porcentaje de caída de hojas (14.9%) y frutos (62.5%). En los ciclos mayo 2016 a diciembre 2017, el progreso temporal de la DI e incidencia fue descrito por el modelo monomolecular. La DI presentó la mayor tasa de incremento ($r_M=0.011$) en el ciclo 2017 y su comparación arrojó diferencias estadísticas entre ciclos. La incidencia fue estadísticamente igual para ambos ciclos; la severidad más frecuente fue de clase 3 (18%) y el mayor índice de severidad (32.6%) se presentó en el ciclo 2017 sin diferencias estadísticas. Las variables del hospedante se ajustaron al modelo logístico con tasas de crecimiento más altas en el 2017 y mediante la comparación, todas fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). De los cinco tratamientos aplicados en este periodo, sólo el T5 (lombricomposta) tuvo un efecto significativo en la severidad de raíces. El ciclo 2016 obtuvo el mayor porcentaje de caída de hojas y frutos por amarillamiento y pudrición. Se obtuvieron 40 aislamientos en total e identificados morfológicamente como pertenecientes al género *Fusarium*. Seis aislamientos de *Fusarium* fueron los más frecuentes y abundantes, dos se aislaron en mayor porcentaje y se identificaron morfológicamente como *F.oxysporum* (31.6%) y *F.solani* (19.5%). Ambos patógenos se inocularon en condiciones contraladas de temperatura a 25°C, con humedad constante del suelo y en base a los resultados se determinó que el agente causal de la enfermedad marchitez fue *F. oxysporum*.

Palabras clave: Epidemiología, modelos de crecimiento, vainilla, *Fusarium oxysporum*, severidad.

**TEMPORAL DYNAMIC OF *Fusarium* spp. ASSOCIATED WITH THE WILT
VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks), IN THE TONACAPAN REGION,
VERACRUZ**

**Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018**

ABSTRACT

The cultivation of vanilla (*Vanilla planifolia*) is an activity of economic importance in the humid tropics in Mexico, and the Totonacapan region is the main production area nationwide. One of the problems that limits production is the vanilla wilt caused by *Fusarium oxysporum*. The studies in epidemiological aspects are still incipient and for this reason this research was carried out with the objective of knowing the temporal dynamics of the disease in relation to the phenology of the crop and the climatological conditions. Three five year old plantations were chosen of already established under a rustic management system (RS), a conventional system (CS) and an orange guardian system (OTS). Thirty plants were selected in each plantation and inoculum density (DI= number of propagules g⁻¹ of rhizosphere soil), root incidence and severity were evaluated. Number of internodes, leaves, fruits and number of stems was assessed from the planta host for May to December in 2016. Environmental temperature, relative humidity and rainfall in the area were recorded. In the second crop cycle, from February to December 2017, the assessment continued only for the conventional system and at the beginning of flowering was applied vermicompost, native *Trichoderma* sp. isolated, bordelais broth, vermicompost + *Trichoderma* sp. and a Test, and the effect of this behavior of the disease was evaluated. In the period from May to December 2016, inoculum density, incidence and severity reached maximum levels during the stages of fruit development and maturity. In the three crop systems, temporal progress of ID and incidence were described by the monomolecular model. DI presented rates of increase (r_M) 0.005, 0.006 and 0.023 respectively, generating significantly different epidemics ($p \leq 0.05$). Disease incidence was adjusted with growth rates (r_M) 0.005, 0.005 and 0.006 for the RS, CS and OTS orchards respectively and the epidemics were statistically equal between the SR and SC. Most frequent severity 38% and comparison of severity indices and under disease progress curve (AUDPC) showed significant differences between SC-STN and SR-STN. Plant host development were adjusted to the logistic model in to three production systems and only biomass was significantly different in the each systems. SR orchards had the highest percentage of leaf fall (14.9%) and fruit (62.5%). In May 2016 to December 2017 cycle, the temporal progress of ID and incidence were described by the monomolecular model. ID presented the highest rate of increase ($r_M = 0.011$) in the 2017 and had comparison showed statistical differences from 2016 cycle. Incidence was equal statistically for both cycles. Most frequent severity was 18% and the highest severity index 32.6%, and was any statistical differences. Host growth in development were adjusted to logistic model. Highest growth rates recorded in 2017 and, were significantly different ($p \leq 0.05$) from those in 2016. Of the five treatments applied in 2017, only T5 (vermicompost) had a significant effect on decrease roots severity. 2016 crop cycle had the highest leaves and fruit drooping by cause of leaf yellowing and rotting. Fourty *Fusarium* morphologically different isolates and they are identified as *Fusarium* with taxonomical key. Six *Fusarium* isolates were the most frequent and abundant, two of them isolated in higher percentage and morphologically identified as *F. oxysporum* (31.6%) and *F. solani* (19.5%). Both pathogens were inoculated under controlled temperature conditions at 25 °C, with constant soil moisture, and results indicated it was determined that the causal agent of wilt disease was *F. oxysporum*.

Key words: Epidemiology, growth models, vanilla, *Fusarium oxysporum*, severity.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y su misericordia hacia mi persona y familia

A mis padres Manuel González y Elsa Reyes

A mis hermanos Lupita, Moisés, Selena y Yair

A mis abuelos Gerónimo y Catalina

A mi familia Rocío y Luis Ángel

Al Consejo Estatal Veracruzano de Productores de vainilla

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me provee de vida y salud.

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus-Montecillo por darme la oportunidad de estudiar y formarme profesionalmente en esta institución de enseñanza e investigación.

A la Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán, por su apoyo como consejero y por todas las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo. Por sus consejos y paciencia durante esta etapa de formación profesional.

A los miembros de mi comité de tesis: a la Dra. María de Jesús Yáñez Morales por sus aportaciones para el desarrollo de esta investigación, al Dr. José Salvador Escalante Estrada por sus valiosos comentarios y sugerencias para la buena culminación de éste trabajo.

Al Sr. Crispín Pérez, presidente del Consejo Estatal Veracruzano de Productores de Vainilla A.C. por la disponibilidad y oportunidad brindada para realizar este trabajo en plantaciones de la región.

Agradezco de manera atenta a Jónquer Pérez y familia por su confianza y su valioso apoyo hacia mi persona y por su disponibilidad para trasladarme a las comunidades en cada fecha de trabajo.

Al Dr. Pedro Maya por las facilidades brindadas y su apoyo para trabajar en su vainillal.

Al señor Antonio por permitirnos hacer evaluaciones en su plantación de vainilla.

A mis amigos y compañeros quienes me acompañaron con aportaciones y apoyo en el desarrollo de la tesis.

A mi familia Rocío y Luis Ángel, por su apoyo y paciencia.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xvi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
Objetivo general	3
Objetivos particulares.....	3
Hipótesis general	4
Hipótesis particulares	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Generalidades históricas de la vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks.) en México	5
Importancia económica	5
Aspectos generales del cultivo	8
Plagas y enfermedades del cultivo	10
Marchitez de la vainilla por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	12
Biología y ecología de <i>Fusarium</i> spp.....	13
Estrategias de manejo para la marchitez de la vainilla.....	15
Epidemiología	17
Importancia de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos	18
Importancia de las epidemias en cultivos tropicales	20
Importancia de la epidemiología en el manejo integrado y ecológico de las enfermedades causadas por patógenos de las raíces	21
Importancia de la epidemiología en la enfermedad marchitez de raíces y tallos en vainilla ...	23
LITERATURA CITADA.....	25
CAPÍTULO I.: EFECTO DE TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. SOBRE LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA, ASOCIADA A <i>Fusarium</i> spp.	34
1.1. RESUMEN.....	34
1.2. ABSTRACT	35
1.3. INTRODUCCIÓN	36
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
1.4.1 Localización del área de estudio	37
1.4.2 Selección de plantas de vainilla para evaluación	38

1.4.3	Evaluación de incidencia y severidad de la enfermedad en raíces.....	38
1.4.4	Cuantificación de la densidad de inóculo en suelo de rizósfera.....	40
1.4.5	Evaluación de la biomasa de raíces.....	40
1.4.6	Identificación morfológica de los hongos asociado a la marchitez vainilla	41
1.4.7	Evaluación de la fenología de la vainilla	41
1.4.8	Muestreo y evaluación del crecimiento y desarrollo del hospedante.....	41
1.4.9	Evaluación de la caída de hojas y frutos	41
1.4.10	Evaluación de variables climáticas	41
1.4.11	Análisis Estadísticos.....	42
1.4.11.1	. Análisis cuantitativo del comportamiento temporal de la incidencia y densidad de inóculo.....	42
1.4.11.2	Análisis cuantitativo de la severidad en raíces causada por la enfermedad marchitez	42
1.4.11.3	Comparación de epidemias	43
1.4.11.4	Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante..	43
1.4.11.5	Relación de la densidad de inóculo, incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo.	43
1.5.	RESULTADOS.....	44
1.5.1	Diagrama estandar de severidad.....	44
1.5.2	Dinámica temporal de la severidad, incidencia y densidad de inóculo de <i>Fusarium</i> 45	
1.5.3	Dinámica de la biomasa de raíces en relación a la fenología.....	47
1.5.4	Identificación morfológica de hongos asociados a raíces de vainilla.....	48
1.5.5	Evaluación de la fenología	51
1.5.6	Muestreo y evaluación del crecimiento y desarrollo del hospedante.....	52
1.5.7	Evaluación de la caída de hojas y frutos.	53
1.5.8	Evaluación de variables climáticas	55
1.5.9	Análisis cuantitativo del efecto del manejo de los sistemas en la marchitez y pudrición de las raíces en vainilla.	56
1.5.9.1	Análisis cuantitativo del comportamiento temporal de la incidencia y densidad de inóculo.....	56
1.5.9.2	Análisis cuantitativo de la severidad en raíces.....	57
1.5.9.3	Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento y desarrollo de la planta hospedante.....	58

1.5.9.4	Comparación de epidemias	63
1.5.9.5	Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento del hospedante.....	64
1.5.9.6	Relación de incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo.....	65
1.6.	DISCUSIÓN	67
1.7.	CONCLUSIONES	71
1.8.	LITERATURA CITADA.....	72
CAPÍTULO II. DINÁMICA DE LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA ASOCIADA A <i>Fusarium</i> spp. DURANTE DOS CICLOS DE CULTIVO EN PAPANTLA, VERACRUZ.. 75		
2.1.	RESUMEN.....	75
2.2.	ABSTRACT.....	76
2.3.	INTRODUCCIÓN	77
2.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	78
2.4.1.	Localización del área de estudio	78
2.4.2.	Evaluación del efecto de cinco tratamientos sobre la enfermedad marchitez de la vainilla y el patógeno <i>Fusarium</i> spp.	78
2.4.3.	Análisis estadístico.....	80
2.4.3.1.	Ajuste de Curvas del desarrollo temporal de la enfermedad a modelos determinísticos no-flexibles de crecimiento.....	80
2.4.3.2.	Análisis cuantitativo de la severidad.....	80
2.4.3.3.	Análisis cuantitativo del comportamiento del crecimiento y desarrollo del hospedante.....	80
2.4.3.4.	Comparación de epidemias entre los dos ciclos de evaluación y comparación de los tratamientos aplicados en el segundo ciclo	81
2.4.3.5.	Relación de incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo.....	81
2.5.	RESULTADOS.....	82
2.5.1.	Dinámica de los principales componentes del patosistema marchitez de la vainilla, en relación a la fenología	82
2.5.2.	Dinámica del crecimiento y desarrollo del hospedante.....	83
2.5.3.	Análisis del efecto de tratamientos sobre la enfermedad marchitez de la vainilla..	84
2.5.4.	Evaluación de la caída de hojas y frutos	85
2.5.5.	Evaluación del rendimiento.....	87
2.5.6.	Variables climatológicas.	88

2.5.7.	Análisis cuantitativo de la dinámica de <i>Fusarium</i> asociado a la marchitez y pudrición de las raíces en vainilla.	88
2.5.7.1.	Ajuste a modelos epidemiológicos de comportamiento temporal	88
2.5.7.2.	Análisis cuantitativo de la severidad en raíces.....	90
2.5.7.3.	Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento y desarrollo de la planta hospedante.....	90
2.5.7.4.	Comparación de epidemias	93
2.5.7.5.	Comparación del crecimiento y desarrollo de la vainilla.....	94
2.5.7.6	Relación de incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo.....	95
2.6	DISCUSIÓN	96
2.7	CONCLUSIONES	99
2.8	LITERATURA CITADA.....	100
CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DEL AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks.), EN PAPANTLA VERACRUZ		
		102
3.1.	RESUMEN.....	102
3.2.	ABSTRACT.....	103
3.3.	INTRODUCCIÓN	104
3.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.4.1.	Obtención de cepas	105
3.4.2.	Identificación morfológica	106
3.4.3.	Pruebas de patogenicidad.....	107
3.4.3.1.	Obtención y crecimiento de material vegetal.....	107
3.4.3.2.	Crecimiento de aislamientos de hongos asociados a vainilla.....	107
3.4.3.3.	Preparación de inóculo	107
3.4.3.4.	Inoculación de esquejes y evaluación de síntomas	108
3.5.	RESULTADOS	109
3.5.1.	Identificación morfológica	109
3.5.1.1.	<i>Fusarium oxysporum</i>	109
3.5.1.2.	<i>Fusarium solani</i>	109
3.5.2.	Pruebas de patogenicidad.....	112
3.5.3.	Reaislamiento del patógeno	116
3.6.	DISCUSIÓN	117

3.7.	CONCLUSIONES	119
3.8.	LITERATURA CITADA.....	120

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Diagrama estándar de severidad usado en este estudio para evaluar el daño causado por la marchitez en raíces de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>) (sin publicar).	39
Cuadro 1.2. <i>Porcentaje general de daño obtenido por el método de punto medio y usado en este estudio para evaluar la severidad de la marchitez en raíces (sin publicar).</i>	39
Cuadro 1.3. <i>Severidad promedio obtenida para cada sistema de producción.</i>	45
Cuadro 1.4. Porcentaje (%) de incidencia de aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a raíces de vainilla en tres sistemas diferentes de manejo.	50
Cuadro 1.5. <i>Promedios generales de las variables de crecimiento y desarrollo de la vainilla, en tres sistemas de manejo.</i>	52
Cuadro 1.6. <i>Datos generales usados para estimar de la caída de hojas y frutos por el síntoma de amarillamiento y pudrición, en tres sistemas de manejo de la vainilla.</i>	54
Cuadro 1.7. Datos del porcentaje de la caída de hojas y frutos, sometidos a la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para determinar diferencias significativas.....	54
Cuadro 1.8. Estadísticos considerados para el ajuste de la incidencia, densidad de inóculo en suelo de rizósfera (colonias/g ⁻¹ suelo) y severidad de daño en las raíces de vainilla, a la forma linearizada del modelo de crecimiento empírico Monomolecular, para describir la dinámica temporal del hongo <i>Fusarium</i> spp., en vainillales bajo tres sistemas diferentes de manejo, en Papantla, Veracruz.	57
Cuadro 1.9. Estadísticos considerados en el ajuste del modelo Logístico, aplicados para describir el progreso temporal de las variables biomasa, número de hojas, entrenudos y longitud de tallos de la vainilla en tres sistemas de manejo.	62
Cuadro 1.10. Parámetros usados en del modelo monomolecular, para comparar el progreso de la marchitez de la vainilla bajo tres sistemas de manejo del cultivo.....	63
Cuadro 1.11. Comparación de las tasas de incremento de los componentes de la enfermedad marchitez de la vainilla mediante la prueba de <i>t</i> (Infante y Zárate, 2013).....	63

Cuadro 1.12. Comparación de índices de severidad en raíces mediante la prueba de <i>t</i> , para determinar diferencias significativas con una significancia de 0.05, en tres sistemas de producción de vainilla.	64
Cuadro 1.13. Comparación del ABCPE de la severidad en raíces de vainilla mediante la prueba de <i>t</i> (Infante y Zárate, 2013).	64
Cuadro 1.14. Comparación de las tasas de incremento de las variables de crecimiento y desarrollo de la vainilla, mediante la prueba de <i>t</i> con una ($P=0.05$) (Infante y Zárate, 2013)	65
Cuadro 1.15. Regresión lineal para las variables de la enfermedad y el hospedante, para determinar relaciones.	66
Cuadro 2.1. Tratamientos aplicados a plantas de vainilla para evaluar su efecto sobre la enfermedad marchitez, en la Región del Totonacapan.	78
Cuadro 2.2. Severidad del daño causado por marchitez en raíces de vainilla en los tratamientos establecidos en un sistema de producción convencional en el ciclo febrero-diciembre 2017, y su agrupación de acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey.	85
Cuadro 2.3. Medias de las variables del patógeno, crecimiento y desarrollo de la vainilla, agrupados de acuerdo a la separación de medias de Tukey, para un sistema de manejo convencional en la Región del Totonacapan.	85
Cuadro 2.4. Porcentaje de caída de hojas y frutos respecto al total, en un huerto de vainilla bajo producción convencional en la Región del Totonacapan, Veracruz, durante los ciclos de producción 2016 y 2017.	86
Cuadro 2.5. Datos de porcentaje de la caída de hojas y frutos, sometidos a la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para determinar diferencias significativas entre los ciclos 2016 y 2017.	87
Cuadro 2.6. Rendimiento de vainilla bajo sistema de producción convencional en la Región del Totonacapan.	87
Cuadro 2.7. Estadísticos considerados para el ajuste al modelo de crecimiento monomolecular aplicado a la incidencia, densidad de inóculo en suelo de rizósfera (colonias/ g^{-1} suelo) de <i>Fusarium</i> spp., en raíces de vainilla durante los ciclo 2016 y 2017.	89
Cuadro 2.8. Estadísticos considerados para el ajuste al modelo logístico que describió el progreso temporal de la biomasa, número de hojas, entrenudos y longitud	

de lianas de la vainilla en tres sistemas de manejo con una significancia de 0.05.....	92
Cuadro 2.9. Tasas de crecimiento del modelo monomolecular, usadas para comparar el progreso de la marchitez de la vainilla durante dos ciclos de producción bajo sistema convencional.....	93
Cuadro 2.10. Comparación de las tasas de crecimiento de los componentes de la enfermedad marchitez de la vainilla mediante la prueba de t (Infante y Zárate, 2013).....	93
Cuadro 2.11. Comparación de índices de severidad en raíces de vainilla mediante la prueba de t ($P=0.05$), para los ciclos de producción 2016 y 2017.	94
Cuadro 2.12. Comparación del ABCPE de la severidad en raíces de vainilla mediante la prueba de t (Infante y Zárate, 2013), para los ciclo producción 2016 y 2017.....	94
Cuadro 2.13. Comparación de las tasas de incremento (modelo logístico) de las variables de crecimiento y desarrollo de la vainilla mediante la prueba de t ($P=0.05$), durante los ciclos de producción 2016 y 2017.....	95
Cuadro 2.14. Análisis de regresión lineal entre las variables de la enfermedad y el hospedante.....	95
Cuadro 3.1. Características de cuatro de los aislamientos de <i>Fusarium</i> más frecuentes obtenidos de raíces y suelo de rizósfera de vainilla.	106
Cuadro 3.2. Tratamientos aplicados en pruebas de patogenicidad para determinar al agente causal de la enfermedad marchitez de la vainilla, en la Región del Totonacapan, Veracruz.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción total de vainilla a nivel mundial en t, datos del 2014, (FAOSTAT, 2018).	6
Figura 2. Producción nacional de vainilla en t/ha, datos de 2016 (SIAP, 2017).....	7
Figura 3. Planta de <i>Vanilla planifolia</i> : a) crecimiento de lianas sobre un tutor, b) inflorescencia en crecimiento, c) flores y frutos, d) raíces.	9
Figura 1.1. Vainillales ubicados en Papantla, Veracruz: A) manejo rústico, B) manejo convencional y C) manejo en tutor naranja.	37
Figura 1.2. Diagrama estándar de severidad para determinar el porcentaje de daño con base en la sintomatología de la enfermedad marchitez, en el cultivo de vainilla (Clase 1= raíz sana, clase 7= sistema radical y planta muerta), dc=decoloración, ds=descortezamiento, nc=necrosis, pt=pérdida de turgencia, pd=pudrición, rh=raíz hueca, rs=raíz sana, at= amarillamiento del tallo y mp=muerte de la planta.....	44
Figura 1.3. Dinámica de la severidad (valores absolutos) en tres sistemas diferentes de producción de vainilla en Papantla, Veracruz.....	45
Figura 1.4. Dinámica de la incidencia de <i>Fusarium</i> en raíces (alores absolutos), en relación a las condiciones climáticas y fenología el cultivo, en tres sistemas de producción de vainilla.	46
Figura 1.5. Dinámica de la densidad de <i>Fusarium</i> en suelo de rizósfera, en relación al clima del ambiente y a las etapas fenológicas de la vainilla.	47
Figura 1.6. Comportamiento temporal de la biomasa de raíces del cultivo de vainilla en tres sistemas de manejo, en Papantla, Veracruz.....	48
Figura 1.7. Morfología de aislamientos: A) Macroconidios de <i>Fusarium</i> y B) células moniloides de <i>Rhizoctonia</i>	49
Figura 1.8 Aislamientos de <i>Fusarium</i> más frecuentes en raíces de vainilla: 1) VF ₁ , 2) VF ₂ , 3) VF ₃ , 4) VF ₄ , 5) VF ₅ , 6) VF ₆	49
Figura 1.9. Representación de la fenología de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks., compuesta por seis etapas: 1. crecimiento vegetativo, 2. brote de yemas florales, 3. floración y polinización, 4. amarre de frutos, 5. desarrollo de frutos y 6. madurez.....	52

Figura 1.10. Dinámica de las variables absolutas de crecimiento de la vainilla: A) número de nuevos entrenudos, B) número de hojas nuevas y D) longitud de tallos (cm).	53
Figura 1.11. Porcentaje de pérdida de hojas y frutos en vainillales de la región del Totonacapan.	55
Figura 1.12. Variables climáticas de Red de Estaciones Agroclimáticas Inifap (INIFAP, 2016).	55
Figura 1.13. Comportamiento temporal de los valores acumulados y ajustados al modelo monomolecular en tres sistemas de manejo: A) incidencia de <i>Fusarium</i> en raíces, B) densidad de inóculo en suelo de rizósfera.....	56
Figura 1.14. Distribución de la severidad del daño causado por <i>Fusarium</i> en raíces de vainilla bajo tres sistemas de producción, durante 2016, en la Región del Totonacapan, Veracruz (1 raíces sanas, 7=severidad máxima).	58
Figura 1.15. Curvas acumuladas del crecimiento de la vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks.), ajustada al modelo logístico en tres sistemas de manejo: A) biomasa de raíces, B) número de entrenudos, C) número de hojas y D) longitud de liana durante el ciclo 2016.	59
Figura 2.1. Arreglo de los tratamientos aplicados en campo, al inicio de la floración.	79
Figura 2.2. Dinámica de la incidencia y severidad de <i>Fusarium</i> spp., durante los ciclos 2016 y 2017 en un huerto de vainilla con sistema de producción convencional de vainilla, en la Región del Totonacapan, Veracruz; 1-6: etapas fenológicas.	82
Figura 2.3. Dinámica de la densidad de inóculo en las diferentes etapas fenológicas de la vainilla; 1-6: etapas fenológicas.	83
Figura 2.4. Dinámica de las variables de crecimiento promedio de la vainilla en un sistema de producción convencional durante dos ciclos de cultivo, de 2016-2017; 1-6: etapas fenológicas.....	84
Figura 2.5. Caída de hojas y frutos de vainilla durante los ciclos de producción 2016 y 2017, en la Región del Totonacapan.	86
Figura 2.6. Rendimiento total del huerto durante dos ciclos de producción.	87
Figura 2.7. Temperatura y humedad relativa en relación a las etapas fenológicas de la vainilla durante el ciclo 2017; 1-6: etapas fenológicas.....	88

Figura 2.8. Curvas del progreso temporal de la densidad de inóculo e incidencia descritas por el modelo monomolecular en dos ciclos de producción; 1-6 etapas fenológicas	89
Figura 2.9. Frecuencia del porcentaje de la severidad en raíces de vainilla durante mayo-diciembre 2016 y febrero-diciembre 2017, en un huerto con manejo convencional, en la Región del Totonacapan, Veracruz.....	90
Figura 2.10. Curvas de crecimiento descritas por el modelo logístico: A) longitud de tallos y entrenudos, B) hojas y biomasa de raíces, durante dos ciclos de producción.....	91
Figura 3.1. Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio de cultivo PDA: a) frente de la colonia, b) reverso de la colonia, c) macroconidios y microconidios, d) esporodoquio, e) polifialides y f) clamidiosporas (it=intercalar, te=terminal, pa=pareja y sl=libre o solitaria).	110
Figura 3.2. Morfología de <i>Fusarium solani</i> en medio de cultivo PDA: vista frontal de la colonia; b) reverso de la colonia c) macroconidios y d) microconidios, e) fialides y f) clamidiosporas (tr=terminales, pa= en pares, it=intercalares y sl=solitarias).....	111
Figura 3.3. Resultados de las pruebas de patogenicidad efectuados en plantas de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks.): a) plantas inoculadas con <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y el testigo; b) comparación de plantas con síntoma inducidos por <i>F. oxysporum</i> y plantas testigo, c) sistema radical del testigo (ts) con decoloración de la base del tallo por permanecer bajo el sustrato y no por enfermedad, y planta inoculadas con <i>F. oxysporum</i> (Fo).....	113
Figura 3.4. Comparación del sistema radical de las plantas de vainilla 35 después de su inoculación: a) sistema radical del testigo, b) sistema radical de planta inoculada con <i>F. oxysporum</i> , c) raíces sanas y turgentes y d) pudrición y descortezamiento de las raíces causados por el patógeno.....	114
Figura 3.5. Sintomatología de la marchitez en plantaciones de la región del Totonacapan: a) muerte completa de plantas, b-c) pudrición de tallos con amarillamiento, d) raíces adventicias sanas adheridas al tutor, e) pudrición típica de las raíces al iniciar la infección, f) muerte de raíces adventicias, tallo y hojas con infección avanzada, g) raíces jóvenes infectadas al entrar en contacto	

con residuos de raíces muertas adheridas al tutor, h) raíces infectadas al entrar en contacto con el suelo y i) muerte total del sistema radical..... 115

INTRODUCCIÓN GENERAL

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) es la única especie de la familia Orchideaceae que produce frutos para aprovechamiento en la industria alimenticia. Es uno de los saborizantes más utilizados y la segunda especia más cara del mundo, después del azafrán (*Crocus sativus*). Su aprovechamiento es principalmente para la obtención del extracto natural a partir de semillas de las cápsulas curadas o beneficiadas. La vainilla mexicana, es una de las mejores del mundo por su inigualable aroma y sabor, cualidad que la coloca en los primeros lugares del mercado. Por otra parte, la denominación de origen la ha favorecido con un valor agregado (Havkin-Frenkel y Belanger, 2011).

A pesar de que en nuestro país se obtiene la mejor vainilla, los rendimientos obtenidos no logran satisfacer la demanda del mercado mundial. Entre las principales limitantes que impiden rendimientos significativos en la producción están las enfermedades provocadas por diversos organismos fitopatógenos, principalmente la marchitez y pudrición causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*, seguida de la caída de hojas por *Fusarium* sp. el amarillamiento y caída prematura de frutos provocada por *Colletotrichum vanillae* (Sussela *et al.*, 2006; Koyyappurath *et al.*, 2016). También se ha reportado que *Colletotrichum gloeosporioides* causa antracnosis en tallos, hojas, flores y frutos de vainilla; y se le ha considerado como la segunda enfermedad de importancia debido a que, en infestaciones severas, causa la defoliación de las plantas y el estrangulamiento de tallos (Ploetz, 2005). El cultivo de esta orquídea es histórico en México, ya que la producción de frutos se le atribuye a la cultura Totonaca (1466-1520), quienes lo utilizaban como saborizante en la bebida ancestral conocida como chocolate (Bory *et al.*, 2008; Saldívar, 2015). A pesar de los bajos rendimientos obtenidos por causa de las enfermedades, en muchas de las plantaciones de vainilla no se aplica un programa estratégico en el proceso de producción, fundamentado en estudios epidemiológicos del patosistema de este cultivo y que permitan la prevención y un mejor manejo de los daños causados por patógenos del cultivo. En México, se ha reportado que la pudrición de tallos de vainilla es causada por el hongo *F. oxysporum* f sp. *vanillae*, el cual provoca una pudrición basal y estrangulamiento del cuello de plantas de vainilla (Adame *et al.*, 2015). En suelos infestados este patógeno puede atacar y destruir una plantación completa (Bhai y Dhanesh, 2008).

Las zonas productoras de vainilla en México, se ubican en las regiones tropicales del país, ya que las condiciones ambientales como temperatura y humedad favorecen el crecimiento de

esta especie; sin embargo, estas mismas condiciones y las malas prácticas de manejo forman un nicho apropiado para el desarrollo de plagas y enfermedades (Saldívar, 2015). Saldívar (2015) también menciona que en las plantaciones de vainilla, es indispensable que las prácticas de manejo se realicen de manera estricta, tomando en cuenta los factores climatológicos, propiedades físico-químicas del suelo, nutrición de la planta y fenología del cultivo. Por otra parte, se desconoce la dinámica temporal y espacial de los patógenos de este cultivo y que causan daño y pérdidas en la población de plantas y en su rendimiento. El estudio de dicho comportamiento permite desarrollar estrategias para reducir a un nivel aceptable el impacto que ejerce la enfermedad en las plantas en su producción y pérdidas económicas (Arneson, 2006).

Por las razones expuestas, ésta investigación tuvo como objetivo: evaluar la dinámica temporal de la incidencia y severidad de *Fusarium* spp., mediante la cuantificación de la densidad de inóculo en suelo de rizósfera y su incidencia y daño en raíces, en relación a la fenología del cultivo de vainilla y algunas variables climatológicas, en tres sistemas diferentes de manejo (rústico, convencional y orgánico) en el municipio de Papantla, ubicados en la Región del Totonacapan, Veracruz.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Determinar la dinámica temporal de la incidencia y severidad de la enfermedad conocida como marchitez en el cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) en relación a la fenología del cultivo y las condiciones climatológicas, en la Región del Totonacapan, Veracruz.

Objetivos particulares

- 1) Identificar morfológicamente los aislamientos de hongos patógenos y asociados a raíces de vainilla con síntomas de marchitez y pudrición.
- 2) Evaluar el comportamiento temporal de la incidencia y severidad de la marchitez de la vainilla, bajo tres sistemas diferentes de manejo.
- 3) Evaluar el comportamiento temporal del inóculo de *Fusarium* sp., en suelo de rizósfera de la vainilla, asociado a la marchitez de la vainilla bajo un sistema de manejo convencional durante dos ciclos de producción.
- 4) Evaluar el desarrollo fenológico del cultivo de vainilla en relación a la dinámica temporal de la incidencia y severidad de la marchitez y de la densidad de inóculo del hongo fitopatógeno *Fusarium*.
- 5) Determinar la etapa crítica en el desarrollo epidémico de la enfermedad en relación a la fenología del cultivo y algunos factores climatológicos.
- 6) Identificar al agente causal de la marchitez de la vainilla en la Región del Totonacapan, Veracruz.

Hipótesis general

El comportamiento temporal de la incidencia y severidad de la enfermedad conocida como marchitez de la vainilla está en función del sistema de manejo y afecta negativamente el crecimiento, desarrollo y producción de la planta de vainilla, generando pérdidas en el rendimiento del cultivo.

Hipótesis particulares

- 1) La dinámica temporal de la incidencia y severidad causada por la enfermedad marchitez, se comportará de manera diferente en cada sistema de producción.
- 2) El comportamiento temporal de la enfermedad está relacionado con el desarrollo fenológico de la vainilla.
- 3) Diferentes especies de *Fusarium* están asociadas a la marchitez de la vainilla en la Región del Totonacapan.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades históricas de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) en México

La vainilla es un cultivo ancestral que se desconoce cuándo se empezó a cultivar y su producción se le atribuye a la cultura totonaca. Además se sabe que esta especia era muy conocida en las diferentes culturas mesoamericanas en las que se tienen registro de nombres en las lenguas indígenas totonaco, maya, chinanteco y mazateco. Por otra parte, también los totonacos y otros pueblos la ofrecían como tributo a los Aztecas (Hagsater *et al.*, 2005). De acuerdo con Azeez (2008), México es centro de origen de la vainilla y su principal zona productora es la región del Totonacapan en el Estado de Veracruz y donde en tiempos antiguos se le daban diferentes usos. Actualmente se utiliza para la elaboración de extracto natural a partir de los frutos beneficiados (curados) y se utiliza principalmente como saborizante y tiene múltiples usos en la agroindustria.

México produce la mejor vainilla del mundo y en el siglo XIX (1830-1870) se posicionó en el mercado como único productor y exportador de vainilla, cuya producción se exportaba a Francia (Kourí, 2000). Está documentado que desde 1743 se comercializaba vainilla en la región de Papantla, pero este comercio era principalmente con frutos recolectados de manera silvestre y las plantaciones de vainilla se documentan hasta 1767 (Hagsater *et al.*, 2005). Hagsater *et al.* (2005) documenta que la orquídea fue extraída y llevada a Inglaterra en el año 1800. En 1827 fue llevada a Isla Reunión, se extendió a Madagascar en 1840 donde se adaptó y se establecieron plantaciones comerciales. Kourí (2000) añade que el privilegio que México gozaba desde el siglo XVIII comenzó a derrumbarse para la década de 1860, cuando la Isla Reunión se convierte en una zona productora de vainilla. México perdió el monopolio de la vainilla y esto fue un golpe para los productores Mexicanos, debido a que la vainilla producida en Isla Reunión se posicionó en el mercado europeo a un menor costo, pero con la desventaja de ser una vainilla de menor calidad comparada con la Mexicana. A pesar de esto, México siguió exportando vainilla hacia nuevos mercados de Cuba, Estados Unidos y Puerto Rico (Kourí, 2000).

Importancia económica

La importancia económica de la vainilla empezó a cobrar auge en Chiapas en el siglo XVIII, cuando se volvió un artículo de comercio, principalmente como saborizante y aromatizante de la bebida en ese entonces conocida como chocolate (mezcla de cacao, maíz, vainilla y otras especias), la cual ya era muy popular desde el siglo XVII (Hagsater *et al.*, 2005). Hagsater *et*

al. (2005) también documenta que durante la época de la colonia española se consumía otra bebida conocida como champurrado (mezcla de cacao, azúcar, y atole de maíz, aromatizado con vainilla) y en este periodo el chocolate también empezó a ser demandado por la población europea, lo que favoreció el incremento en el consumo y la demanda de vainilla.

Lawer (citado por Hagsater *et al.*, 2005) menciona que en un inicio, el uso de la vainilla que se exportaba a Europa fue monopolizado por España. De acuerdo a Humboldt (citado en Hagsater *et al.*, 2005) para finales del periodo virreinal la vainilla se exportaba por el puerto de Veracruz y los municipios productores que satisfacían dichas exportaciones eran Acayucan, Misantla, Papantla, y San Andrés Tuxtla; posteriormente Papantla y la región del Totonacapan se convirtieron en la principal zona económica de producción de vainilla.

La vainilla se convirtió en un producto muy apreciado en el mercado por su aroma y sabor, propiedades que le confiere el compuesto orgánico llamado vanillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) y se usa como condimento, saborizante y conservador (Geissman, 1973); además, Musalem (citado por de la Cruz *et al.*, 2009) menciona que en la actualidad la vainilla tiene múltiples usos principalmente en la industria de alimentos, bebidas, farmacéutica, cosméticos y artesanía tradicional.

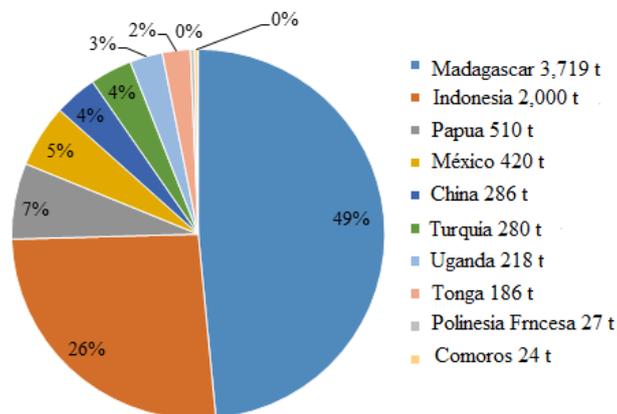


Figura 1. Producción total de vainilla a nivel mundial en t, datos del 2014, (FAOSTAT, 2018).

Actualmente se cultiva en muchas áreas tropicales del mundo, y de acuerdo a las Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y Alimentación (FAOSTAT, 2017) en 2014 Madagascar era el país productor número uno. El segundo lugar lo ocupó Indonesia y en base a estos grandes productores se rige el precio en el mercado internacional. Otros productores son China Continental, México y Papua (Figura 1). Los países más demandantes de esta especia son Alemania, Canadá, Estados Unidos, España, Francia y Reino Unido.

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2016), en México los principales estados productores son Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz; y otros estados donde también se cultiva vainilla son Chiapas, Hidalgo, y Quintana Roo (Figura 2). Los rendimientos que se obtienen actualmente satisfacen la demanda en el mercado internacional y en el año 2015 la producción promedio nacional fue de 0.51 t ha⁻¹, con un precio medio de \$88,627.52/t. Se ha estimado que en un sistema de producción de vainilla bajo tutor naranjo y con buenas prácticas agrícolas el costo de producción oscila entre \$40,000 y \$48,000/ha, y donde se pueden obtener rendimientos de hasta 1.5 t ha⁻¹ (Hernández, 2011). Barrera *et al.* (2009) realizaron un estudio en la región del Totonacapan y reportaron que en un sistema de producción bajo malla sombra el rendimiento promedio alcanzó los 435 kg ha⁻¹, mientras que en un sistema bajo tutor naranjo el rendimiento fue de 1.2 ton ha⁻¹, sistema donde el productor obtiene mejores ingresos.

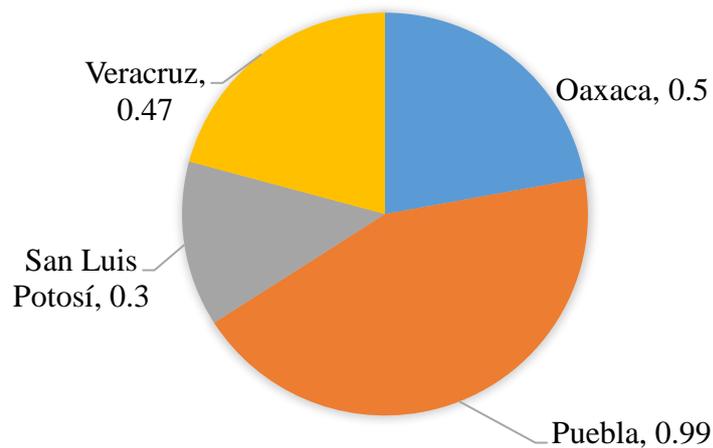


Figura 2. Producción nacional de vainilla en t/ha, datos de 2016 (SIAP, 2017).

De acuerdo al Consejo Estatal de Productores de Vainilla Veracruzana A. C. (información no publicada) en 2017 el kg de vainilla verde se pagó a \$400, lo cual benefició significativamente a los productores. Las exportaciones de vainilla también representan ganancias económicas significativas y en el 2016 se exportaron 30.82 t con un valor de 1.03 millones de dólares y la exportación se han extendido a 15 países, pero el consumidor principal es Estados Unidos (SAGARPA, 2017).

De acuerdo con la agencia de Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA, 2002) la comercialización de la vainilla se realiza de dos formas que prevalecen

en la actualidad. La primera es la comercialización en verde, donde el productor cosecha y vende a los acopiadores o beneficiadores. La segunda es la comercialización de vainilla beneficiada, en este canal de comercialización la vainilla verde recibe un valor agregado a través del proceso de beneficiado o curado, y las ventas se hacen al mercado internacional, donde se obtienen los mejores ingresos, sin embargo, dichas ganancias favorecen más a los beneficiadores. El precio al productor depende del mercado internacional y de la calidad e inocuidad de vainilla verde y beneficiada. La vainilla beneficiada se destina principalmente para exportación, sólo un bajo porcentaje de esta se queda en el mercado nacional donde se emplea para la elaboración de extracto natural y artesanías.

Aspectos generales del cultivo

El género *Vanilla* es descrita como una orquídea terrestre de hábito trepador (Beutelspacher, 2013), se puede encontrar en hábitat silvestre en diferentes regiones tropicales de África, América y Asia (Soto, 2006). Soto (2006) también menciona que América tropical es el hábitat donde se reporta la mayor cantidad de especies y a nivel mundial se reportan 110 especies de vainilla, de las cuales nueve se encuentran en México y comercialmente se cultivan *V. planifolia* y *V. pompona* y otros híbridos; sin embargo *V. planifolia* es la de mayor distribución comercial (Figura 3). Su crecimiento y desarrollo es favorecido en las regiones con clima cálido húmedo, abundantes lluvias en verano y temperaturas óptimas de 25 °C a una altitud de 0-900 m aunque *V. planifolia* se ha encontrado a 1200 m (Soto, 2009). En la región del Totonacapan, la vainilla se cultiva bajo cuatro sistemas de producción que son: sistema de producción en naranjo (*Citrus* sp.) con un 61.3% de las plantaciones, sistema de acahual, sistema bajo sombra de pichoco (*Eriquina* sp.) y ambos representan un 30.7%; y de manera intensiva la producción en malla sombra al 50% de luminosidad (Barrera *et al.*, 2009) y este último representa el 8% de las plantaciones. Los vainillales han sido establecidos utilizando la reproducción asexual, es decir, que para la siembra se utilizan esquejes obtenidos en plantaciones ya establecidas. Esta práctica ha conducido a crear una población idéntica puesto que no existe variabilidad genética en las plantas utilizadas para el establecimiento de nuevas parcelas. Por lo anterior, se han realizado varias investigaciones sobre germinación *in vitro* de semillas, en diferentes especies de vainilla y algunos híbridos con el objetivo de obtener ejemplares que puedan ser utilizados para el mejoramiento genético de la vainilla (Menchaca *et al.*, 2011). Aún no se han documentado plantaciones comerciales de *V. planifolia* a partir de semillas, la mayoría se establecen por esquejes seleccionados, generalmente se emplean esquejes de ocho yemas vegetativas, debido a su rápido crecimiento

y se pueden plantar esquejes de hasta dos metros de longitud para acelerar el proceso (Hernández, 2011).



Figura 3. Planta de *Vanilla planifolia*: a) crecimiento de lianas sobre un tutor, b) inflorescencia en crecimiento, c) flores y frutos, d) raíces.

Hernández (2011) también señala que una vez establecido el cultivo, la producción de frutos inicia después de los cuatro años. Durante este proceso deben realizarse prácticas de manejo como aplicación de materia orgánica, encausamiento de guías, podas de saneamiento, poda de tutores, regulación de sombra y control de plagas y una de las actividades más importante en el manejo del cultivo es la polinización. De acuerdo con Soto (2006) la floración inicia a finales del mes de febrero y se extiende hasta mayo y el periodo de mayor floración es durante marzo-abril, misma etapa en la que se realiza la polinización. Las flores crecen en una inflorescencia axilar o paniculada y debido a su morfología y a los bajos porcentajes de autopolinización que van de 1-6%, los productores realizan esta actividad de manera artificial (manual), y se lleva a cabo durante las primeras horas (7:00-12:00 a.m.) del día porque la floración es efímera (Soto, 2009).

La polinización natural se presenta en un porcentaje muy bajo, donde uno de cada cuatro frutos es obtenido por este mecanismo (Hernández *et al.*, 2016). Este proceso es realizado por insectos del orden Himenoptera de los que se tiene documentado a *Euglossa* sp., *Exaerete* sp., y *Melipona* sp., sin embargo, se detectó que la polinización realizada por *Melipona* no es eficiente en algunas especies de vainilla (Cameron, 2011). En plantaciones de *V. planifolia* en regiones productoras de México, se registró que los únicos polinizadores son *Eulaema* spp., comúnmente conocidos como quijotes y *Euglossa* spp., o abeja metálica (Hernández *et al.*, 2016).

De acuerdo a comunicación de productores en 2017 de la Región del Totonacapan (información no publicada), en cada inflorescencia se polinizan las flores hasta tener de seis a ocho frutos y el ciclo de producción de la vainilla desde polinización a cosecha dura nueve meses en esta región. La cosecha se realiza en base al tiempo transcurrido desde la polinización y para ello se establece una fecha de corte, generalmente se lleva a cabo durante la segunda semana de Noviembre.

Plagas y enfermedades del cultivo

Las prácticas intensivas de monocultivo, las condiciones climáticas, la escasa variabilidad genética en el cultivo y la deficiencia en las prácticas de manejo, favorecen la susceptibilidad de los individuos y poblaciones de plantas a enfermedades causadas por agentes fitopatógenos (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Principales hongos fitopatógenos por orden de importancia que afectan el cultivo de vainilla en las diferentes partes de la planta.

Microorganismo	Órgano de la planta afectado	Síntoma	Referencia bibliográfica
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	Raíz y tallo Hojas	Pudrición Amarillamiento	Adame <i>et al.</i> , 2015 Santa <i>et al.</i> , 2012 Xia-Hong, 2007
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Hojas, frutos y tallos	Antracnosis	Ashoka, 2005
<i>C. vanillae</i>	Frutos	Amarillamiento	Bhai y Dhanesh, 2008
<i>Phytophthora</i> sp.	Hojas, tallo y raíz	Pudrición	

<i>Rhizoctonia solani</i>	Raíz		Bhai y Dhanesh, 2008
<i>P. meadii</i> <i>P. palmivora</i> <i>P. parasitica</i>	Frutos	Pudrición	Bhai y Thomas, 2000
<i>Mucor racemosus</i>	Hojas	Pudrición	Bhai y Dhanesh, 2008
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Tallo	Pudrición	Bhai y Thomas, 2000
<i>Alternaria</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	Hojas	Mancha foliar	Valdovinos <i>et al.</i> , 2016
<i>Uromyces joffrini</i>	Hojas	Roya	Hernández, 2011

Las enfermedades más dañinas de la vainilla son causadas por hongos y la más importante es la marchitez o pudrición de raíces y tallo, cuyo agente causal fue identificado por primera vez como *Fusarium batatis*, en Puerto Rico. Posteriormente se identificó como *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* cuya agresividad ha provocado la muerte completa de plantaciones en China (Xia-Hong, 2007). En Colombia se identificó también a *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* como el agente causal de la pudrición basal de plantas de vainilla en plantaciones bajo malla sombra (Santa *et al.*, 2012). En Madagascar, Isla Reunión y la Polinesia Francesa se identificó a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-vanillae* como causante de la marchitez de raíces y tallos (Koyyappurath *et al.*, 2016). En vainillales de México se identificó a *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* como agente causal de la pudrición de raíces y tallos (Adame *et al.*, 2015).

Otro problema significativo en este cultivo es la caída prematura de frutos, amarillamiento y pudrición de éstos, los cuales pueden ocasionar pérdidas en el rendimiento del 23-75%. Está reportado que el amarillamiento es causado por *Colletotrichum vanillae* y la pudrición de frutos es causada por *Phytophthora meadii* (Bhai y Dhanesh, 2008). Bhai y Thomas (2000) reportan que, al síntoma de pudrición de los frutos están asociadas otras especies como *P. palmivora* y *P. parasitica* y también se ha reportado que *Phytophthora* sp., está asociada a la pudrición de hojas, tallos y raíces. También se ha reportado que *Fusarium* sp., causa amarillamiento de hojas, *Mucor racemosus* provoca el síntoma de pudrición en éstas y *C. gloeosporioides* provoca antracnosis tanto en hojas como en tallos y puede causar defoliación y estrangulamiento de tallos (Bhai y Dhanesh, 2008; Ashoka, 2005).

Rhizoctonia solani es otro patógeno de las raíces en diferentes cultivos y que se encuentra asociado a la pudrición de raíces de la vainilla junto con *Fusarium* (Bhai y Dhanesh, 2008). También se reporta a *Sclerotium rolfsii* asociado a pudrición del tallo (Bhai y Thomas, 2000); *Alternaria* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotia* sp., asociados a manchas en hojas y tallos (Valdovinos *et al.*, 2016). Hernández (2011) menciona que además de los patógenos descritos anteriormente, la roya (*Uromyces joffrini*) es otro patógeno que ataca al cultivo que se presenta con menor frecuencia y la incidencia ocurre en plantaciones donde existe sombra abundante, escasa ventilación y humedad excesiva. También se pueden presentar daños por plagas insectiles como son la chinche roja (*Tenthecoris confusus*) y el trozador o gusano peludo (*Plusia aurifera*).

Marchitez de la vainilla por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

La marchitez y pudrición de raíces es la enfermedad más importante en las regiones del mundo donde se cultiva vainilla (Koyyappurath *et al.*, 2016). El primer reporte de esta enfermedad identifica como agente causal a *Fusarium batatis* var. *vanillae* que posteriormente se clasificó como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* causando pudrición basal de plantas en Colombia (Santa *et al.*, 2011). El mismo patógeno se identificó en plantaciones afectadas por dicha enfermedad en México (Adame *et al.*, 2015). Posteriormente, Koyyappurath *et al.* (2016), determinaron que la pudrición de raíces y tallos de vainilla es causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*.

La sintomatología de la enfermedad inicia con la decoloración y pudrición seca de raíces subterráneas y aéreas, ocasionalmente la pudrición avanza hacia el tallo provocando amarillamiento y necrosis. Dicha necrosis provoca estrangulamiento en los tres primeros nudos y las raíces adventicias al llegar al suelo son infectadas, por lo que la planta induce la formación de nuevas raíces que también se infectan repitiendo el ciclo de la enfermedad (Koyyappurath *et al.*, 2016). De acuerdo a Xia-Hong (2007) la expresión en la sintomatología está ligada a la variación en la virulencia de las cepas de *F. oxysporum*, ya que se han documentado aislamientos altamente virulentos y aislamientos hipovirulentos. Los primeros inducen síntomas severos en raíces como una decoloración marrón y pudrición que se extiende hasta el tallo, mientras que los hipovirulentos inducen ligeros síntomas de pudrición y en algunos casos no provocan síntomas en las raíces.

En un estudio realizado en plantas de vainilla con pudrición de tallos en siete provincias de Indonesia se determinó que el 90% de hongos asociados a este síntoma está conformado por *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. semitectum*, el 10% restante lo conformaron otras 10 especies de

Fusarium (Pinaría *et al.*, 2010). De acuerdo con Koyyappurath *et al.* (2016) reportaron que en plantaciones de Isla Reunión, Madagascar y Polinesia Francesa, las especies predominantes fueron *F. oxysporum* con el 79% y *F. solani* con el 15% y otras especies encontradas fueron *F. concentricum*, *F. manguiiferae* y *F. proliferatum*; y determinaron que la pudrición de raíces y tallos de vainilla es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-vanillae*.

En vainilla, se ha reportado que *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*, ha causado pérdidas significativas en países productores de vainilla como China, Colombia, India, Indonesia, México y Puerto Rico (Ploetz, 2005). En México éste patógeno puede afectar el 67% de la población de plantas en plantaciones con edad menor a cuatro años, y durante la etapa de producción afecta el 15% de la población (Hernández, 2011).

Biología y ecología de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* fue identificado por Link en 1809 y hasta la fecha se mantiene como un género con una gran cantidad de especies, muchas de las cuales tienen la capacidad de inducir enfermedades en plantas, humanos y animales, producir metabolitos secundarios o micotoxinas (Leslie y Sammerell, 2006). Algunas cepas, también pueden actuar como agentes de control biológico de enfermedades en las plantas (Kaur *et al.*, 2010).

Fusarium se caracteriza por formar estructuras de reproducción asexual como macroconidios, microconidios, monofialides cortas o largas, polifialides, y clamidiosporas; dichas estructuras tienen características particulares que representan a las diferentes especies (Leslie y Summerell, 2006). Las clamidiosporas son sus estructuras de resistencia que garantizan la supervivencia en suelos y residuos de plantas (Karim *et al.*, 2016). Actualmente, los estudios se han enfatizado en la fase reproductiva asexual, puesto que en algunas especies se desconoce el estado de reproducción sexual (como en el caso de *F. oxysporum*). La reproducción de *Fusarium* está determinada por factores ambientales como la temperatura (Covert *et al.*, 1999) y el hospedante (Lockwood, 1977) y la sobrevivencia está relacionada con su capacidad saprofítica (Stirling *et al.*, 2016), alto nivel de agresividad y habilidad para generar variabilidad genética (Pereyra y Lori, 2013).

Ecológicamente es un habitante natural del suelo con capacidad para comportarse como parásito o saprófito y las especies más distribuidas ampliamente son *F. oxysporum* y *F. solani* (Karim *et al.*, 2016). Existen otras especies cuyo comportamiento es endófito es decir, que tienen la capacidad para crecer y colonizar al hospedante sin causar efectos negativos inmediatos y participan en interacciones simbióticas como parasitismo, comensalismo y mutualismo (Imazaki y Kadota, 2015; Stone *et al.*, 2017). Otros aislamientos son antagonistas

a especies o aislamientos fitopatógenos (Cousteaudier y Alabouvette, 1990). Forma parte de la comunidad microbiana del suelo en los distintos ecosistemas donde llega a establecer diversas interacciones con las plantas (Morriën y van de Putten, 2013) las cuales pueden ser negativas o positivas y se manifiestan principalmente en la zona de la rizósfera (Berendsen *et al.*, 2012). Sournthworth (2012), afirma que dichas interacciones ocurren en diferentes niveles biológicos donde se involucran competencia, antagonismo y mutualismo.

Como saprófito tiene un papel importante en la dinámica de las comunidades microbianas al colonizar la rizósfera, donde lleva a cabo una alta competencia con otros microorganismos y patógenos de plantas (Garibaldi *et al.*, 1991). Pueden colonizar residuos vegetales y competir con otros colonizadores, y para ello desarrollan su habilidad saprofítica e inóculo potencial, apoyado en características como una rápida germinación de propágulos, rápido crecimiento de hifas estimuladas por nutrientes solubles en el sustrato y una cantidad adecuada de enzimas para descomponer los tejidos vegetales más resistentes (Garrett, 1970).

Jeffrey *et al.*, (2012) menciona a *Fusarium* spp., como endófito en plantas donde se le encontró de manera frecuente pero no como dominante en la biota endófito. Se han reportado poblaciones altamente diversas de *F. oxysporum* como saprófitas en el suelo y como no patógenas en raíces de plantas asintomáticas (Imazaki y Kadota, 2015). También se ha reportado que en comunidades nativas de plantas *Fusarium* no induce enfermedad (Morriën y van der Putten, 2013). Estos reportes y otros resultados sugieren una especialización de los endófitos hacia el hospedante y que la mayoría de las poblaciones de *F. oxysporum* tienen la capacidad de comportarse como endófitos (Demers *et al.*, 2015).

Una de las interacciones más importantes que presenta este género es la patogenicidad y una de las enfermedades de importancia económica derivada de esta interacción es la marchitez vascular en plantas hospedantes. Se ha reportado a *F. oxysporum* como agente causal de esta enfermedad en una amplia gama de hospedantes de diferentes familias de plantas, reportándose más de 120 formas especiales como resultado de su alta especificidad con la especie hospedante (Michelse y Rep, 2009). Las formas especiales que causan la marchitez se subdividen a su vez en razas, las cuales tienen una característica diferencial en su virulencia hacia un hospedante específico (Roncero *et al.*, 2002).

F. oxysporum inicia su ciclo de vida con la germinación de una espora y las infecciones en las raíces son iniciadas por la germinación de esporas latentes, este proceso se ve restringido por la fungistasis (incapacidad de germinar a pesar de las reservas almacenadas) provocada por otros microorganismos como las bacterias que inhiben la germinación de esporas, por la falta de nutrientes y la producción de compuestos fungistáticos. A pesar de esto, las esporas pueden

germinar al ser estimuladas por los exudados radicales de sus hospedantes (Gordon, 2017). Steinkellner *et al.*, (2008) reportan que la germinación microconidial de cepas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es estimulada por los exudados radicales del tomate, de lo que se deriva una especificidad del patógeno hacia el hospedante. Ésta fase es influenciada por la temperatura y humedad ambiental, ya que la germinación y alargamiento del tubo germinativo se ven favorecidos por una temperatura de 25-30 °C con una retención de humedad del suelo del 40% y con disponibilidad de nitrógeno orgánico (El-Abyad *et al.*, 1971). En condiciones controladas se ha determinado que *Fusarium oxysporum* f. sp. *glycines* se desarrolla en temperaturas óptimas de 22-28 °C, con humedad relativa del ambiente mayor a 80% y con un pH del sustrato de 4 a 7 (Bálasu *et al.*, 2015).

La infección de las raíces es el siguiente paso en el ciclo y se desconoce con exactitud cómo se da el acceso de *Fusarium* a la raíz, además de que la interacción del patógeno con su hospedante está sujeta a cambios en función de las condiciones ambientales (Gordon, 2017). Las esporas germinan en la rizósfera y el tubo germinativo crece hacia la raíz, una vez que empieza el crecimiento de la hifa el apresorio penetra la raíz en las células protodérmicas de la zona meristemática y en las células rizodérmicas de la zona de elongación, favorecido por una temperatura de 28 y 30 °C (Rodríguez y Mendgen, 1995). La infección se ve favorecida por mecanismos como la producción de enzimas por parte del patógeno para degradar la pared celular del hospedante y facilitar la colonización de tejidos (Magliano y Kikot, 2013). Una vez que las hifas invaden y cruzan la epidermis, avanzan hacia los vasos del xilema a través de los espacios intercelulares del parénquima y cuando el xilema es colonizado, los vasos se taponean o degradan y como resultado las plantas manifiestan marchitez (Zhang *et al.*, 2015).

Estrategias de manejo para la marchitez de la vainilla

Uno de los problemas más difíciles de controlar son los organismos fitopatógenos presentes en suelos cultivados; y en el caso de *Fusarium* spp., éste tiene una amplia distribución y su capacidad para inducir enfermedades lo convierte en un fitopatógeno relevante, causante de marchiteces (González *et al.*, 2014), como *F. oxysporum* que induce la marchitez en algunos cultivos (Demers *et al.*, 2015). Para el manejo de estos microorganismos patógenos se han desarrollado prácticas culturales, legales, de control biológico, resistencia genética y control químico, siendo éste último el más utilizado. El uso de fungicidas químicos para controlar enfermedades causadas por *Fusarium* spp., tiene un efecto negativo en el medio ambiente y en la microbiología del suelo. Como consecuencia del uso desmedido de fungicidas, algunos

hongos han logrado generar resistencia como el caso de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* resistentes a Benzomyl 500 y Rhizolex-T y Homai WP (Rubio *et al.*, 2008).

Un solo método para el control de enfermedades causadas por *Fusarium* no es efectivo, por lo que se deben estar generando nuevas estrategias de manejo para aplicarlas de una manera conjunta y no de manera aislada. Se debe garantizar la sanidad de los cultivos y sobre todo que se llegue a un equilibrio en la población de microorganismos en los suelos cultivados y que los patógenos se mantengan en niveles donde el impacto económico sobre los cultivos sea mínimo (Zavaleta, 1999). Las alternativas que actualmente se han desarrollado para el manejo de la marchitez por *Fusarium* con origen en el suelo tienen un enfoque de manejo integrado (Pulido *et al.*, 2012).

En la producción de vainilla se habla de un manejo sustentable del cultivo en el cual las prácticas para el control de las enfermedades consisten en manejo de la densidad de población, regulación de la luz-sombra (Azofeira *et al.*, 2014), aplicación de materia orgánica, empleo de esquejes sanos en nuevas plantaciones, establecimiento de parcelas en terrenos con buen drenaje, evitar la sobrepolinización (Hernández, 2011); aplicación de composta y vermicomposta (González *et al.*, 2016), empleo de híbridos resistentes, y conservación en bancos de germoplasma resistente y silvestre para mejoramiento genético (Bello *et al.*, 2015). También se propone como medida dentro de un programa de manejo integrado el cultivo *in vitro*, el cual es una técnica ampliamente utilizada para obtener plantas libres de patógenos tanto en vainilla y otros cultivos. Mediante esta técnica también se pueden obtener altas densidades de plantas en un tiempo relativamente corto y con el desarrollo de híbridos se puede incrementar la variabilidad genética en poblaciones de vainilla (Menchaca *et al.*, 2011). Para el manejo de la marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* se han reportado como alternativas la aplicación de microorganismos con capacidad antagonista bajo condiciones *in vitro*, tales como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* que tienen un efecto inhibitor en el crecimiento del patógeno (Gangadhara *et al.*, 2010). En suelo de la rizósfera de vainilla existen poblaciones de microorganismos en convivencia con los patógenos de las raíces sobre las que ejercen una función antagonista. *Trichoderma* spp., y *Pseudomonas* spp., al ser inoculados de manera conjunta a las plantas activan sus mecanismos naturales de defensa, producen sustancias promotoras del crecimiento y compiten con los patógenos por espacio y nutrientes (Sandheep *et al.*, 2012). Algunas cepas de *F. oxysporum* sólo viven como saprófitos en la rizósfera y se les conoce como no-patogénicas y han mostrado varios modos de acción como competencia por nutrientes en el suelo, reducción de la germinación de clamidiosporas, competencia por sitios de infección

sobre la raíz, y al invadir las raíces inducen resistencia sistémica (Kaur *et al.*, 2010). Otros grupos de hongos de importancia ecológica con potencial para el manejo de enfermedades son los endófitos y las micorrizas. Los endófitos son aquellos que colonizan el tejido vivo sin causar un daño de manifestación inmediata (asintomáticos) estableciendo interacciones simbióticas de parasitismo, comensalismo y mutualismo (Stone *et al.*, 2017) y algunos actúan como promotores del crecimiento y resistencia de la planta (Kaur *et al.*, 2010).

Por otra parte, las micorrizas son aquellos que colonizan los tejidos, pueden realizar su fase de esporulación (conidiogénesis) en el suelo, ayudan a la planta a adquirir nutrientes del suelo poco disponibles para ellas y compiten por espacio con los fitopatógenos (Stone *et al.*, 2017). En orquídeas, el grupo de hongos benéficos más estudiados son las micorrizas, muchas de las cuales son indispensables para la germinación de semillas de orquídeas y se han documentado en la mayoría de los casos al género-forma *Rhizoctonia* en raíces, especialmente en el género *Vanilla*. También se han reportado las fases sexuales *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Tulasnella* asociados a las raíces (Otero *et al.*, 2002). La fase sexual (teleomorfo) más común en raíces de vainilla es *Ceratobasidium* y su importancia radica en que funciona como promotor del crecimiento (Porrás y Bayman, 2007). También se ha encontrado de manera frecuente a otros endófitos como especies de *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* y *Xyllaria* (Chen *et al.*, 2012).

Diversos trabajos se han realizado sobre el control de patógenos de las raíces como resultado del efecto de suelos supresivos, proceso en el que hay una disminución de las poblaciones de organismos patógenos por efecto de antibiosis, parasitismo, depredación y/o competencia (Cha *et al.*, 2015). También se reporta que las propiedades físico-químicas del suelo incluyendo pH, materia orgánica y contenido de arcilla influyen directa e indirectamente en la capacidad supresiva de la enfermedad a través del impacto sobre la actividad microbiana del suelo (Chandrashekara *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2017).

Epidemiología

Las epidemias tienen un determinado comportamiento durante su desarrollo, por lo cual su impacto y las pérdidas que ocasionan están en función del progreso e intensidad de la enfermedad que causan. Son fenómenos cíclicos (ciclos repetidos del desarrollo del patógeno en relación al hospedante y condiciones ambientales) y se pueden describir como epidemias monocíclicas, policíclicas o poliéticas y su comportamiento también está en función del sistema de producción de cada región (Arneson, 2006). Conocer el comportamiento de una epidemia permite determinar parámetros como la tasa de incremento de la enfermedad, la

dinámica de la incidencia y la severidad en el tiempo y el espacio en relación a la fenología del cultivo y las condiciones del ambiente, lo cual puede modelarse para establecer el progreso de la epidemia y mediante esto, elegir una medida de control adecuada, y la mejor estrategia de manejo para la enfermedad (van der Plank, 1963).

Importancia de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos

Los hongos patógenos de plantas se encuentran distribuidos en todo el mundo y son de importancia ecológica y económica debido a que causan enfermedades destructivas en cultivos agrícolas y poblaciones silvestres de plantas. La virulencia de éstos hongos es favorecida por la producción y secreción de enzimas que facilitan la infección (de Guillen *et al.*, 2015). Constituyen el grupo más numeroso de fitopatógenos y causan daños que inicialmente se presentan a niveles bajos (pocas plantas y poco tejido afectados) y se vuelven de interés económico cuando su incidencia y severidad incrementan con el tiempo (Arneson, 2006).

La enfermedad se produce exitosamente cuando se da la interacción de un patógeno virulento sobre un hospedante susceptible, influenciado por factores ambientales conducivos (Arauz, 1998). A escala global o continental las enfermedades han logrado establecerse debido a las diferentes capacidades de los patógenos de plantas, como en el caso de algunos hongos que tienen capacidad para dispersarse a largas distancias y muchas plantas han sido redistribuidas desde sus lugares de origen a otras regiones, lo cual ha contribuido al brote de epidemias devastadoras en poblaciones de hospedantes sumamente susceptibles (Brown y Hovmoller, 2002).

Una epidemia que ha provocado daños devastadores en la historia de la humanidad tanto fitopatológicos, sociales y económicos es el tizón tardío de la papa, causado por *Phytophthora infestans* que fue introducido a Europa en 1845 de donde se extendió a diferentes países hasta llegar a Irlanda, país en el cual toda la población subsistía de dicho tubérculo. La destrucción de campos cultivados alcanzó niveles catastróficos (Reader, 2009). Turner (2005), menciona que la consecuencia de esta pandemia fue una hambruna que provocó la muerte de alrededor de un millón de personas y el resto de la población irlandesa se vió obligada a migrar a otros países, principalmente Estados Unidos de América. En la actualidad *P. infestans* sigue siendo el principal patógeno de importancia en el cultivo de papa, su evolución ha generado diversidad genética de la especie (Yoshida *et al.*, 2013) y con

capacidad para causar enfermedad en otros hospedantes económicamente importantes como el jitomate y otras solanáceas (Beckett *et al.*, 2006).

Otra epidemia causada por un hongo surge en 1970, época en la que casi el 85% de los campos de maíz en Estados Unidos de América estaban sembrados con un solo genotipo de maíz conocido como maíz citoplasmático masculino estéril de Texas (Tcms) el cual resultó sumamente susceptible al hongo *Bipolaris* (syn. *Helminthosporium maydis*) raza T (tizón sureño de la hoja del maíz). Éste patógeno empezó a invadir las áreas maiceras donde las condiciones meteorológicas de alta humedad, más las características del hospedante, permitieron que la epidemia se propagara y devastara del 50-100% de las áreas cultivadas con maíz. Las pérdidas económicas se valoraron alrededor de mil millones de dólares y se considera que la pérdida real de alimento fue mayor que la causada por *Phytophthora infestans* en Irlanda (APS, 2017). Actualmente *B. maydis* predomina en zonas con climas tropical húmedo, templado y con temperatura ambiental de 20 a 30 °C y se ha convertido en una de las enfermedades más prevalentes y severas del maíz en China, Filipinas, India, Indonesia, Kampuchea, Nepal, Pakistán y Vietnam (Singh y Srivastava, 2012). Otras enfermedades causadas por hongos y que se han convertido en epidemias devastadoras son *P. parasitica* y *P. cinnamomi* causantes de la devastación del castaño americano (*Castanea crenata*) en Estados Unidos, la mancha foliar del trigo por *Micosphaerella graminis*, originaria de México y que se extendió a diversos países (Giraud *et al.*, 2010).

Otro organismo de relevancia ecológica y económica por la destrucción que ha causado, es el Oomycete *P. cinnamomi* el cual provocó la destrucción de poblaciones naturales de *Eucalyptus marginata* en Australia y hasta 1971 había provocado la devastación de aproximadamente 121,401.7 ha y también tuvo la capacidad para infectar otras poblaciones de especies de plantas endémicas (Dell *et al.*, 2005). Para el año 2002 el área afectada ascendió a 2 millones de hectáreas (Gobierno de Australia, 2017). La roya del tallo en trigo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* raza Ug99) es otra epidemia que causa severas pérdidas cuyo origen se registró en Uganda en 1999 y es la única raza conocida que presenta virulencia a un gen de resistencia (Sr 31) del trigo. En Kenia y Uganda se registraron pérdidas en el rendimiento de hasta el 80% (More *et al.*, 2017). En 1869 en África oriental se describió la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) como una epidemia devastadora y que se ha extendido por África, América y Asia donde causa pérdidas altamente significativas en el rendimiento (Talhinhas *et al.*, 2017).

Tanto en agroecosistemas como en sistemas naturales, las epidemias causadas por hongos han generado importantes impactos en cultivos agrícolas y poblaciones de árboles forestales, lo

que ha generado serias consecuencias tanto económicas como políticas. La epidemiología ha desarrollado herramientas y metodologías que permiten entender el comportamiento temporal y espacial de las enfermedades, con el objetivo de brindar el conocimiento que permita establecer un buen manejo de éstas (Bălasu, 2009). Las epidemias cada vez son más comunes en los sistemas de producción agrícola y a través del tiempo se presentan nuevas enfermedades infecciosas reemergentes que afectan a los ecosistemas naturales a ritmos acelerados como respuesta al incremento de la movilidad humana, el cambio climático y la creación de nuevas condiciones del hábitat (Meentemeyer *et al.*, 2012).

Importancia de las epidemias en cultivos tropicales

Se considera que los ecosistemas más antiguos se encuentran en los trópicos y se caracterizan por ser megadiversos, altamente evolucionados y poco comprendidos. Sus condiciones ambientales y la presencia de un hospedante susceptible por largos periodos de tiempo al daño causado por organismos fitopatógenos favorecen el desarrollo de enfermedades que con el tiempo su manejo se vuelve difícil (Ploetz, 2007). El 70% de las enfermedades de las plantas son causadas por hongos, y en los agroecosistemas tropicales las epidemias se convierten en problemas muy serios debido a que la mayoría de los cultivos son perennes. Un ejemplo es la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* y sus diversas formas especiales que en sistemas anuales es una de los principales problemas con origen en el suelo, y en cultivos tropicales éste patógeno puede causar devastaciones severas (Ploetz, 2007).

La mayoría de los estudios epidemiológicos se han desarrollado en un amplio grupo de patógenos de la parte aérea de la planta como el caso de *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *H. vastatrix*, *M. fijiensis* y *Oidium manguiiferae*, (Mora *et al.*, 2014). Para el caso de patógenos de la raíz las investigaciones se han enfocado a *Phytophthora*, *Phymatotrichum*, *Pythium* y *Rhizoctonia* por su amplia distribución y rango de hospedantes. Hace falta desarrollar investigaciones con enfoques integrados, ecológicos y por períodos de tiempos largos (10 años al menos), que permitan obtener un conocimiento completo sobre el comportamiento espacio-temporal de las epidemias causadas por estos patógenos de las raíces (Rodríguez, 2001).

El estudio de las epidemias causadas por hongos fitopatógenos son de importancia porque además de afectar a las poblaciones de plantas producen pérdidas de rendimiento y económicas en cultivos agrícolas, con alto impacto social (James, 1974). Los daños y las pérdidas son mayores en los monocultivos comparado con sistemas de producción

intercalados (Thurston, 1992) y los patógenos de cultivos perennes tienen la capacidad de acumular inóculo para generar nuevas infecciones (Ploetz, 2007). En el caso de la roya del caféto (*H. vastatrix*) hasta el 2005 había afectado el 71.4% de los genotipos de café (Alvarado y Moreno, 2005). El mal de panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4) representa otra epidemia de alto impacto en el cultivo de plátano, la cual durante el periodo de 1993-2003 causó pérdidas económicas de alrededor de 11 millones de dólares en Lampung, Indonesia y actualmente es una enfermedad cuarentenada (Sotomayor, 2012).

En las regiones tropicales y subtropicales se producen los cultivos de caña de azúcar, cítricos, mango, plátano y piña y recientemente en las regiones tropicales de México se reportan también como cultivos económicamente importantes al cacao, estevia, jatropha, hule, palma de aceite, palma de coco, pimienta y vainilla. Algunos de estos cultivos perennes son de reciente introducción en zonas donde no se cultivaban (del Castillo, 2011). Ploetz (2003) menciona como importantes a las anonáceas, carambolo, gradadilla, litchi, mangostán, maracuyá y papaya. Algunos de estos cultivos son endémicos y son afectados por diferentes enfermedades cuyos agentes patógenos han coevolucionado con su hospedante en diferentes patosistemas; mientras que las enfermedades más severas son causadas por patógenos de nuevo encuentro para los cuales se deben desarrollar estrategias de manejo efectivas y duraderas (Ploetz, 2007).

En el estudio de las epidemias, considerar los aspectos ambientales como temperatura y humedad es de vital importancia para entender las diferentes interacciones que se dan en los agroecosistemas y lograr establecer estrategias para un manejo con enfoque holístico o agroecológico (Cilas *et al.*, 2015).

Importancia de la epidemiología en el manejo integrado y ecológico de las enfermedades causadas por patógenos de las raíces

El suelo es un hábitat que favorece el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos, frecuentemente se encuentran más bacterias y hongos, y algunos de éstos tienen la capacidad de inducir enfermedades en las plantas (Lucas, 2006). En el caso particular de los hongos, su comportamiento en el suelo como patógeno de raíces se ha convertido en un caso de estudio complejo que involucra la ecología de estas interacciones (Park, 1963). Se considera que estas relaciones funcionales que los hongos patógenos de las raíces y sus hospedantes establecen en el tiempo y espacio tienen importancia ecológica y epidemiológica. Desde un enfoque epidemiológico dos funciones que explican dicho comportamiento son, la Curva de Crecimiento de la Enfermedad y la Curva de Daño

(Rodríguez, 2001). La curva de crecimiento de la enfermedad representa la incidencia (número de individuos enfermos) y la severidad (grado de daño) a través del tiempo (van der Plank, 1963). Ésta curva de progreso temporal se puede interpretar y cuantificar mediante modelos de crecimiento, o del cálculo del área bajo la curva o aplicando el análisis de varianza de mediciones repetidas en el tiempo (Zadocks, 1971; Madden *et al.*, 2007). La curva de daño es una función entre la intensidad de la enfermedad (incidencia y severidad) y el rendimiento o pérdida de producción del hospedante provocada por el patógeno. Esta curva de daño está compuesta por cinco fases. La primera es la zona de tolerancia (la intensidad de la enfermedad no causa reducción del rendimiento), la segunda es un nivel crítico o umbral fisiológico de daño (el rendimiento disminuye levemente porque la planta aún presenta cierta capacidad de compensación), la tercera fase es de descenso donde hay un decremento abrupto del rendimiento al incrementar la severidad, la cuarta fase es de competencia (el descenso en el rendimiento por unidad adicional de plaga va disminuyendo por competencia dentro de la misma población patógena), y en la etapa final la enfermedad alcanza su nivel máximo y ya no ocurre una disminución adicional del rendimiento (Arauz, 1998).

Las epidemias y muchos otros procesos biológicos son comportamientos dinámicos en la naturaleza y se caracterizan por el cambio en una variable con respecto al cambio de otra, tanto en el tiempo como en el espacio. Particularmente una epidemia es caracterizada por el cambio en la intensidad de la enfermedad en relación al cambio en el tiempo, dicho cambio es comúnmente llamado *tasa*, está representada por la letra *r*, y es fundamental para comprender y describir el comportamiento temporal de la enfermedad (Campbell y Madden, 1990). En el caso de la dinámica espacial de las enfermedades causadas por organismos fitopatógenos, también se mide la dispersión de las epidemias en relación a la distancia, aplicando modelos empíricos y/o modelos físicos (Kranz y Rottem, 1991).

Conocer el comportamiento dinámico y espacio-temporal de las enfermedades es indispensable para poder generar estrategias de manejo e incluirlas dentro de un plan integrado con enfoque holístico y agroecológico.

Algunos ejemplos de enfermedades causadas por patógenos de las raíces, y que se han estudiado bajo un enfoque epidemiológico son los realizados con el Oomyceto *P. cinnamomi* que provoca la enfermedad que en México se le conoce como tristeza del aguacatero y en un trabajo sobre manejo integrado realizado en Atlixco, Puebla durante siete años, se determinó que la incidencia de éste patógeno disminuyó significativamente mencionar que aspecto epidemiológicos se considraon y que estrategias aplicaron (Téliz *et al.*, 1992). Otro ejemplo es el caso de árboles comerciales de abeto (*Abies fraseri*) evaluó la incidencia y mortandad de

plantas en tres y cuatro años, y se determinó que las plantas enfermas presentaban una disposición espacial en agregación, y este comportamiento de la enfermedad estuvo en función de las condiciones de sequía (Benson *et al.*, 2009).

P. cinnamomi también es patógeno en sistemas naturales, en el suroeste de Australia ha causado una de las epidemias más devastadoras en los bosques naturales de *Eucalyptus marginata* y *Banksia*, en el bioma forestal de *Banksia*. En éste sistema el inóculo viable se encuentra en la superficie del suelo durante la primavera, durante el verano es más frecuente a los 30 cm bajo la superficie del suelo y en invierno es más frecuente a un metro de profundidad y su comportamiento espacial el inóculo se presenta en agregados (Shearer *et al.*, 2010).

Otro hongo patógeno de las raíces de relevancia económica por los daños que ocasiona en las zonas templadas es *Sclerotium cepivorum* agente causal de la pudrición blanca de la cebolla y uno de los principales problemas que limitan la producción de esta liliácea. En investigación realizada en el cultivo de la cebolla en la Región del Bajío en México (Ponce *et al.*, 2008) se determinó su comportamiento temporal bajo tres densidades diferentes de inóculo (baja, media y alta); las epidemias resultantes se ajustaron a diferentes modelos de crecimiento, se determinó la tasa de incremento y se reportó que a mayor densidad de inóculo la incidencia máxima de la enfermedad se presenta en etapas tempranas del cultivo. Conocer estos aspectos epidemiológicos proporcionan más información para entender y predecir el comportamiento de la enfermedad y con ello establecer estrategias de manejo (Ponce *et al.* 2008).

Importancia de la epidemiología en la enfermedad marchitez de raíces y tallos en vainilla

El patógeno causante de la marchitez de raíces y tallo en la vainilla *Fusarium oxysporum*, causa daños severos cuando las temperaturas del ambiente son de 26 a 30 °C y cuando es el período de lluvias (Sussela y Dhanesh, 2008). La infección inicia cuando el hongo invade las células de la raíz, ocasionalmente puede penetrar por la epidermis pero la invasión ocurre más fácilmente cuando existe una herida y el daño avanza desde la parte apical de las raíces hacia la base o cuello de la planta dando origen a una pudrición. Como consecuencia la planta presenta una marchitez. El estrangulamiento del tallo y muerte de la planta puede ocurrir a los 15 días después de iniciada la infección (Xia-Hong, 2007). En plantaciones ubicadas en la India, la incidencia de la enfermedad puede presentarse del 50 al 100% y los síntomas más frecuentes son pudrición de raíces, tallos y marchitez (Sussela y Danesh, 2008).

El pH del sustrato y la temperatura son determinantes para el crecimiento y desarrollo de los hongos que habitan el suelo y se ha demostrado que la temperatura óptima para el crecimiento en condiciones artificiales son de 25 °C para *F. oxysporum* y 28 °C para *F.solani*; ambos patógenos crecen en un pH entre 5.0 y 6.0 (Gangadhara *et al.*, 2010). La temperatura óptima para a la cual se da la infección por *Fusarium* es de 25-28 °C (Booth, 1971).

La incidencia de la enfermedad está influenciada por el sistema de producción y los mayores daños de la marchitez por *F oxysporum* se da en el sistema tradicional con un 50% de incidencia y mayores niveles de severidad en comparación con los sistemas intensivo y temporal (Sánchez *et al.*, 2001). La severidad está determinada por la variación patogénica e izoenzimática de las cepas de *Fusarium* causantes de la marchitez y pudrición de raíces (Adame *et al.*, 2011). La incidencia de la enfermedad está en función del inóculo presente en el suelo, con el transcurso de los años.

Actualmente los estudios de la marchitez en vainilla, han estado enfocados a la caracterización, virulencia, filogenia y control del patógeno; sin embargo, existen escasos trabajos e investigaciones sobre los aspectos epidemiológicos de este patosistema en los que se analice el comportamiento temporal de la incidencia y severidad en relación al daño en la producción y en relación al manejo de los sistemas de producción, así como su vínculo con la fenología del cultivo y las condiciones climáticas.

LITERATURA CITADA

- Adame GJ, Trigos LAR, Iglesias AGL, Flores EN and Luna RM. 2011. Isoenzimatic and pathogenic variations of *Fusarium* spp. associated with *Vanilla* stem and root rotting. Tropical and subtropical agroecosystems 13: 299-306.
- Adame GJ, Rodríguez GR, Iglesias AL, Ramos, PM and Luna RM. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. Botanical Sciences 93 (3): 669-678.
- Alvarado AG, y Moreno RLG. 2005. Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra x Híbrido de Timor. Cenicafé 56(2): 110-126.
- American Phytopathological Society. 2017. Historical perspectives of plant disease. Online (Consultado el 23 Septiembre de 2017). Recuperado de <https://www.apsnet.org/EDCENTER/K12/TEACHERSGUIDE/PLANTBIOTECHNOLOGY/Pages/History.aspx>.
- Arau CLF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Ed. Universidad de Costa Rica. 471p.
- Arneson PA. 2006. Epidemiología de las enfermedades de las plantas: los aspectos temporales. American Phytopathological Society. DOI.10.1094/PHI-A-2001-0524-01.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2002. De nuestra cosecha: la vainilla en México, una tradición con un alto potencial. ASERCA. Talleres gráficos de México. 44p.
- Ashoka S. 2005. Stuides on fungal pathogenies of *Vanilla* with special references to *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. Thesis (Master).Department of Plant Pathology College of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, Dharwad. 81p.
- Atala C, Pereira G, Romero C, Muñoz-Tapia L, Vargas R and Suz LM. 2015. Orchidioid fungi of the form-genus *Rhizoctonia* associated with the roots of *Chloraea cuneata* Lindl. From Araucanía, Chile. Gayana Bot. 72(1): 145-148. DOI: 10.13140/RG.2.1.2262.2562
- Australian Government: Departament of the Environment and Energy. 2017. Management of *Phytophthora cinnamomi* for biodiverity conservation in Australia. Part 3-Risk assessment for threats to ecosystems, species and communities: A review. Recuperado de <http://www.deh.gov.au/about/publications/index.html>).

- Azeez S. 2008. Vainilla. In: Parthasarathy, A.V., Chempakam, B. y Zachariah, J. T. Chemistry of spices. CAB international. pp: 287-311.
- Azofeira BJB, Paniagua VA y García GJA. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25(1): 189-202.
- Bălasu AG, Cristea S, Zală CR. and Oprea M. 2015. The biological growth parameters of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *glycinis*, fungus. *Rumanian Biotechnological Letters* 6(20):10921-10928.
- Barrera R.A, Herrera CH, Jaramillo VJL, Escobedo GJS y Bustamante GA. 2009. Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10:199-212.
- Bautelspacher BCR. 2013. Guía de orquídeas de Chiapas. 2^{da} edición. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 187p.
- Becktell MC, Smart CD, Haney CH and Fry WE. 2006. Host-pathogen interaction between *Phytophthora infestans* and the solanaceous host *Calibrachoa x hybridus*, *Petunia x hybrida*, and *Nicotiana benthamiana* 90(1): 24-32 DOI.10.1094/PD-90-0024.
- Bello BJJ, García GGG y Iglesias AL. 2015. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento in vitro. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 38(2): 165-171.
- Benson DM, Grand LF, Vernia CS and Gottwald TR. 2006. Temporal and spatial epidemiology of *Phytophthora* root rot in Fraserfir plantations. *Plant Dis.* 90: 1171-1180.
- Berendsen L, Pieterse, CMJ and Baker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health Roeland. *Trends in plant science* 17(8): 478-486.
- Bhai R, Iahwara B and Anandaraj M. 2006. Yellowing and premature bean dropping in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Journal of Plantation Crops* 34 (2): 115-117.
- Bhai RS and Thomas J. 2000. Phytophthora rot- A new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. *Journal Spices Aromatic Crops* 9(1): 73-75.
- Bhai, R. S. and Dhanesh, J. 2008. Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 17(2): 140-148.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Eastern Press, Londres. 237p.
- Bory S., Grisoni MFD and Besse P. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 551-571.

- Bridge PD, Singh T and Aroka DK. 2004. The application of molecular markers in the epidemiology of plant pathogenic fungi. In: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications 21: 57-68.
- Brown JK and Hovmøller MS. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* 297(5581): 537-41. DOI: 10.1126/science.1072678.
- Campbell LC and Madden VL. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York 532p.
- Cameron K. 2011. Vanilla orchids: natural and history cultivation. Timber Press 211p.
- Carrillo GR y González CMCA. 2016. Prácticas que favorecen la nutrición en el cultivo comercial de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9(9): 23-24.
- Cha JY, Han S, Hong JJ, Cho H, Kim D, Kwon Y, Kwon SK, Crüsemann C, Lee YB, Kim, JF, Giaever G, Nislow C, Moore BS, Thomashow LS, Weller MD, and Kwak YS. 2016. Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. *The ISME Journal. Multidisciplinary Journal of Microbial ecology.* 10(1): 119-129. DOI: 10.1038/ismej.2015.95
- Chandrashekara C, Bhatt JC, Kumar R and Chandrashekara KN. 2012. Suppressive soils in plant disease management. *Eco-friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management.* pp: 241-256. DOI: 10.13140/2.1.5173.7608.
- Chen J, Wang H and Guo S. 2012. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 22: 297-307 DOI: 10.1007/s00572-011-0404-0.
- Cilas CGFR, Babin R and Avelino J. 2016. Tropical crop pests and diseases in a climate change setting—A few examples. In: Torquebiau E.(eds) *Climate change and agriculture worldwide.* Springer. 348p.
- Couteaudier Y and Alabouvette C. 1990. Survival and inoculum potential of conidia and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* in soil. *Can J Microbiol.* 36(8): 551-6.
- Covert SF, Briley A, Wallace MM and McKinney VT. 1999. Partial *MAT-2* gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genet. Biol.* 28: 43-54.

- De Guillen K, Ortiz VD, Gracy J, Fournier E, Kroj T, and Padilla A. 2015. Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *Plos Pathogens*. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005228>.
- Del Castillo CPE. 2011. El trópico mexicano: una potencia productiva. AAPAUNAM. *Cultura*. pp: 117-118.
- De la Cruz JM, Rodríguez JGC y García SH. 2009. Vanilla: post-harvest operations. 50p.
- Dell B, Hardy G and Vera K. 2005. History of *Phytophthora cinnamomi* management in Western Australia. Proceedings 6th National conference of the Australian forest history society Inc, Michael Calver *et al.* (eds). Millpress, Rotterdam. pp: 391-406.
- Demers JE, Gugina BK and Gasco MJ. 2015. Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 81(1): 81-90.
- El-Abyad MS and Saleh YE. 1971. Studies with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasifectum*, the cause of cotton wilt in Egypt: Germination, sporulation and growth. *Transactions of the British Mycological Society* 57(3): 427-437.
- FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Gangadhara NB, Nagaraja R, Basavaraja MK and Krishna NR. 2010. Variability studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* isolates. *International Journal of Science and Nature* 1(1): 12-16.
- Gangadara NB, Saifulla Nagaraja R and Basavaraja MK. 2010. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, the casual agent of stem rot of Vanilla *in vitro*. *International Journal of Science Nature*, 1(2): 259-261.
- Garibaldi A, Guglielmone L, and Gullino ML. 1991. Role of rhizosphere. Competence on antagonistic activity of saprophytic *Fusarium* spp. In: *Biotic interactions and soil-borne diseases*. Elsevier Science Publishers. B.V. 23:301-305.
- Garrett SD. 1970. *Pathogenic root infecting fungi*. New York. Cambridge University Press. 292p.
- González AIJ, Gómez JR, Lang OFP, Álvarez BA y Balderas PG. 2014. Hongos fitopatógenos en suelos agrícolas de la costa de Nayarit. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto 28.41p.
- González CMCA, Carrillo GR y Villegas MA. 2016. Manejo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) con vermicompost. *Agroproductividad* 9(9): 9-10.

- Gordon TR and Martyn RD. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 111-128. DOI: 10.1146/annurev.phyto.35.1-111.
- Gordon TR. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. Annual Review. 55: 23-39.
- Hágsater E, Soto AMA, Salazar CGA, Machorro R J, López RMA y Dressler RL. 2005. Las orquídeas de México. Herbario AMO. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. Missouri Botanical Garden y Jardín Lankester, Universidad de Costa Rica. 304p.
- Havkin-Frenkel D and Belanger F. 2011. Handbook of vanilla science and technology. Ed. Wiley-Blackwell.
- Hernández HM 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) establecimiento y mantenimiento. INIFAP. 25p.
- Hernández AM, Garcés RY, Yáñez OO y Hinojosa DI. 2016. Identificación de polinizadores naturales de *Vanilla planifolia* Jacks, ex Andrews. Agroproductividad. 9: 121-122.
- Hollyday P. 1995. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University Press. 624p.
- Imazki I and Kadota I. 2015. Molecular phylogeny and diversity of *Fusarium* endophytes isolated from tomato stems. FEMS Microbiology Ecology 91(9): 16.
- James WC, 1974. Assessment of plant diseases and losses. Annu. Rev. Phytopathol. 12: 27-48.
- Jeffrey KS, Polishook JD and White JF. 2012. Endophytic fungi. pp: 242-269. DOI. 10.13140/2.1.38352169.
- Jeger MJ. 2009. Epidemiology of Plant Disease. eLS. 315p.
- Karim NFA, Mohd M, Nor NMIM and Zakaria L. 2016. Saprophytic and potentially pathogenic *Fusarium* species from peat soil in perak and pahang. Tropical Life Sciences Research 27(1): 1-20.
- Kaur R, Kaur J and Singh R. 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. Plant Pathology Journal 9(3): 79-91. DOI.10.3923/ppj.2010.79.91.
- Kourí HE. 2000. La vainilla de Papantla: agricultura, comercio y sociedad rural en el siglo XIX. Signos Históricos 2(3): 105-130.
- Koyyappurath S, Atuahiva T, Le R, Batina H, Le-Squin S, Gautheron N, Edel HV, Peribe J, Jahiel M, Steinberg C, Liew EY, Alabouvette C, Besse P, Dron M, Sache I, Laval V and Grisoni M. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of *Vanilla*. Plant Pathology 65: 612–625.

- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. 386p.
- Lockwood JL. 1977. Fungistasis in soils. Biol. Rev. 52: 1–43.
- Lucas P. 2006. Diseases caused by soil-born pathogen. The Epidemiology of Plant Diseases. pp: 373-386. DOI: 10.1007/1-4020-4581-6_14.
- Magliano TMA, Kikot GE. 2013. Fungal Infection and Disease Progression. *Fusarium* spp. Enzymes associated with pathogenesis and loss of commercial value of wheat grains. In: Alconada M. T. y Chulze S. (eds) *Fusarium* head blight in Latin America. Springer, Dordrecht. pp: 99-122.
- Madden VL, Hughes G and van den Bosh F. 2007. The study of plant disease epidemics. APS PRESS. 241p.
- Meentemeyer KR, Hass SE and Václavík T. 2012. Landscape epidemiology of emerging infections diseases in natural and human-altered ecosystems. Annual Review Phytopathol. 59: 19.1-19.4. DOI: 10.2146/annurev-phyto-081211-172938.
- Menchaca GRA, Ramos PJM, Moreno MD, Luna RM, Mata RM, Vázquez GLM. y Lozano RMA. 2011. Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. Revista Colombiana de Biotecnología. 13(1): 80-84.
- Michelse CB y Rep GA. 2009. Pathogen profil update: *Fusarium oxysporum*. Molecular plant pathology. 10(3): 311-324. DOI:10.1111/J.1364-3703.2009.00538x.
- Mora AG, Acevedo SG, Calderón EG, Flores SJ, Domínguez MS, Baker P, y González GR. 2014. Consideraciones epidemiológicas del cambio climático en la fitosanidad de cultivos tropicales. Revista Mexicana de fitopatología 32 (2): 147-167.
- More D, Geoffrey DD and Trinci APJ. 2017. Black stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* threatens global wheat harvest, 21st Century Guidebook to Fungy. Recuperado de http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch14_08.htm.
- Morrien E and Van der Putten WH. 2013. Soil microbial community structure of range-expanding plant species differs from co-occurring natives. Journal of Ecology 101(5): 1093-1102. DOI: 10.1111/1365-2745.12117.
- Nelson PE. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In Fungal wilt diseases of plants. Eds. ME Mace, AA Bell, CH Beckman. New York Academic. pp: 51–80.

- Otero T, Ackerman JD and Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89(11): 1852-1858.
- Park D. 1963. The ecology of soil-borne fungal disease. *Annual Review of Phytopathology* 1(1): 241-258.
- Pereyra S and Lory GA. 2013. Crop residues and their management in the epidemiology of *Fusarium*. In: *Fusarium* head blight in Latin America. Springer Science Business Media. DOI. 10.1007/978-94-007-7091-1.
- Pinaría AG, Liew ECY and Burgess LW. 2010. *Fusarium* species associated with *Vanilla* stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology* 39: 176–183.
- Ploetz RC. 2003. Diseases of Tropical Fruit Crops. CAB International. 544p. Ploetz RC. 2005. *Fusarium*-induced diseases of tropical perennial crops. *Phytopathology* 96: 648-652.
- Ploetz RC. 2007. Disease Management in Tropical Perennial Crop. *Palmas* 28:326-338.
- Ponce HV, García ER, Rodríguez, GMP y Zavaleta ME. 2008. Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia* 42(1): 71-83.
- Porras AA and Bayman P. 2007. Micorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity specificity and effects on seed germination and plant growth. *Micología* 99(4): 510-525.
- Pulido HA, Zavaleta ME, Cervantes DL y Grimaldo JO. 2012. Alternativas de control en la pudrición radical de cebolla para el Valle de la Trinidad, Baja California. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3(1): 97-112.
- Reader J. 2009. Potato: a history of the propitious esculent. New Haven: Yale University Press.
- Rodríguez GE and Mendgen K. 1995. The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. First publ. In: *Protoplasma*. Pp: 61-72. DOI.189. .10.1007/BF01280291.
- Rodríguez GMP. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*. pp: 53-78.
- Rubio RG, Baltodano SF, Abanto CL, Wilson KJ y Muñoz RM. 2008. Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. *Revista Biológica de la Universidad de Trujillo, Perú*. 28 (2): 34-46.
- SAGARPA, 2016. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, Vainilla mexicana. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257086/Potencial-Vainilla.pdf>.
- Saldívar IP. 2015. Cultivo de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Ed. Universidad del Estado de México. 41p.

- Sánchez MS, Becerril RAE, Tijerina CL y Santizo RJA. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Rev. Fitotec. Méx.* 24(1): 49-56.
- Santa CC, Montoya MM. Díez MC. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista Mexicana de Micología* (32): 23-34.
- Sandheep RA, Asok AK, Jisha MS. 2012. Biocontrol of *Fusarium* wilt of vanilla (*Vanilla planifolia*) used combined inoculation of *Trichiderma* sp. and *Pseudomonas* sp. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 3(3):706–716.
- Shearer BL, Dillon MJ, Kinal J and Buehrig, R. M. 2010. Temporal and spatial soil inoculum dynamics following *Phytophthora cinnamomi* invasion of *Banksia* Woodland and *Eucalyptus marginata* forest biomes of south-western Australia. *Australasian Plant Pathol.* 39: 293. Recuperado de <https://doi.org/10.1071/AP09095>.
- SIAP, 2016. Cierre de la producción anual (2008-2016). Recuperado de http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/.
- Singh R and Srivastava R. P. 2012. Southern corn leaf blight-an important disease of maize: an extension fact sheet. *Indian Research Journal of Education Special Issue 1:* 334-337.
- Soto AMA. 2006. La Vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. *Biodiversitas* 66:1-9.
- Soto AMA. 2009. Proyecto: Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Herbario AMO, Instituto Chinoín, A.C.
- Sotomayor HI. 2012. La raza 4 del mal de Panamá: amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. INIAP 418. 43p.
- Southworth J. 2012. Biocomplexity of plant-fungal interactions. Wiley Online Library. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118314364>.
- Steinkellner S, Mhammerler R and Vierheilig H. 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal of Plant Pathology* 122: 395-401. DOI.10.1007/s10658-008-9306-1.
- Stirling G, Hayde H, Pattison T and Stirling M. 2016. Soil health, soil biology, soilborne diseases and sustainable agriculture: a guide. CSIRO Publishing. 257p.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimarães L, Várzea V and Silva MDC. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18: 1039–1051. doi:10.1111/mpp.12512.

- Téliz D, Mora A, Velázquez C, García R, Mora G, Rodríguez P, Etchevers J y Salazar S. 1992. Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, Mexico. Proc. of second world Avocado congress. 192pp.
- Thurston HD. 1992. Sustainable practices for plant disease management in traditional farming systems. Westview Press.
- Turner RS. 2005. After the famine: plant pathology, *Phytophthora infestans*, and the late blight of potatoes. *Hist Stud Phys Biol Sci* 35: 341–70. DOI 10.1525/hsp.2005.35.2.341.
- Valdovinos PG, Nava DC, García VE, Villegas MA y González CMDA. 2016. Hongos asociados a a tallos y hojas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9: 27-28.
- Van der plank JE. 1963. Plant diseases: Epidemics and Control. Academic Press. 348p.
- Xia-Hong H. 2007. Bio-control of root rot disease in *Vanilla*. PhD. Thesis. Yunnan Agricultural University. 224p.
- Xiong W, Li R, Ren Y, Liu C, Zhao Q, Wu H, Jousset A, Shen Q. 2017. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla Fusarium wilt disease. *Soil Biology & Biochemistry* 107 (2017) 198e207.
- Yoshida K, Schuenemann VJ, Cano LM, Pais M, Mishra B, Sharma R, Martin FN, Kamoun S, Krause J, Thines M, Weigel D, Burbano HA. 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato Famine. *eLife*. <http://doi.org/10.7554/eLife.0073>.
- Zavaleta ME. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana* 17: 201-207.
- Zadocks JC. 1971. System analysis and the dynamics of epidemics. *Phytopathology* 1(1): 241-258.
- Zadocks JC. 2008. On the potential economy of plant disease epidemics. *Capita selecta in historical epidemiology*. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands. 250p.
- Zhang M, Xu JH, Li G, Yao XF, and Yang XP. 2015. Characterization of the watermelon seedling infection process by *Fusarium* f. sp. *niveum*. *Plant Pathology*. 64: 1076-1084. DOI:10.1111/ppa.12355.

CAPÍTULO I.: EFECTO DE TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE *Vanilla planifolia* Jacks. SOBRE LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA, ASOCIADA A *Fusarium* spp.

**Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018**

1.1. RESUMEN

Se estudió la dinámica temporal de la enfermedad marchitez de la vainilla, bajo tres sistemas de manejo: rústico (SR), convencional (SC) y con tutor naranjo (STN), en relación a las etapas fenológicas del cultivo y las condiciones climáticas. De cada sistema se eligió una plantación de seis años de edad, en Papantla, Veracruz. Se seleccionaron 30 plantas en cada parcela y durante seis muestreos periódicos de mayo a diciembre de 2016, se colectaron raíces y se evaluó incidencia de *Fusarium* spp. y severidad en raíces y densidad de inóculo (DI) en suelo de rizósfera. También se cuantificó biomasa de raíces, número de frutos, hojas, entrenudos, longitud de tallo y rendimiento. El comportamiento temporal de la incidencia y densidad de inóculo fueron descritas por el modelo de crecimiento monomolecular, y la biomasa de raíces, hojas, entrenudos y longitud de tallo por el modelo logístico, en los tres sistemas de manejo. El efecto del manejo se vio reflejado de manera significativa en la severidad, biomasa y producción. El STN presentó el menor IS (25.1%) y ABCPE (529.1 %/día) de severidad, la mayor tasa de incremento de la DI ($r=0.023$ colonias/día) e incidencia ($r=0.006$ %/día), menor pérdida de frutos (16.6%) y mayor rendimiento (150kg), siendo estadísticamente diferente respecto al SR y SC. El SC presentó un IS (32.1%) y ABCPE (1267.7) de severidad, mayor biomasa ($r=0.024$) y producción intermedia (94kg). El SR fue el más afectado con IS (34.6%), menor biomasa ($r=0.011$) y mayor pérdida de frutos (62.5%). Las máximas DI (8.9×10^3 colonias/g de suelo de rizósfera) e incidencia (86.7%) de *Fusarium*, fueron favorecidas por la temperatura y humedad del ambiente; generando infecciones a lo largo del ciclo de cultivo principalmente en las etapas de desarrollo de frutos (junio y septiembre) y crecimiento vegetativo (diciembre), periodos en los que se presentó un incremento en la severidad. Las especies de *Fusarium* más abundantes en todo el ciclo fueron *F. oxysporum* y *F. solani*.

Palabras clave: vainilla, tasas de crecimiento, fenología, densidad de inóculo, severidad, marchitez.

**EFFECT OF THREE CROP PRODUCTION SYSTEMS *Vanilla planifolia* Jacks. ON
VANILLA WILT DISEASE ASSOCIATED TO *Fusarium* spp.**

**Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018**

1.2. ABSTRACT

Vanilla wilt temporal dynamics was studied under different crop production systems, under three crop production systems: rustic (RS), conventional (CS) and with orange tree as tutor plant (OTS), in relation with the phenological stages of the crop and the climatic conditions. A six-year-old plantation was chosen from each system in Papantla, Veracruz. Thirty plants were selected in each plot and during six periodic samplings from May to December 2016, roots were collected and was evaluated the incidence of *Fusarium* spp. in roots, severity and inoculum density (ID) in rhizosphere soil. Root biomass, number of fruits, leaves, internodes, stem length and yield were also quantified. The temporal behavior of the inoculum incidence and density were described by the monomolecular model, and the biomass of roots, leaves, internodes and stem length by the logistic model, in the three management systems. The management effect was reflected significantly in the severity, biomass and yield. The OTS, with respect to the RS and CS, was statistically different with the lower IS (25.1%) and ABCPE (529.1 %/day) of severity, the higher rate of increase of the DI ($r= 0.023$ colonies/day) and incidence ($r= 0.006$ %/day); lower fruit loss (16.6%) and higher yield (150kg). The CS presented an SI (32.1%) and ABCPE (1267.7) of severity, higher biomass ($r=0.024$) and intermediate production (94kg). The RS was the most affected with SI (34.6%), lowest biomass ($r=0.011$) and highest fruit loss (62.5%). A maximum DI (8.9×10^3 colonies/ g^{-1} of rhizosphere soil) and incidence (86.7%) of *Fusarium*, favored by the temperature and humidity of the environment; generating infections throughout the cultivation cycle, mainly in the stages of fruit development (June and September) and vegetative growth (December), periods in which there was an increase in severity. The most abundant *Fusarium* species throughout the cycle were *F. oxysporum* and *F. solani*.

Keywords: vanilla, growth rates, phenology, inoculum density, severity, wilting.

1.3. INTRODUCCIÓN

V. planifolia es una orquídea (Schlüter *et al.* 2007) y la especie más utilizada en la producción comercial (Herrera *et al.* 2012) para la obtención de extracto natural (Geissman, 1973). El cultivo actual en la Región del Totonacapan se mantiene con escasa rentabilidad en pequeñas áreas de 0.25 a 0.5 ha, en los diferentes sistemas de producción (Córdova *et al.*, 2016).

Los diferentes vainillos reciben prácticas culturales de manejo para el buen desarrollo de las plantas, control de enfermedades, dentro de ellas la nutrición y el enraizamiento de guías son de vital importancia (Vargas y Gámez, 2014). En el caso de la nutrición, las plantas obtienen nutrientes a partir de materia orgánica en descomposición; en los vainillales se acostumbra aplicar coberturas de compostas, vermicomposta o residuos de hojarasca de los tutores. El espesor de las coberturas está en función del sistema radical de las plantas y de la humedad, debido a que en condiciones de exceso de humedad y coberturas espesas se favorece el crecimiento de hongos causantes de pudriciones de raíces. El enrizamiento de las guías favorecen la obtención de agua y nutrientes, lo que permite el buen desarrollo de la planta (Hernández, 2011). También se ha determinado que los factores determinantes para el buen desarrollo del cultivo en los sistemas casa sombra y tutor naranjo son la nutrición, humedad relativa y polinización (Barrera *et al.*, 2009).

En todos los sistemas de producción y en todas las regiones del mundo donde se cultiva vainilla, la población de plantas y la producción se ven seriamente afectadas por factores bióticos y abióticos; y el principal es la marchitez causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* que provoca pudrición de raíces y tallos (Pinaría *et al.*, 2010). La temperatura y la humedad relativa son factores determinantes para el brote de la enfermedad, mismos que hacen de la prevención y el manejo una actividad difícil y costosa, sobre todo en sistemas intensivos de producción bajo casa sombra e invernaderos (Sussela y Dhanesh, 2008). El estudio de estos factores ha permitido sugerir la importancia de realizar monitoreos para llevar a cabo un buen manejo del cultivo (Ramos *et al.* 2017). Sin embargo, los estudios epidemiológicos sobre el comportamiento de la enfermedad son escasos, es por tal razón que se desarrolló esta investigación. El objetivo fue conocer el efecto de los sistemas de manejo rústico, convencional (casa sombra) y tutor naranjo, sobre la dinámica temporal de *Fusarium* spp. asociado a la dinámica de la incidencia y severidad de la marchitez de la vainilla en relación a la fenología del cultivo y las condiciones climáticas. Esto con el propósito de definir las etapas del cultivo de mayor susceptibilidad a la marchitez y proponer las mejores estrategias para la prevención y manejo de esta enfermedad.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Localización del área de estudio

Durante los meses de febrero y marzo de 2016, se realizaron muestreos en plantaciones de vainilla en la región del Totonacapan, Veracruz, donde se seleccionaron tres vainillales (Figura 4) establecidos bajo los sistemas de manejo rústico (SR), convencional (SC) y en tutor naranjo (STN). Los tres huerto se seleccionaron en el municipio de Papantla, Veracruz, en plantaciones de seis años de edad.

1. La plantación bajo manejo rústico se ubicó en la comunidad “Islas de Juan Rosas” (coordenadas 20° 21' 28" N y 97° 11' 3" W), establecida bajo malla sombra (al 50%), teniendo como tutor árboles denominados pichoco (*Erythrina* sp.), sistema de riego por microaspersión y un manejo fitosanitario precario (Fig. 1.1.A).
2. El vainillal con manejo convencional se ubicó en la comunidad “Solteros de Juan Rosas” (20° 20' 19" N y 97° 12' 4" W), establecido sobre árboles tutor pichoco, bajo malla sombra (al 50%), riego por microaspersión, prácticas básicas para el control de plagas y enfermedades (podas de sanidad, aplicación de extractos vegetales) y aplicaciones periódicas de materia orgánica (Fig. 1.1.B).
3. El sistema establecido con árboles de naranjo como tutor se ubicó en “Montañas de Zaragoza” (20° 20' 41" N y 97° 10' 21" W) donde las plantas de vainilla crecen recibiendo el manejo que se le dá al huerto de naranjo (Figura 1.1.C); carece de sistema de riego, por lo que depende de la época de lluvias. La principal práctica es el control de malezas que se incorporan al suelo como materia orgánica y a los árboles se les aplican abonos foliares y podas.



Figura 1.1. Vainillales ubicados en Papantla, Veracruz: A) manejo rústico, B) manejo convencional y C) manejo en tutor naranjo.

1.4.2 Selección de plantas de vainilla para evaluación

En cada huerto se seleccionaron 30 plantas de vainilla, con base a una observación visual de plantas sanas, plantas con severidad media (manchas necróticas en hojas y tallos, amarillamiento) y severidad alta (plantas con abundantes manchas necróticas, amarillamiento de hojas y tallos, pudrición de raíces y tallo). En cada una de las plantas seleccionadas se evaluó: *i*) Incidencia y severidad de la marchitez (%) en raíces, *ii*). Densidad de inóculo del patógeno en suelo de rizósfera (cantidad de propágulos g⁻¹), y *iii*). Biomasa de raíces (g). Para ello se realizaron seis muestreos durante el periodo mayo a diciembre de 2016.

1.4.3 Evaluación de incidencia y severidad de la enfermedad en raíces

De las raíces seleccionadas de cada planta para la obtención del suelo de rizósfera y evaluación de la densidad de inóculo del patógeno, se tomó una muestra de 1.0 g de raíces con síntomas de marchitez y se lavaron con agua corriente, eliminando el exceso de suelo. A partir de estas raíces se cortaron 10 trocitos de 0.5 cm de longitud aproximadamente, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, posteriormente se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril; se pusieron sobre sanitas estériles y se colocaron a lado de la flama de un mechero para su secado. Una vez que los trocitos de raíces se secaron, fueron sembrados en cajas Petri con medio de cultivo semiselectivo Kerr (NaO₃ 2.0g; KH₂PO₄ 1.0g; KCL 0.5g; MgSO₄7H₂O 0.5g; FeSO₄ 0.005g; sacarosa J.T. Baker[®] 30g; Extracto de levadura, BIOXON[®] 0.5g; Agar Merck KGaA[®] 15 g; Estreptomina 0.001g; PCNB 0.1g; Rosa de vengala 0.06 g; agua destilada 1000 mL) (Dhingra y Sinclair, 1987), las cajas se incubaron en condiciones controladas de temperatura a 27°C y oscuridad. Ocho días después de la incubación se cuantificó el número de trocitos de raíz donde crecieron colonias de *Fusarium* spp., y se hizo la separación de diferentes aislamientos por sus características morfológicas, siguiendo la metodología usada en la cuantificación de la densidad de inóculo.

El porcentaje de incidencia en cada muestreo se estimó con la fórmula modificada de Noriega *et al.* (1999):

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de raíces con crecimiento de } Fusarium \text{ spp.} * 100}{\text{Total de trocitos de raíz sembrados}}$$

Las raíces totales obtenidas en cada muestro se observaron y evaluaron visualmente para determinar los diferentes síntomas (tipo de daño) que presentaron y definir el nivel de severidad correspondiente. Se observaron seis diferentes síntomas que fueron:

- a. Coloración café
- b. Pérdida de turgencia
- c. Pudrición
- d. Necrosis
- e. Raíces huecas
- f. Descortezamiento

Con base en esta sintomatología observada en este estudio, se elaboró un Diagrama Estándar de Severidad de siete clases o niveles con su respectiva descripción (Cuadro 1.1). Para asignar un porcentaje de severidad a las raíces en cada muestreo, se obtuvo el punto medio de los intervalos de cada clase y se asignó un valor específico para cada clase del diagrama estándar de severidad (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.1. Diagrama estándar de severidad usado en este estudio para evaluar el daño causado por la marchitez en raíces de vainilla (*Vanilla planifolia*) (sin publicar).

Clase	Daño (%)	Descripción
1	0	Raíz aparentemente sana y cuello de la planta sano
2	1-10	Coloración café
3	11-25	Coloración café + necrosis
4	26-50	Coloración café + pérdida de turgencia+ necrosis+ pudrición
5	51-75	Coloración café + pérdida de turgencia+ necrosis+ pudrición + raíces huecas + descortezamiento
6	76-99	Pudrición de raíces + amarillamiento del cuello de la planta
7	100	Pudrición total de raíces+ planta muerta

Cuadro 1.2. Porcentaje general de daño obtenido por el método de punto medio y usado en este estudio para evaluar la severidad de la marchitez en raíces (sin publicar).

Clase	Rangos de daño (%)	Punto medio (%)
1	0	0
2	1-10	5.5
3	11-25	18
4	26-50	38
5	51-75	63
6	76-99	87.5
7	100	100

1.4.4 Cuantificación de la densidad de inóculo en suelo de rizósfera

De la zona de crecimiento radical, se recolectó el total de raíces contenidas en un volumen de 500 cm³ de suelo (10x15x5cm). Las muestras recolectadas se guardaron en bolsas de papel, se etiquetaron y fueron trasladadas al laboratorio de Ecología y Epidemiología de Patosistemas de la Raíz, ubicado en el posgrado de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Para cuantificar la densidad de inóculo (DI) de *Fusarium* en el suelo de la rizósfera, del volumen de raíces obtenido de cada planta se seleccionó y pesó 1.0 g de raíces con síntomas de marchitez, y sin quitar el suelo adherido a estas raíces, se colocaron en un matraz que contenía 99 mL de agua-agar al 0.2% (Agar-Agar microbiology, Merck KGaA®) y se agitaron con un agitador (Vortex Genie®) durante cinco minutos, con la finalidad de obtener una solución madre de suelo de rizósfera. A partir de ésta solución, se tomó 1 mL y se colocó en tubos de ensaye que contenían 9 mL de agua-agar al 0.2%; se continuó con las diluciones hasta obtener la concentración 10⁻³. De ésta concentración se tomó un 1mL, se aplicó en cajas de Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) (papa natural 200g; papa natural, 200g; Dextrosa, BD Bioxon® 12g; Agar-agar, Merck KGaA® 15 g; Agua destilada 1000 mL) acidificado con ácido láctico y se esparció en toda la caja con una varilla de vidrio en forma de L. Las cajas se incubaron a 27 °C y cinco días después se hizo el conteo de colonias de *Fusarium* spp., y se determinó la cantidad de colonias g⁻¹ de suelo de rizósfera. Con base en observaciones realizadas en el microscopio compuesto de las estructuras de los hongos, del tipo de crecimiento y forma y coloración de las colonias, se hizo una agrupación de aquéllas que presentaron características similares; cada grupo se determinó como un morfotipo diferente de *Fusarium*, hasta llevar a cabo su identificación taxonómica.

1.4.5 Evaluación de la biomasa de raíces

El total de raíces recolectado por cada planta y fecha de muestreo, se lavó en agua de la llave hasta eliminar el exceso de suelo. Se dejó secar sobre papel destrasa en condiciones de laboratorio (± 22 °C) para quitar el excedente de agua. Posteriormente se colocaron en sobres amarillos de y se secaron por tratamiento en horno de calor seco (Riosa®, 300°C) a 70 °C durante 72 h y la estimación del peso se hizo en una balanza digital (Ohaus®, capacidad 2100 X 0.1g).

1.4.6 Identificación morfológica de los hongos asociado a la marchitez vainilla

De las colonias de *Fusarium* sp. obtenidas a partir de suelo de rizósfera y raíces se realizaron preparaciones permanentes, se observaron sus características morfológicas con un microscopio compuesto y se identificaron de manera general a nivel de género con base en las claves taxonómicas de Booth (1971) y las más frecuentes a nivel de especie de acuerdo a Holliday (1995) y el manual de Leslie and Summerell (2006).

1.4.7 Evaluación de la fenología de la vainilla

Durante el periodo mayo a diciembre de 2016, en la población de plantas (30) de cada huerto se llevó a cabo la observación de los procesos cambios fenológicos de la planta de vainilla, anotándose el periodo de las etapas de crecimiento vegetativo, inicio del brote de yemas florales, inicio de la floración, polinización, desarrollo de frutos y cosecha. También se consideró información precisa con base en los registros realizados por los productores, de cada una de dichas etapas.

1.4.8 Muestreo y evaluación del crecimiento y desarrollo del hospedante

De cada planta de la población seleccionada (30) se seleccionó un tallo en crecimiento en la cual se cuantificó el número de hojas, número de entrenudos, longitud del tallo; a cada planta también se le evaluó el número de racimos y frutos (después de la polinización).

1.4.9 Evaluación de la caída de hojas y frutos

En cada fecha de evaluación se cuantificó el número de hojas que presentaron síntoma de amarillamiento y caída, también se cuantificaron los frutos caídos con el síntoma de amarillamiento y pudrición. Para determinar el porcentaje de caída se utilizó la fórmula general:

$$\% \text{ de caída de hojas} = (\text{hojas caídas} / \text{total}) * 100$$

$$\% \text{ de caída de frutos} = (\text{frutos caídos} / \text{total}) * 100$$

En rendimiento total de las plantas (kg) fue proporcionado por los productores.

1.4.10 Evaluación de variables climáticas

Las variables climáticas de temperatura, humedad relativa y precipitación, se obtuvieron en la plataforma de la Red Meteorológica del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), en la Estación del Campo experimental Ixtacuaco, Tlapacoyan,

Veracruz. Se obtuvieron las medias mensuales de cada variable durante el periodo enero-diciembre 2016.

1.4.11 Análisis Estadísticos

1.4.11.1 . Análisis cuantitativo del comportamiento temporal de la incidencia y densidad de inóculo

Los datos de la densidad de inóculo en suelo de rizósfera de la incidencia en raíces, se analizaron aplicando tres modelos empíricos de crecimiento temporal en su forma linearizada: Logístico ($\ln y/(1-y) = \ln (y_0/1-y_0) + r_L t$), Gompertz $-\ln(-\ln y) = -\ln(-\ln y_0) + r_G t$, y Monomolecular [$\ln (1/1-y) = \ln [(1/1-y_0) + r_M t]$], de acuerdo a lo propuesto por Campbell y Madden (1990). La tasa de incremento de las epidemias para cada modelo: logístico (r_L), gompertz (r_G) y monomolecular (r_M) se estimaron aplicando el Modelo Lineal General (GLM) utilizando el método de mínimos cuadrados y usando el paquete estadístico SAS[®] 9.0. Se eligió el modelo que describió mejor el progreso temporal de la enfermedad en los tres diferentes sistemas de manejo con base en los estadísticos: coeficiente de terminación (R^2), cuadrado medio del error (CME), probabilidad del modelo (F), valor de los errores estándar de los parámetros β_0 y β_1 y su nivel de significancia, y distribución de los valores residuales. Para el ajuste de la incidencia de *Fusarium* spp., en raíces, se calculó la incidencia acumulada ajustada a la ecuación $Y_{ic} = Y_i/N$ (Noriega *et al*, 1999) donde Y_{ic} es la incidencia acumulada, Y_i es el número acumulado de trocitos de raíces con crecimiento de *Fusarium* en el tiempo i y N es el total de trocitos de raíces sembrados durante el ciclo.

1.4.11.2 Análisis cuantitativo de la severidad en raíces causada por la enfermedad marchitez

Los datos de porcentaje de daño se sometieron a un análisis de distribución de frecuencias y para ello se utilizó el paquete estadístico Microsoft Excel 2010[®]. Además, para cada sistema de manejo y en cada fecha de muestreo se calculó el índice de severidad (S) mediante la fórmula: $IS = (\sum nv/N-1) * 100$ donde, IS=índice de severidad, n=número de plantas por cada clase, v=valor de clase, N-1= número de clases empleados en la escala y T= número total de plantas por fecha de muestreo (Ramírez *et al.*, 2012). Además, se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) por el método del trapecioide (Campbell y Madden, 1990).

1.4.11.3 Comparación de epidemias

Para determinar diferencias estadísticamente significativas de la incidencia y densidad de inóculo, bajo los diferentes manejos agronómicos, se compararon las tasas de crecimiento obtenidas en el modelo de mejor ajuste. Para los datos de cada variable se aplicó la prueba estadística F para determinar si las varianzas fueron distintas o iguales. En el caso de la severidad respecto al tiempo, las epidemias se compararon con el índice de severidad; también se compararon las áreas bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) promedio, obtenido para cada sistema de cultivo aplicando el método del trapecioide (Campbell y Madden, 1990). La comparación de las diferentes epidemias se hizo mediante una prueba de t , con el paquete estadístico Microsoft Excel 2010[®] y para determinar diferencias estadísticas significativas al 0.05 se aplicó la regla de decisión propuesta por Infante y Zárate (2013): existen diferencia significativa Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n_1 + n_2}$ o Si $t_c \leq -t_{\alpha/2, n_1 + n_2}$.

1.4.11.4 Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante.

Las variables número de hojas, entrenudos, longitud de tallo y biomasa de raíces se ajustaron a la función Logística ($\text{Log}(k/(k-y))$) considerando una capacidad de carga máxima ($K_{\text{máx}}$) específica para cada variable y de acuerdo al valor máximo obtenido de cada variable en los diferentes sistemas de manejo. Para determinar diferencias significativas se utilizó el parámetro de tasa (r) y se aplicó una prueba de t .

1.4.11.5 Relación de la densidad de inóculo, incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo.

Se realizaron diferentes análisis de regresión entre las variables densidad de inóculo, incidencia y severidad en relación a las variables biomasa de raíces, número de entrenudos, número de hojas, longitud de liana, así como en relación a las variables climatológicas de temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial. Para ello se aplicó el Modelo Lineal General usando el método de Mínimos Cuadrados, y con apoyo del paquete estadístico SAS V.9. De esta manera se determinó la relación entre los componentes del triángulo de la enfermedad.

1.5. RESULTADOS

1.5.1 Diagrama estandar de severidad

La aplicación de la escala de severidad y la descripción del daño causado por la marchitez en las raíces de la planta de vainilla, permitieron desarrollar por primera vez para este cultivo un Diagrama Estándar de Severidad de la Marchitez de la Vainilla (Figura 1.2).



Figura 1.2. Diagrama estándar de severidad para determinar el porcentaje de daño con base en la sintomatología de la enfermedad marchitez, en el cultivo de vainilla (Clase 1= raíz sana, clase 7= sistema radical y planta muerta), dc=decoloración, ds=descortezamiento, nc=necrosis, pt=pérdida de turgencia, pd=pudrición, rh=raíz hueca, rs=raíz sana, at= amarillamiento del tallo y mp=muerte de la planta.

1.5.2 Dinámica temporal de la severidad, incidencia y densidad de inóculo de *Fusarium*

La dinámica de la severidad del daño en raíces, fue diferente en dos sistemas de manejo. Sin embargo, el SR presentó los mayores porcentajes a lo largo del ciclo del cultivo, el mayor IS (66%) en el periodo mayo a junio (coincidió con el amarre de frutos). Disminuyó significativamente de julio a agosto, mes donde se presentó el menor IS con 48.6% y volvió a incrementar en octubre-diciembre; en este sistema se presentó muerte total de tres plantas en julio, durante la etapa de desarrollo de los frutos. En el SC, el IS máximo fue 56.1% durante agosto y disminuyó de octubre a diciembre. En el STN la severidad máxima fue de 47.2% en octubre, durante la etapa de desarrollo de los frutos, y en julio se presentó el menor IS con 34.3% (Figura 1.3). El STN (25.1%) presentó los porcentajes más bajos de severidad en comparación con el SC (32.1) y SR (34.1) (Cuadro 1.3).

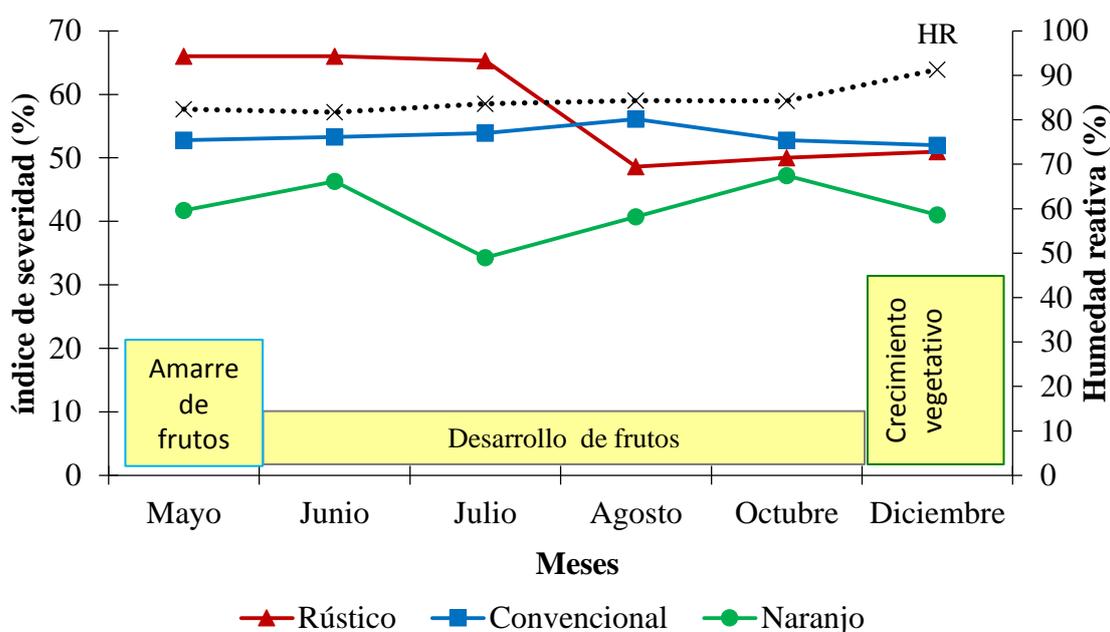


Figura 1.3. Dinámica de la severidad (valores absolutos) en tres sistemas diferentes de producción de vainilla en Papantla, Veracruz.

Cuadro 1.3. Severidad promedio obtenida para cada sistema de producción.

Sistema de Producción	Índice de severidad (%)
Rústico	34.6
Convencional	32.1
Tutor naranjo	25.1

La incidencia absoluta de *Fusarium* en raíces fue mayor en el vainillal STN con 86.7% en agosto, durante el periodo de desarrollo y madurez de los frutos (Figura 1.3) y en esta fecha se presentó una de las temperaturas medias más altas de 27.06 °C y una humedad relativa de 84.3%. El huerto SR presentó 82.2% y el huerto SC tuvo una incidencia de 79% en el mes de diciembre, posterior a la cosecha cuando las plantas han finalizado el ciclo de producción y cuando la humedad relativa alcanzó su máximo valor (91.3%) con temperatura de 21.3 °C y por tanto ya no afectó la producción y cosecha de ese ciclo 2016 (Figura 1.3). La incidencia en general fluctuó en cada fecha de muestreo. Julio fue el mes en el que disminuyó significativamente en los tres vainillales con 55.7%, 60.7% y 65 % para los huertos SR, SC y STN respectivamente. Las curvas de fluctuación de la incidencia presentaron un patrón similar de comportamiento en los tres sistemas de manejo, con una tendencia a incrementar en los meses de Junio, Agosto y Diciembre que corresponden a las etapas de desarrollo de frutos y crecimiento vegetativo (Figura 1.4).

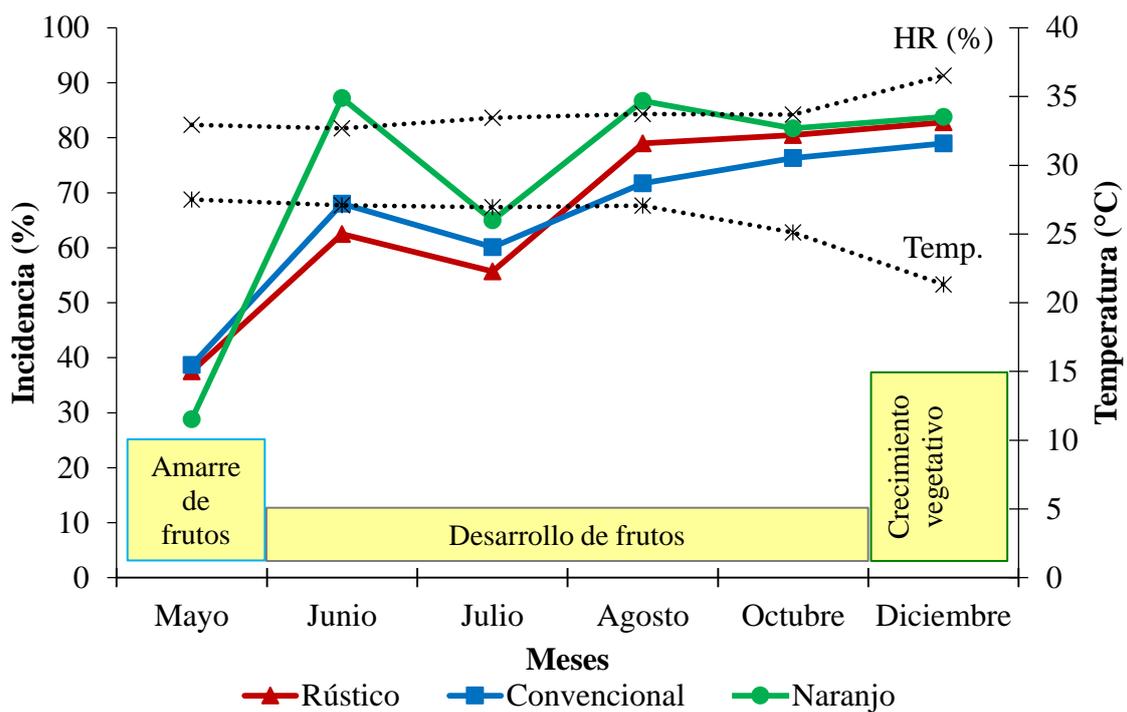


Figura 1.4. Dinámica de la incidencia de *Fusarium* en raíces (alores absolutos), en relación a las condiciones climáticas y fenología el cultivo, en tres sistemas de producción de vainilla.

La densidad se comportó de manera similar en los manejos rústico y convencional, con tendencia a incrementar en los mismos meses que la incidencia. La máxima cantidad de colonias g^{-1} de *Fusarium* en suelo de rizósfera fue de $8.9 (x10^3)$ durante Junio en el sistema de tutor naranjo; en el mismo mes se presentaron los valores promedio más altos para el manejo convencional y rústico con 5.7 y 5.0 ($x10^3$) colonias de *Fusarium* g^{-1} de suelo de rizósfera. Los valores más altos se presentaron en el STN en prácticamente todas las fechas de muestreo (Figura 1.5).

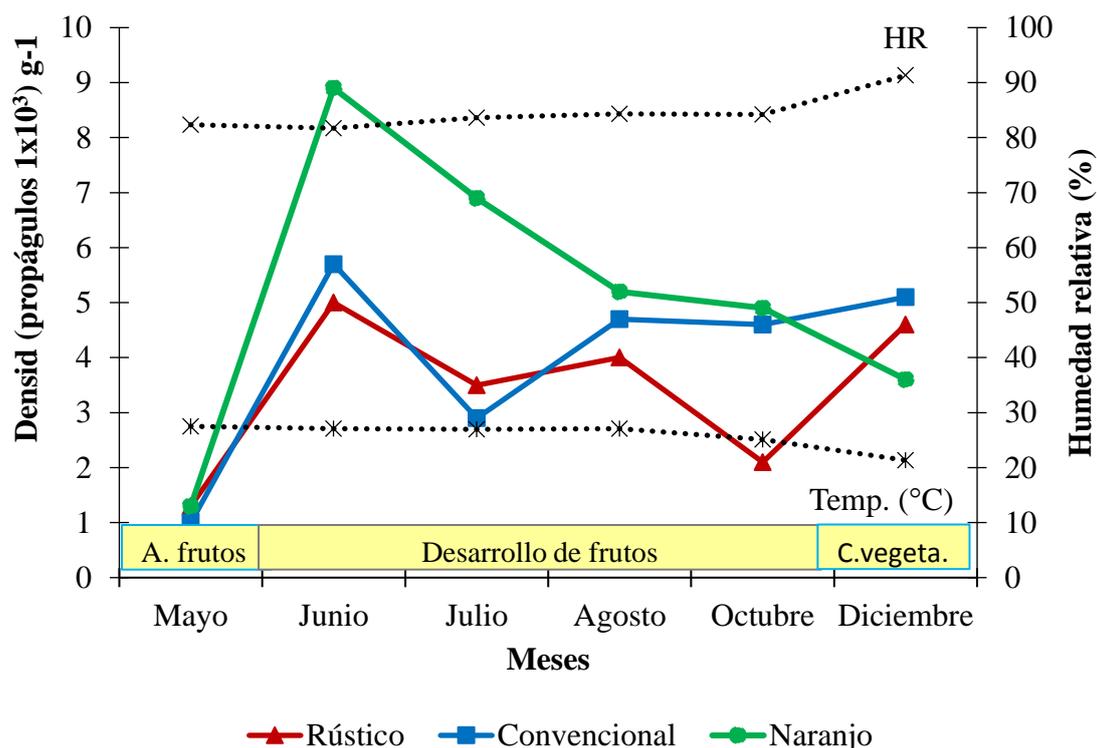


Figura 1.5. Dinámica de la densidad de *Fusarium* en suelo de rizósfera, en relación al clima del ambiente y a las etapas fenológicas de la vainilla.

1.5.3 Dinámica de la biomasa de raíces en relación a la fenología

La biomasa de las raíces mostró una tendencia a incrementar de mayo a agosto, en los tres sistemas de manejo, que coincidió con la etapa fenológica de desarrollo de frutos; y disminuir de manera significativa en octubre a diciembre (Figura 1.6), periodo en el que la incidencia de *Fusarium* en raíces incrementó. Este comportamiento favorecido por la precipitación pluvial y la humedad relativa del ambiente.

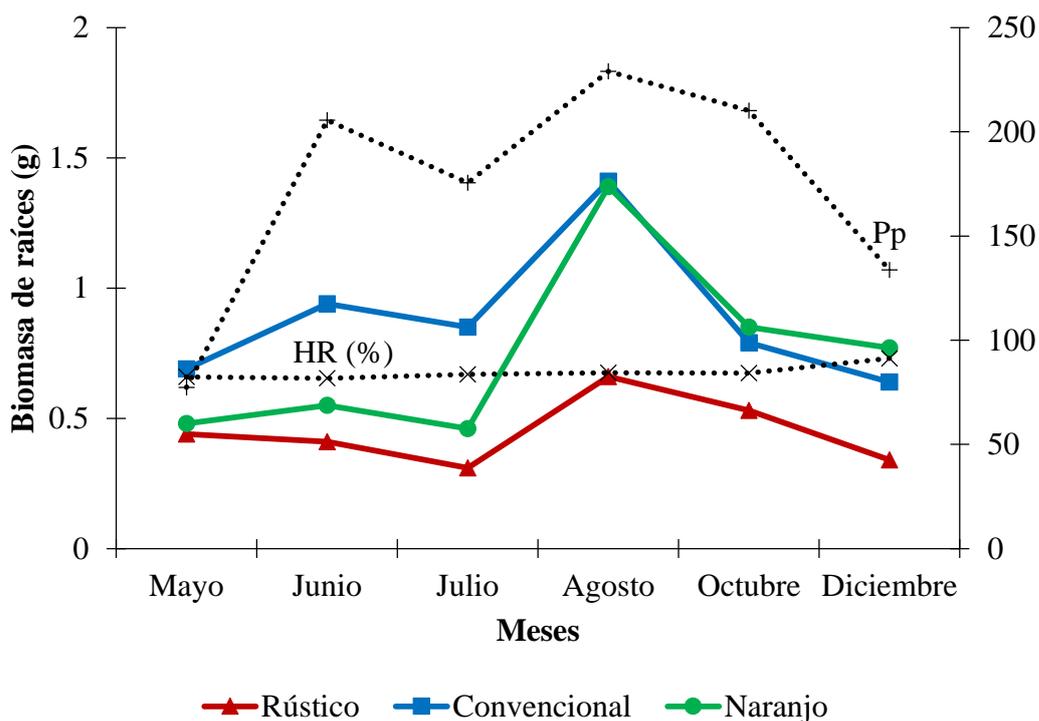


Figura 1.6. Comportamiento temporal de la biomasa de raíces del cultivo de vainilla en tres sistemas de manejo, en Papantla, Veracruz.

1.5.4 Identificación morfológica de hongos asociados a raíces de vainilla

Los aislamientos obtenidos de raíces y suelo de rizósfera y que se identificaron como *Fusarium* spp., presentaron colonias de tipo algodonoso, de color blanco, amarillento y color púrpura, micelio hialino y septado. Macroconidios hialinos en forma de luna con tres a seis septos. Microconidios hialinos sin septos o con un septo, clamidiosporas intercalares, terminales y en pares. Las características observadas correspondieron al género *Fusarium* (Figura 1.7A), de acuerdo a Leslie y Summerell (2006).

Por otra parte, se obtuvieron aislamientos con micelio septado hialino y marrón, hifas hialinas (formando células T), células moniloides globosas, subglobosas o elipsoidal, en cadenas y ramificadas (Figura 1.7B), y de acuerdo a tales características se decidió que corresponden al género *Rizoctonia* (Chen *et al.*, 2012), posiblemente del grupo de las micorrizas de orquídeas.

También se obtuvieron aislamientos que por sus características morfológicas de la colonia, como el presentar conidióforos ramificados, fiálides bulbosas con racimos de conidios, conidios ligeramente ovoides y colonias verdosas, corresponde al género *Trichoderma* sp. (García *et al.*, 2016).

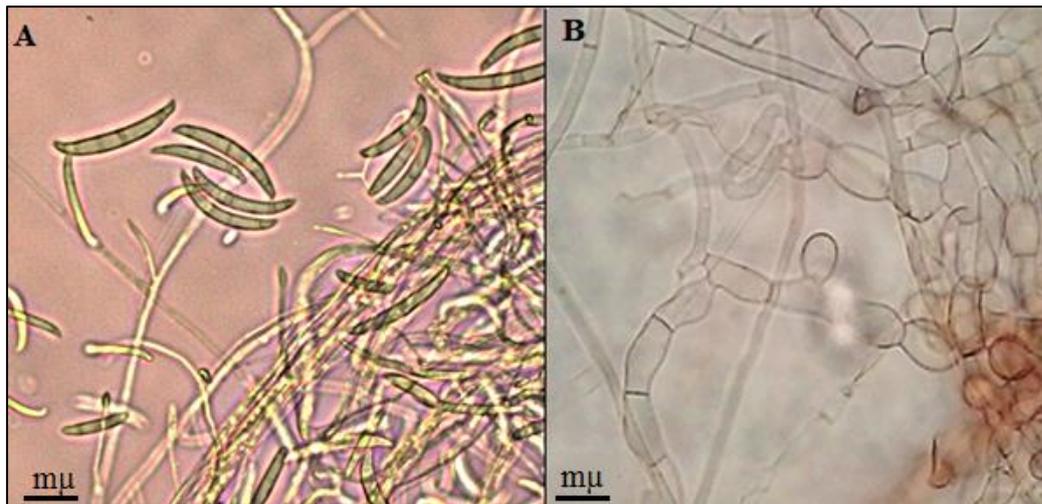


Figura 1.7. Morfología de aislamientos: A) Macroconidios de *Fusarium* y B) células monilioides de *Rhizoctonia*.

Se obtuvieron 40 aislamientos diferentes de *Fusarium* de los cuales seis fueron los más frecuentes en cada sistema de manejo (Figura 1.8), y los más abundantes fueron los aislamientos agrupados como VF₁ y VF₂ con los porcentajes más altos (Cuadro 1.4). La identificación molecular de estos dos aislamientos más frecuentes la llevó a cabo la Biol. Yesica Aguirre Andrade en otra investigación, quien los identificó molecularmente como *F. oxysporum* y *F. solani* respectivamente, a partir de aislamientos de raíces recolectadas en el muestreo correspondiente a marzo de 2017. Las secuencias se depositarán en la base de datos del GenBank.

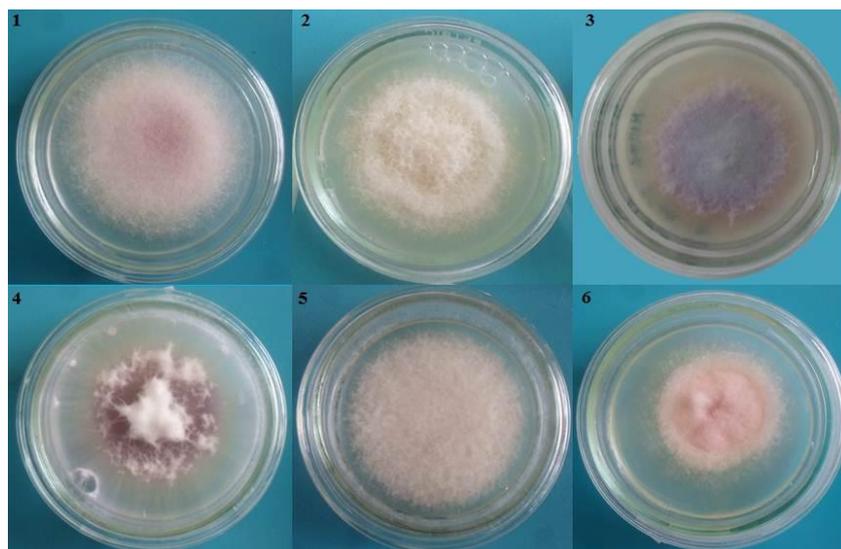


Figura 1.8 Aislamientos de *Fusarium* más frecuentes en raíces de vainilla: 1) VF₁, 2) VF₂, 3) VF₃, 4) VF₄, 5) VF₅, 6) VF₆.

Cuadro 1.4. Porcentaje (%) de incidencia de aislamientos de *Fusarium* asociados a raíces de vainilla en tres sistemas diferentes de manejo.

Aislamiento	Descripción de la colonia	Microorganismo	SR (%)	SC (%)	STN (%)
VF ₁	Micelio aéreo abundante, algodonoso y color blanco a ligeramente color lila. En medio PDA, el reverso de la colonia blanco y posteriormente a tonalidad lila. Abundantes macroconidios, microconidios. Polifialides cortas; clamidiosporas intercalares y terminales.	<i>Fusarium oxysporum</i> (Leslie y Summerell, 2006)	31.64	32.12	31.15
VF ₂	Micelio aéreo grumoso, color amarillento. El reverso se tornó de color cremoso. Macroconidios, microconidios abundantes y clamidiosporas intercalares, teminales y solitarias.	<i>Fusarium solani</i> (Leslie y Summerell, 2006)	19.05	21.13	18.21
VF ₃	Micelio aéreo escaso, de color púrpura y creciendo pegado al medio de cultivo. Reverso de la colonia color púrpura. Macroconidios no abundantes, microconidios y clamidiosporas abundantes.	<i>Fusarium</i> sp.	11.2	14.71	13.72
VF ₄	Micelio aéreo algodonoso, blanco y posteriormente morado. Revés de la colonia color morado, abundantes macro y microconidios. Clamidiosporas escasas.	<i>Fusarium</i> sp.	8.43	7.78	8.72
VF ₅	Micelio color blanco, algodonoso. Revés de la colonia color blanco. Escasos macroconidios, microconidios abundantes y clamidiosporas escasas	<i>Fusarium</i> sp.	6.12	5.41	6.92
VF ₆	Micelio aéreo abundante color melón, y el reverso de la colonia de la misma tonalidad. Escasos macroconidios. Abundantes microconidios y clamidiosporas.	<i>Fusarium</i> sp.	4.5	4.9	5.9

SR= sistema rústico SR=sistema convencional STN= sistema tutor naranjo.

1.5.5 Evaluación de la fenología

En lo que corresponde a las observaciones realizadas en el presente trabajo en los tres sistemas de producción, la fenología de la vainilla se dividió en seis etapas identificadas como (Figura 4.7):

1. crecimiento vegetativo,
2. brote de yemas florales,
3. floración y polinización,
4. amarre de frutos,
5. desarrollo,
6. madurez de frutos y cosecha.

1. La fase vegetativa corresponde al crecimiento de tallos y al aumento en el número de hoja; éste crecimiento es continuo durante todo el año pero es más intenso en los meses de Agosto a Octubre. 2. Durante la última semana de Enero y la primera de Febrero, empiezan a brotar la yemas florales que darán origen a la inflorescencia o racimo; al cuantificar una muestra de 15 racimos se obtuvo que pueden formar de 4 a 32 botones, los cuales brotan y maduran de manera escalonada en el tiempo. 3. La tercera etapa es la floración y polinización, se presenta de manera activa durante todo el mes de Marzo, ésta es la fecha de mayor floración y de vital importancia; el proceso es efímero, es decir, las flores sólo duran pocas horas por lo que la polinización se realiza de manera manual (artificial) durante las primeras horas del día (generalmente de 7:00-12:00 a.m.). Sin embargo, en el huerto de manejo convencional las primeras flores se registraron el 23 de Febrero (los productores le llaman floración precoz); por otra parte, en los tres sistema de producción se presentaron flores aún en la primera semana de Mayo y son conocidas como tardías; esta situación coincide con lo descrito por Soto (2009). 4. El amarre de los frutos sucedió inmediatamente después de la polinización en el periodo Marzo-Abril y se extendió hasta Mayo; este proceso se traslapa con la floración. Cabe mencionar que una práctica importante del manejo agronómico en el cultivo de vainilla es el raleo, que consiste en dejar de 6-7 frutos (ya amarrados) por racimo y cortar el ápice para detener la floración escalonada y asegurar frutos de buena calidad. 5. El desarrollo de los frutos es el proceso más largo, y se ubicó de manera activa en los meses de Mayo a Octubre. 6. La última etapa fenológica es la madurez de los frutos y es cuando se lleva acabo la cosecha, la cual se realiza durante la primera y segunda semana de noviembre, finalizando así un ciclo que dura nueve meses (marzo a noviembre), a partir de la floración (Figura 1.9).

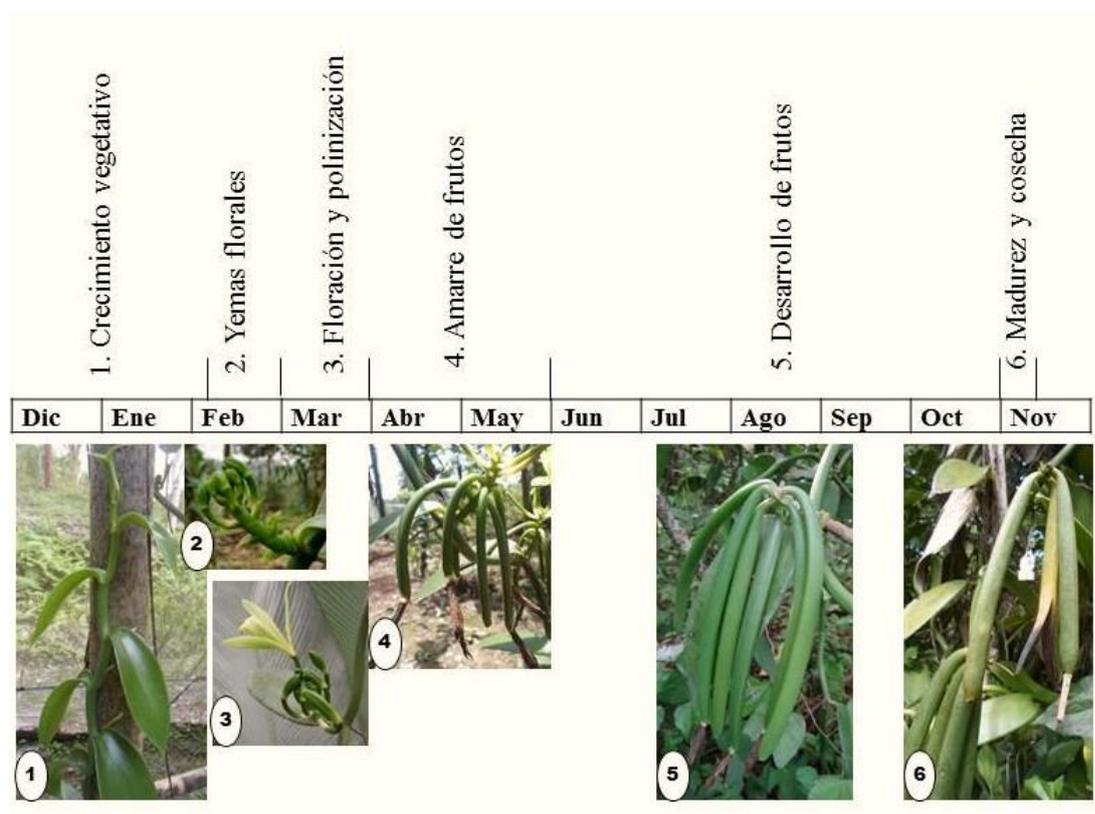


Figura 1.9. Representación de la fenología de *Vanilla planifolia* Jacks., compuesta por seis etapas: 1. crecimiento vegetativo, 2. brote de yemas florales, 3. floración y polinización, 4. amarre de frutos, 5. desarrollo de frutos y 6. madurez.

1.5.6 Muestreo y evaluación del crecimiento y desarrollo del hospedante

De manera general, el sistema convencional presentó los promedios más altos de entrenudos, hojas y longitud de tallo. Sin embargo, sólo la biomasa de raíces presentó diferencias significativas (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Promedios generales de las variables de crecimiento y desarrollo de la vainilla, en tres sistemas de manejo.

Sistema	Variables del hospedante			
	Biomasa de raíces (g)	Número de entrenudos	Número de hojas	Longitud de tallo (cm)
RÚSTICO (SR)	0.45a*	2.4a	1.9a	24.1a
CONVENCIONAL (SC)	0.89b	2.7a	2.3a	27.6a
NARANJO (STN)	0.75c	2.1a	1.7a	19.8a

*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

El número de entrenudos (Figura 4.10A), hojas (Figura 1.10B) y longitud de tallo (Figura 1.10C) se comportaron de manera similar en los sistemas de manejo rústico y convencional, donde se observó una tendencia de incremento continuo en número durante el periodo julio-octubre y que en diciembre disminuyó significativamente. En el caso del sistema de producción en tutor naranjo, las variables anteriores mantuvieron la tendencia de incremento durante todo el ciclo (Figura 1.10 A-C).

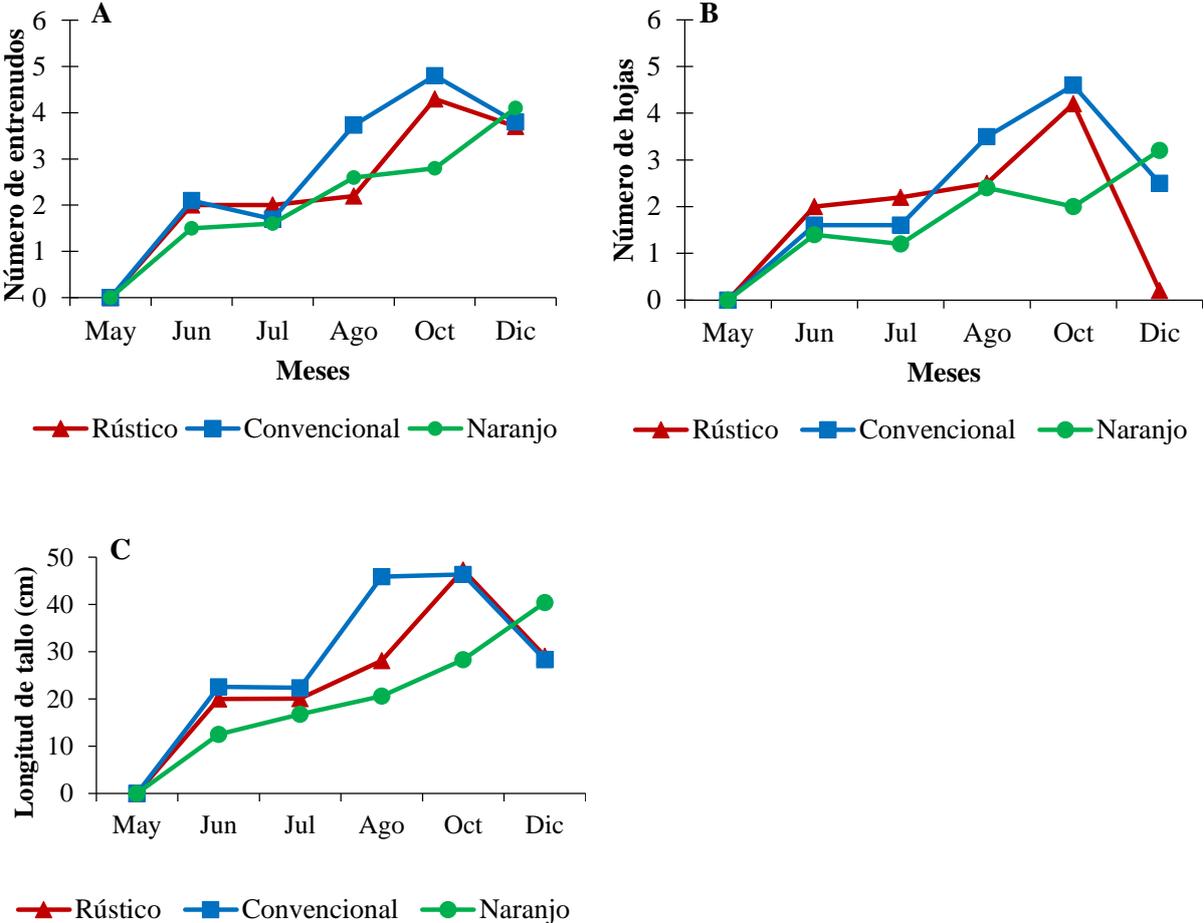


Figura 1.10. Dinámica de las variables absolutas de crecimiento de la vainilla: A) número de nuevos entrenudos, B) número de hojas nuevas y D) longitud de tallos (cm).

1.5.7 Evaluación de la caída de hojas y frutos.

El mayor porcentaje de caída de hojas se obtuvo en el SR con 14.9 %, seguido del SC (4.2%) y finalmente el STN con 3.6% (Cuadro 4.5). En cuanto a la caída de frutos a causa del síntoma de pudrición, la pérdida fue mayor también en el SR con el 62.5% de caída. Cabe mencionar que en este sistema no se cosecharon los frutos, debido que la producción se perdió en su totalidad y el productor decidió abandonar el vainillal. El SC presentó el 40.8%

de caída y finalmente el STN tuvo el porcentaje más bajo de caída de frutos con 16.6% (Cuadro 1.6)

Cuadro 1.6. Datos generales usados para estimar de la caída de hojas y frutos por el síntoma de amarillamiento y pudrición, en tres sistemas de manejo de la vainilla.

SISTEMA	Hojas			Frutos			
	Totales	Caída	Pérdida (%)	Totales	Producción (kg)*	Caída	Pérdida (%)
Rústico	529	79	14.9	56	0a	35	62.5
Convencional	806	34	4.2	294	94b	120	40.8
Naranja	439	16	3.6	386	150c	64	16.6

*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Los resultados de la prueba de chi-cuadrado (X^2) mostraron diferencias estadísticamente significativas para la caída de hojas en los tres sistemas de manejo de la vainilla (Cuadro 1.7).

Cuadro 1.7. Datos del porcentaje de la caída de hojas y frutos, sometidos a la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para determinar diferencias significativas.

SISTEMA	Hojas		Frutos	
	Pérdida (%)	X^2 (Pr \geq F)	Pérdida (%)	X^2 (Pr \geq F)
SR vs. SC	14.9	8.2×10^{-31} *	62.5	0.0020*
SC vs. STN	4.2	7.3×10^{-39} *	21.77	4.2×10^{-12} *
SR vs. STN	3.6	2.7×10^{-31} *	31.1	9.8×10^{-13} *

SR=sistema rústico, SC=sistema convencional, STN=sistema tutor naranja

* Diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$)

El porcentaje de pérdida de frutos por caída a causa de pudrición, fue significativamente diferente en los tres sistemas y se vió reflejada en la producción total de cada vainilla. El STN tuvo el rendimiento más alto y los porcentajes más bajos de caída de frutos (Figura 1.11).

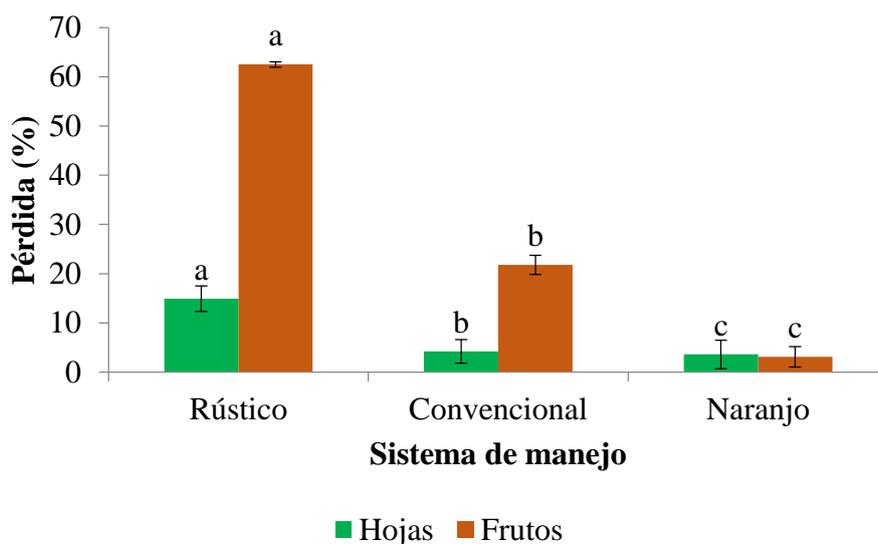


Figura 1.11. Porcentaje de pérdida de hojas y frutos en vainillales de la región del Totonacapan.

1.5.8 Evaluación de variables climáticas

Las temperaturas mínima, máxima y media, alcanzaron su punto máximo en el mes de Mayo, misma fecha en la que se iniciaron las evaluaciones en campo. El máximo valor de la temperatura media mensual fue de 27.5 °C y es cuando las plantas finalizan la etapa de amarre de frutos. La humedad relativa presentó uno de los valores más bajos del ciclo de producción y la máxima fue de 91.3 % en Diciembre (Figura 1.12).

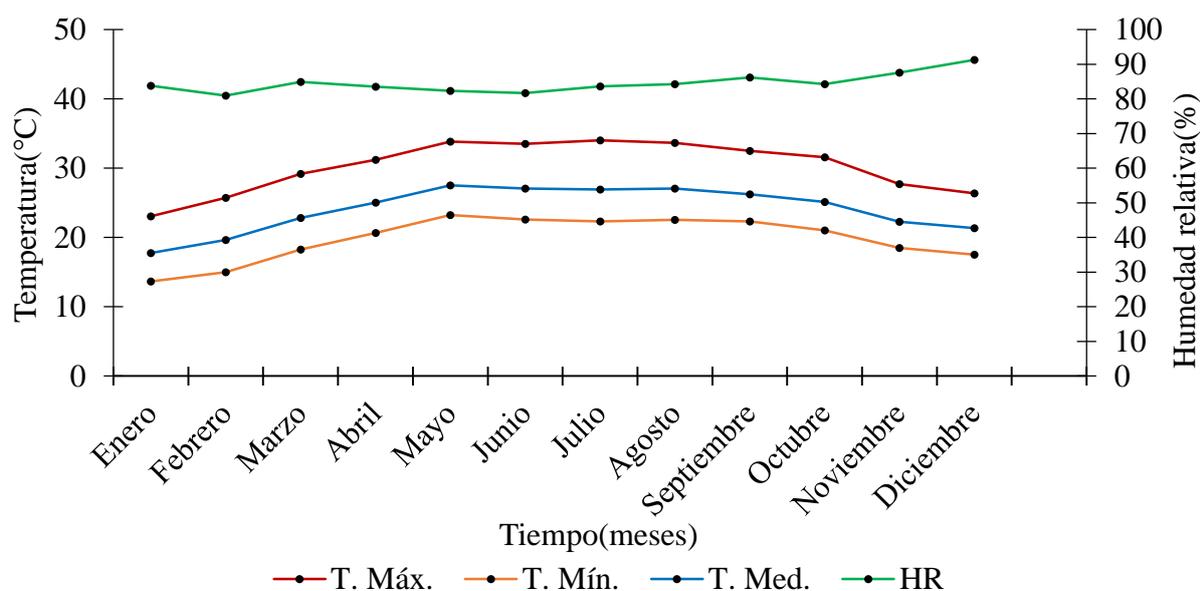


Figura 1.12. Variables climáticas de Red de Estaciones Agroclimáticas Inifap (INIFAP, 2016).

1.5.9 Análisis cuantitativo del efecto del manejo de los sistemas en la marchitez y pudrición de las raíces en vainilla.

1.5.9.1 Análisis cuantitativo del comportamiento temporal de la incidencia y densidad de inóculo.

Al final del ciclo la mayor incidencia acumulada se obtuvo en el sistema tutor naranja con 72.2%, en segundo lugar el sistema convencional con 65.7% (Figura 1.13A). Para el caso de la densidad de inóculo acumulada, el huerto SR presentó el valor más alto, seguido del STN; el huerto SC presentó la densidad de inóculo más baja (Figura 1.13B).

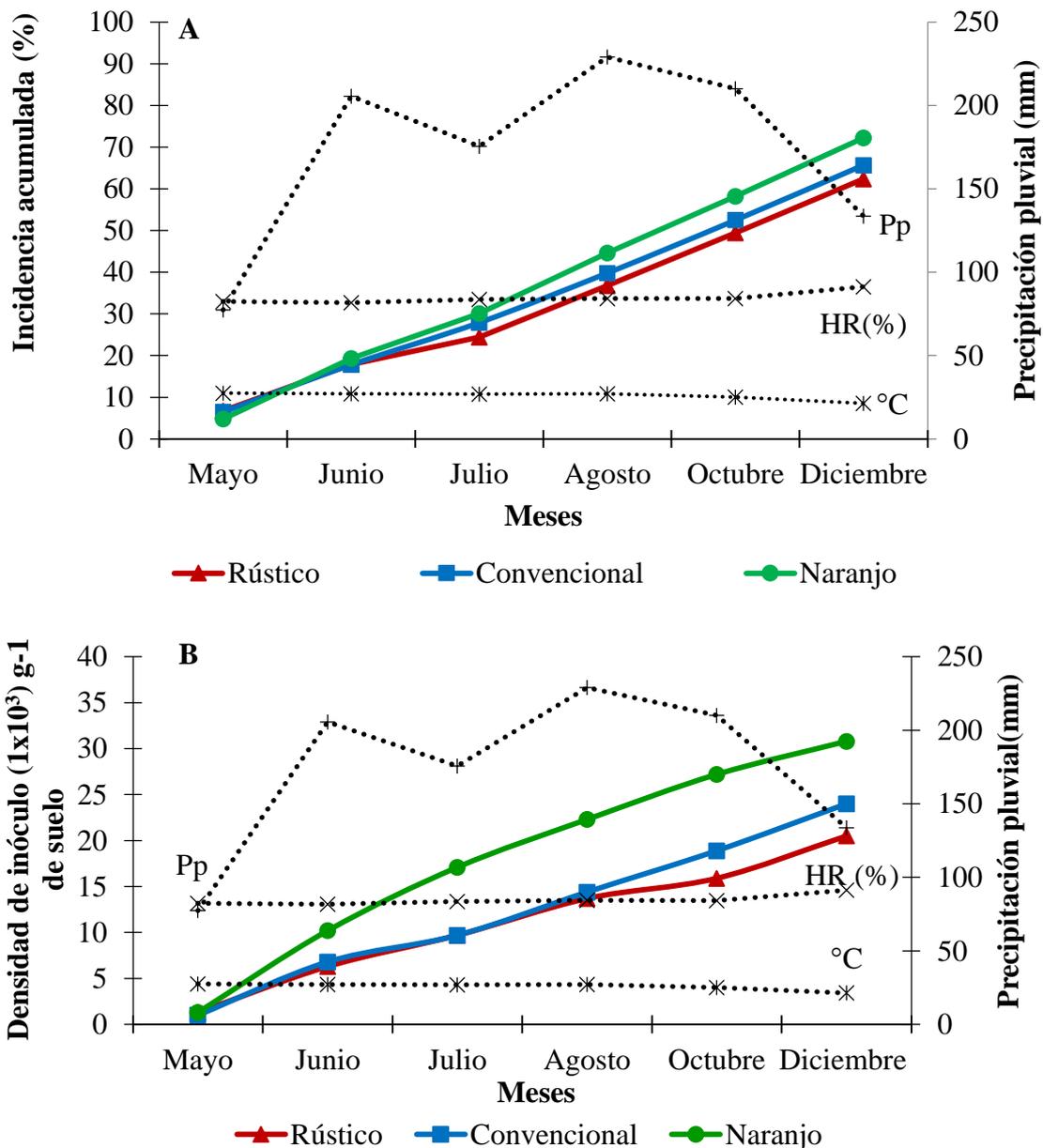


Figura 1.13. Comportamiento temporal de los valores acumulados y ajustados al modelo monomolecular en tres sistemas de manejo: A) incidencia de *Fusarium* en raíces, B) densidad de inóculo en suelo de rizósfera.

Los datos acumulados del comportamiento temporal de la incidencia se ajustaron al modelo monomolecular en su forma linearizada en los tres sistemas de manejo. El coeficiente de determinación (R^2) y la distribución de los residuales fueron adecuados. En el caso de la DI el progreso fue descrito adecuadamente por el modelo monomolecular y acuerdo a los estadísticos obtenidos en el análisis, la epidemia fue descrita por el mismo modelo en los tres sistemas de producción. Los demás parámetros considerados se especifican en el Cuadro 1.8.

Cuadro 1.8. Estadísticos considerados para el ajuste de la incidencia, densidad de inóculo en suelo de rizósfera (colonias/g⁻¹ suelo) y severidad de daño en las raíces de vainilla, a la forma linearizada del modelo de crecimiento empírico Monomolecular, para describir la dinámica temporal del hongo *Fusarium* spp., en vainillales bajo tres sistemas diferentes de manejo, en Papantla, Veracruz.

PARÁMETRO	INCIDENCIA			DENSIDAD DE INOCULO		
	SR	SC	STN	SR	SC	STN
R^2 (%)	99.9	99.9	99.9	98.7	99.7	92.7
CME	0.0001	0.0001	0.0001	0.0022	0.0009	0.3137
Pr>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0021
\hat{S}_{β_0}	0.0064	0.0060	0.0064	0.0305	0.0192	0.3614
Pr \hat{S}_{β_0}	0.0013	0.0003	0.0012	0.0391	0.2186	0.3659
\hat{S}_{β_1}	0.0001	0.0001	0.0001	0.0003	0.0002	0.0032
Pr \hat{S}_{β_1}	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0021
r	0.0049	0.0048	0.0058	0.0047	0.0067	0.0227
Re	A	A	A	A	A	A

SR=sistema rústico, SC=Sistema convencional, STN=sistema tutor naranja; R^2 = Coeficiente de determinación, CME= Cuadrado medio del error, Pr>F= probabilidad del modelo, r = tasa de crecimiento, \hat{S}_{β_0} =error estándar del intercepto, \hat{S}_{β_1} =error estándar de la pendiente; re=residuales, A= aceptable.

1.5.9.2 Análisis cuantitativo de la severidad en raíces

Los resultados de la distribución de frecuencias arrojó que para los huertos SR, SC, y STN la clase de severidad más frecuente fue 4 (38%), 3 (18%) y 2 (5.5) respectivamente (Figura 1.14). El índice de severidad (S) obtenido para cada sistema corrobora que efectivamente la

mayor severidad se presenta en el SR (IS=34.6%), seguido del SC (IS=32.1) y con el menor IS (2.5) el huerto con STN (Figura 4.14).

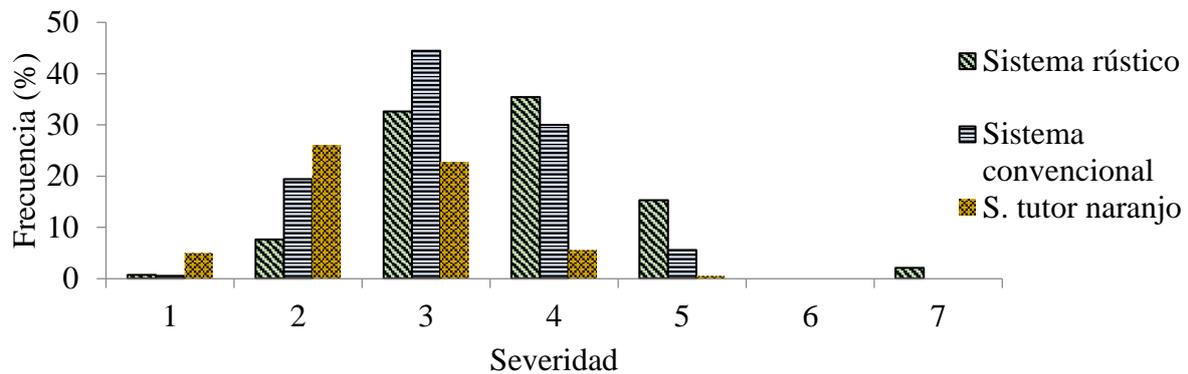


Figura 1.14. Distribución de la severidad del daño causado por *Fusarium* en raíces de vainilla bajo tres sistemas de producción, durante 2016, en la Región del Totonacapan, Veracruz (1 raíces sanas, 7=severidad máxima).

1.5.9.3 Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento y desarrollo de la planta hospedante.

En el caso de las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante, los datos acumulados de biomasa de las raíces, número de entrenudos, hojas y longitud de lianas fueron mayores en el sistema convencional (Figura 1.15).

En los tres sistemas de manejo, todas las variables fueron descritas por el modelo logístico en su forma linearizada, aplicando valores de $K_{máxima}$ (capacidad de carga) adecuados para cada variable. Los estadísticos considerados se especifican en el Cuadro 1.9.

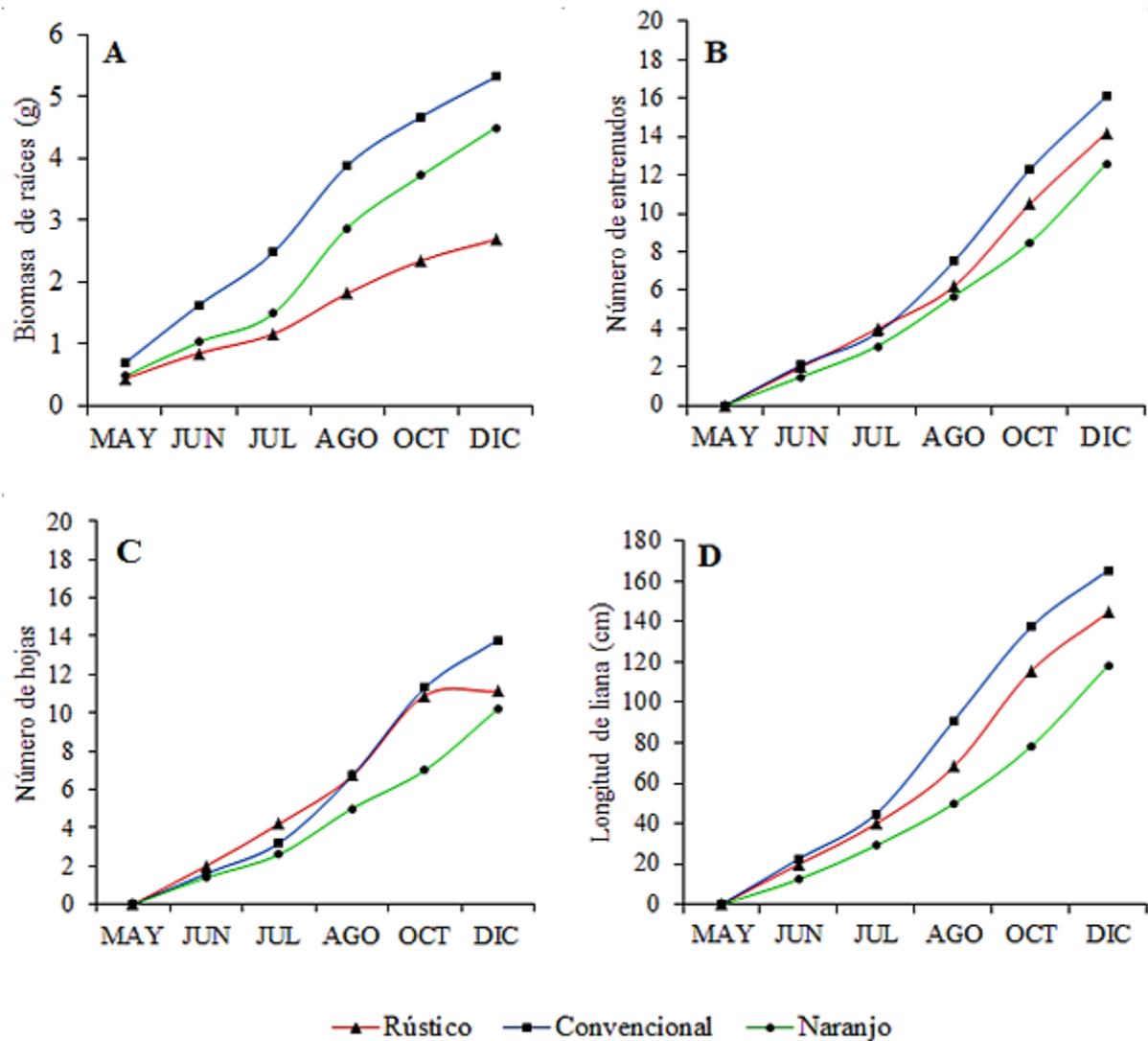


Figura 1.15. Curvas acumuladas del crecimiento de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.), ajustada al modelo logístico en tres sistemas de manejo: A) biomasa de raíces, B) número de entrenudos, C) número de hojas y D) longitud de tallo durante el ciclo 2016.

Cuadro 1.9. Estadísticos considerados en el ajuste del modelo Logístico, aplicados para describir el progreso temporal de las variables biomasa, número de hojas, entrenudos y longitud de tallos de la vainilla en tres sistemas de manejo.

MODELO LOGÍSTICO												
PARÁMETRO	BIOMASA			NÚMERO DE HOJAS			NÚMERO DE ENTRENUDOS			LONGITUD DE TALLOS		
	SR	SC	STN	SR	SC	STN	SR	SC	STN	SR	SC	STN
R ² (%)	88.9	98.6	95.4	62.9	80.7	65.7	80.9	75.3	67.0	80.7	86.0	80.7
CME	0.1145	0.0620	0.1207	4.6014	3.1521	3.6177	3.2938	3.6044	3.6438	1.3063	1.2667	1.0239
Pr>F	0.0048	<.0001	0.0008	0.0596	0.0150	0.0504	0.0147	0.0251	0.0463	0.0150	0.0077	0.0150
\hat{S}_{β_0}	0.2183	0.1607	0.2242	1.3841	1.1456	1.2272	1.1710	1.2250	1.2317	0.7375	0.7262	0.6529
Pr	0.0008	0.0006	0.0009	0.0404	0.0155	0.0223	0.0154	0.0200	0.0204	0.0090	0.0084	0.0048
\hat{S}_{β_1}	0.0019	0.0014	0.0020	0.0122	0.0101	0.0108	0.0103	0.0108	0.0109	0.0065	0.0064	0.0058
Pr	0.0048	<.0001	0.0008	0.0596	0.0150	0.0504	0.0147	0.0251	0.0463	0.0150	0.0077	0.0150
r	0.011	0.024	0.018	0.032	0.041	0.030	0.043	0.038	0.031	0.027	0.032	0.024
Re	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

SR=sistema rústico, SC=Sistema convencional, STN=sistema tutor naranjo; R²= Coeficiente de determinación, CME= Cuadrado medio del error, Pr>F (α)= probabilidad del modelo, r= tasa de crecimiento, \hat{S}_{β_0} =error estándar del intercepto, \hat{S}_{β_1} =error estándar de la pendiente, Re=residuales, A=adecuado.

1.5.9.4 Comparación de epidemias

En base a los resultados de la prueba de t , utilizando la tasa de incremento obtenida en el modelo de ajuste (Cuadro 1.10), se obtuvo que la DI de *Fusarium* en suelo de rizósfera mostró diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) entre las tasas de los tres manejos (Cuadro 1.10), donde el huerto STN prestó la tasa más alta (0.023 colonias de *Fusarium*/día). Las epidemias generadas por incidencia en raíces, fueron estadísticamente iguales en los huertos SR y SC; y significativamente diferentes en tre los vainillales SC vs. STN y SR v.s STN (Cuadro 1.11).

Cuadro 1.10. Parámetros usados en del modelo monomolecular, para comparar el progreso de la marchitez de la vainilla bajo tres sistemas de manejo del cultivo.

Variable	Tasa de crecimiento (r_M) para cada sistema de manejo		
	Rústico	Convencional	Tutor naranja
Densidad de inóculo	0.005	0.007	0.023
Incidencia	0.005	0.005	0.006

Cuadro 1.11. Comparación de las tasas de incremento de los componentes de la enfermedad marchitez de la vainilla mediante la prueba de t (Infante y Zárate, 2013).

Variable	Comparación	Tasa de crecimiento(r_M)	t_c	$t_{t \alpha/2, n1 + n2}$
Densidad de inóculo	SR vs. SC	$r_M=0.0048$ vs. $r_M=0.0067$	-3.644*	-2.032
	SC vs. STN	$r_M=0.0067$ vs. $r_M=0.0227$	-3.321*	-2.069
	SR vs. STN	$r_M=0.0048$ vs. $r_M=0.0227$	-5.408*	-2.021
Incidencia	SR vs. SC	$r_M=0.0049$ vs. $r_M=0.0048$	-1.452	-2.048
	SC vs. STN	$r_M=0.0048$ vs. $r_M=0.0058$	-2.545*	-2.013
	SR vs. STN	$r_M=0.0049$ vs. $r_M=0.0058$	-2.675*	-2.048

*Regla de Decisión Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq -t_{\alpha/2, n1 + n2}$, las tasas son distintas ($P=0.05$), SR=Sistema rústico, SC= sistema convencional, STN=sistema tutor naranja, t_c = valor crítico, $t_{\alpha/2, n1 + n2}$ = valor de tablas

Al comparar los índices de severidad (Cuadro 1.12) y el área bajo la curva (Cuadro 1.13), se obtuvo que el SR sea el más afectado, aunque no mostró diferencia significativa con el SC. Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron entre SC-STN y SR-STN.

Cuadro 1.12. Comparación de índices de severidad en raíces mediante la prueba de *t*, para determinar diferencias significativas con una significancia de 0.05, en tres sistemas de producción de vainilla.

Variable	Sistema	IS	Comparación	t_c	$t_{t\alpha/2, n1 + n2}$
Severidad	SR	34.6	SR vs. SC	1.191	2.571
	SC	32.1	SC vs. STN	5.799*	2.447
	STN	25.1	SR vs. STN	3.927*	2.228

*Regla de decisión: Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq -t_{t\alpha/2, n1 + n2}$ Los índices son distintos, IS= índice de severidad

Cuadro 1.13. Comparación del ABCPE de la severidad en raíces de vainilla mediante la prueba de *t* (Infante y Zárate, 2013).

Variable	Comparación de ABCPE	tc	tt $\alpha/2, n1 + n2$
Severidad	SR (1267.71) vs. SC (1004.42)	0.21	2.31
	SC (1004.42) vs. STN (529.09)	2.35*	2.31
	SR (1267.71) vs. STN (529.09)	-1.69*	-2.57

SR=Sistema rústico, SC= sistema convencional, STN=sistema tutor naranjo, *diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

1.5.9.5 Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento del hospedante

También se compararon las tasas del crecimiento y desarrollo de las plantas de vainilla (Cuadro 1.14) y los resultados demostraron que la biomasa de raíces fue significativamente diferente en los tres sistemas de manejo y el huerto SC presentó la tasa más alta ($r=0.0242$). La tasa de crecimiento más baja de la biomasa se obtuvo en el SR ($r=0.011$), mismo sistema donde la severidad fue más alta ($S=34.6$). Para el caso de las variables número de entrenudos, hojas y longitud de tallo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los sistemas de manejo (Cuadro 1.14).

Cuadro 1.14. Comparación de las tasas de incremento de las variables de crecimiento y desarrollo de la vainilla, mediante la prueba de *t* con una (P=0.05) (Infante y Zárata, 2013)

Variable	Comparación	Tasa de incremento(r_G)	t_c	$t_{t \alpha/2, n1 + n2}$
Biomasa de raíces	SR vs. SC	$r = 0.0109$ vs. $r_L = 0.0242$	-8.715*	-2.007
	SC vs. STN	$r_L = 0.0242$ vs. $r_L = 0.0180$	2.617*	2.013
	SR vs. STN	$r_L = 0.0109$ vs. $r_L = 0.0180$	-6.163*	-2.023
Entrenudos	SR vs. SC	$r_L = 0.0425$ vs. $r_L = 0.0378$	-0.548	-2.007
	SC vs. STN	$r_L = 0.0378$ vs. $r_L = 0.0310$	0.888	2.013
	SR vs. STN	$r_L = 0.0425$ vs. $r_L = 0.0310$	0.445	2.021
Hojas	SR vs. SC	$r_L = 0.0319$ vs. $r_L = 0.0414$	-1.199	-2.007
	SC vs. STN	$r_L = 0.0414$ vs. $r_L = 0.0300$	0.990	2.013
	SR vs. STN	$r_L = 0.0319$ vs. $r_L = 0.0300$	-0.112	2.021
Longitud de tallo	SR vs. SC	$r_L = 0.0266$ vs. $r_L = 0.0318$	-0.577	-2.07
	SC vs. STN	$r_L = 0.0318$ vs. $r_L = 0.0236$	1.153	2.013
	SR vs. STN	$r_L = 0.0266$ vs. $r_L = 0.0236$	0.618	2.021

*Regla de decisión: Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq -t_{\alpha/2, n1 + n2}$ las tasas son distintas

1.5.9.6 Relación de incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo

El análisis de regresión lineal simple de las diferentes variables, permitió detectar la relación entre algunas variables del hospedante con la enfermedad, cabe señalar que dichas relaciones son diferentes en cada sistema de manejo. En el caso del sistema de manejo rústico se encontró una relación aceptable de la incidencia y longitud del tallo, con un coeficiente de determinación $R^2=69\%$ y una probabilidad de 0.03. También entre la severidad y el número de entrenudos con un $R^2=62\%$ y una probabilidad de 0.06. Para el convencional se obtuvo relación positiva entre severidad y biomasa de raíces con un $R^2=81\%$ y una probabilidad de 0.01. En el caso del manejo tutor naranjo la relación de la incidencia con el número de entrenudos fue positiva con $R^2= 81\%$ (Cuadro 1.15).

Cuadro 1.15. Regresión lineal para las variables de la enfermedad y el hospedante, para determinar relaciones.

Variables	Rústico		Convencional		Tutor naranjo	
	R ²	Pr>F	R ²	Pr>F	R ²	Pr>F
Incidencia-biomasa	0.12	0.507	0.044	0.69	0.28	0.277
Incidencia-entrenudos	0.46	0.13	0.64	0.5	0.81*	0.014*
Incidencia-longitud de tallo	0.69*	0.03*	0.59	0.07	0.29	0.26
Inoculo-incidencia	0.0009	0.9	0.06	0.6	0.12	0.49
Inoculo-severidad	0.1	0.8	0.08	0.58	0.07	0.6
Severidad-biomasa	0.07	0.61	0.81*	0.01*	0.0009	0.95
Severidad-longitud de tallo	0.56	0.08	0.04	0.7	0.39	0.7
Severidad-entrenudos	0.62*	0.06	0.05	0.67	0.001	0.94

*Existe una relación positiva estadísticamente significativa entre las variables.

1.6. DISCUSIÓN

El aislamiento e identificación de *Fusarium* como uno de los hongos más frecuentes en raíces y suelo de vainilla, sugiere que está involucrado en la enfermedad marchitez en la región del Totonacapan. En México se ha demostrado que el causante de la pudrición de raíces y tallos es *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (Adame *et al.*, 2011), y también se ha reportado en otros países como China (Xia-Hong, 2007), Colombia (Santa *et al.*, 2011) e Indonesia (Pinaria *et al.*, 2010); y a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* en Isla de la Reunión, Madagascar y la polinesia Francesa (Koyyappurath *et al.*, 2015).

La marchitez (pudrición de tallos y raíces) es la enfermedad más importante en el cultivo de vainilla (Hernández, 2011) y los daños son más notorios en sistemas de producción intensiva como las casa sombra, debido a que las condiciones de alta densidad de plantas favorece la infección (Bahi y Dhanesh, 2008, Santa *et al.* 2012). A pesar de los diversos estudios sobre el agente causal la información en aspectos epidemiológicos apenas empieza a cobrar importancia. En esta investigación se estudió el comportamiento temporal considerando los tres componentes del triángulo de la enfermedad (Patógeno, hospedante y ambiente).

Con base en los resultados de la prueba de *t*, en el componente patógeno se obtuvo que la cantidad de propágulos g^{-1} de suelo de rizósfera presentó la tasa de crecimiento más alta en el huerto STN y en éste mismo sistema se obtuvo la mayor tasa de *Fusarium*. También se obtuvo que la severidad mostrara diferencias estadísticamente significativas entre los huertos SC-STN y entre SR-TN, donde el SR tuvo el mayor índice de severidad. No existió relación entre estas variables evaluadas. Al respecto, se infiere que este comportamiento se debe a que no todos los aislamientos de *Fusarium* son patógenos (Adame *et al.*, 2015), ya que sabe que algunos aislamientos de *Fusarium* actúan como endófitos y/o micorrizas juegan un papel muy importante en el comportamiento de la enfermedad (Alabouvette, 1999) y probablemente jueguen un papel muy importante en el comportamiento de la enfermedad. Durante todas las evaluaciones realizadas en la investigación se aisló de manera frecuente a *Rhizoctonia* y a *Trichoderma* de los que se conoce que pueden actuar como micorrizas, antagonistas y endófitos (Atala *et al.*, 2015). Lo anterior nos indica que a pesar de la presencia del patógeno, las plantas de vainilla también son reservorios de hongos benéficos. En este estudio, las cepas más frecuentes y abundantes corresponden a *F. oxysporum* pero cabe destacar que dentro de este género existen cepas no patogénicas (Kaur *et al.* 2010).

Las enfermedades por *Fusarium* se han incrementado en ornamentales y los mayores daños están representados por las formas especiales del patógeno (Lodovica *et al.* 2012). En el caso

específico de orquídeas, los daños por *Fusarium* se han incrementado en todo el mundo y sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales (Srivastava *et al.*, 2017). A la par, se han reportado cepas no patogénicas en orquídeas, como endófitos y con funciones micorrízicas e inclusive con capacidad antagonista de otras especies de *Fusarium* (Tombe *et al.* 1997).

Al comparar la mayor incidencia con la menor severidad en el STN, se explica que este resultado es porque la vainilla presenta un buen desarrollo influenciado por las condiciones del microclima proporcionado por las pantas de naranjo (Hernández, 2011). Lo anterior se relaciona a lo reportado por Sánchez (2001) donde se evaluó el desarrollo de la vainilla en tres sistemas de producción y donde el menor porcentaje de plantas con marchitez por *Fusarium* fue en tutor naranjo o temporal. La severidad no dependió de la densidad de inóculo ni de la incidencia en raíces en ninguno de los sistemas, como normalmente ocurre en los sistemas de producción de cultivos anuales y en otros patosistemas (Rekah *et al.* 2001). Se encontró una relación significativa entre la biomasa y la severidad en el SC, donde se presentaron porcentajes altos de severidad y menor cantidad de biomasa radical. Esto se explica porque el patógeno afecta principalmente las raíces provocando pudrición y descortezamiento lo que se verá reflejado en el peso debido a la pérdida de tejido. Evidentemente, la enfermedad afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lodovica *et al.* 2012) y generalmente en una etapa fenológica del cultivo la epidemia provoca los mayores daños (Naseri y Tabande, 2017). Con base a lo anterior, se explica lo obtenido en el SR donde la incidencia mostró un efecto negativo en la longitud de tallos y el STN la cantidad de entrenudos se vio reducida por incremento en la incidencia de *Fusarium* en raíces. Aunque la severidad fue mayor en el SR, no se encontró una relación directa con la biomasa de raíces; sólo en el el huerto SC se obtuvo que la biomasa se ve reducida por el daño de la enfermedad.

En cuanto a los modelos epidemiológicos, el monomolecular fue el que describió satisfactoriamente el comportamiento temporal de la incidencia y densidad de inóculo en los SR, SC y STN. Las curvas de crecimiento para la biomasa de raíces, número de entrenudos, número de hojas y longitud de tallo fueron mejor descritas por el modelo logístico. El modelo que explica el comportamiento de la enfermedad, explica que la que la incidencia en las raíces está determinada por la densidad de inóculo presente en el suelo y en los residuos de plantas y raíces muertas. El modelo obtenido para esta epidemia, ha descrito el comportamiento de las enfermedades con origen en el suelo de varios patosistemas, en los cuales la velocidad de la enfermedad es proporcional a la cantidad de inóculo inicial y la tasa de incremento (Arneson, 2006). Un ejemplo de epidemia con origen en el suelo descrita por este modelo es la

podrición blanca de la cebolla por *Sclerotium cepivorum*, donde se reportó que la mayor incidencia estuvo en función de una alta densidad de inóculo (Ponce *et al.* 2008).

El alto porcentaje de incidencia descrito por el modelo monomolecular y el índice de severidad en raíces de vainilla, sugiere que el inóculo se encuentra presente en la superficie del suelo y probablemente también en las raíces aéreas y base del tallo de los tutores, debido a que las raíces y tallos muertos se quedan como residuos adheridos al tutor y en las coberturas de materia orgánica. Cuando las plantas generan nuevas raíces se infectan al entrar en contacto con el suelo o los residuos de plantas y raíces muertas (Koyyappurath *et al.* 2016). Lo anterior se sustenta en que la vainilla es un cultivo perenne y la enfermedad se encuentra presente todo el año, por lo que la acumulación de inóculo y el desarrollo de la epidemia se convierte en un problema grave (Ploetz, 2007). En los huertos SR y SC se realizan podas sanitarias para eliminar plantas con síntomas de pudriciones, sin embargo, al suelo no se le da manejo y las raíces muertas y partes de tallos quedan como fuente de inóculo para generar nuevas infecciones. La enfermedad marchitez de la vainilla causada por *Fusarium* sp., puede considerarse como una enfermedad endémica con fases epidémicas, porque como se observó en este trabajo, existieron periodos donde la incidencia y la severidad se incrementaron.

La DI mostró resultados de hasta 8.9 (1×10^3) propágulos g^{-1} de suelo de rizósfera en el STN, donde las prácticas de manejo fueron escasas. En el SR y SC la DI fue de hasta 4.6 y 5.7 (1×10^3) propágulos g^{-1} de suelo de rizósfera, densidades muy altas a pesar de que se realizan prácticas de manejo (podas sanitarias, aplicación de composta).

El análisis de las curvas de crecimiento es un método importante que permite definir y establecer estrategias de manejo preventivo para esa etapa donde la enfermedad presentó una mayor incidencia y severidad (Hernández *et al.* 2009). La mayor severidad en raíces de vainilla se presentaron en SR y SC, esto también se ve influenciado por las practicas del manejo agronómico. La aplicación de coberturas (materia orgánica) es una práctica sobre la cual se debe prestar atención, debido a que no se le da un tratamiento estricto (composteo) y esto puede representar una fuente apropiada para el incremento del patógeno. También es de vital importancia llevar a cabo la eliminación de residuos enfermos como raíces muertas adheridas al tutor, con la finalidad de reducir la cantidad de inóculo en el suelo.

Las condiciones de temperatura y humedad del suelo desempeñan un papel importante en el desarrollo de la epidemia y en este caso se usó la temperatura del ambiente y la humedad relativa. Bajo este esquema y de manera general para los tres sistemas, los porcentajes de severidad más altos se presentaron entre los meses mayo-junio que corresponden a la etapa de amare de frutos, por lo que las estrategias de manejo deben aplicarse antes de que inicie el

periodo de brote de yemas florales. Principalmente debe prestarse atención a la humedad del suelo porque mayo y junio son los meses más secos (27.5 °C y 82.3% HR) y el estrés hídrico afecta considerablemente el cuajado de los frutos (Barrera *et al.* 2009).

Las variables de crecimiento también reflejan el efecto tanto de la enfermedad como de las condiciones climáticas, el SC presentó las áreas más altas de biomasa, número de entrenudos, número de hojas y longitud de liana. La biomasa y número de hojas fue mayor en octubre, mientras que el número de entrenudos y longitud de liana se presentó en Diciembre. Durante este periodo la temperatura disminuyó y la humedad relativa incrementó (21.3 °C y 91.3% HR), el cultivo se encontraba en la etapa de madurez de los frutos y próximos a la cosecha. De manera indirecta, se determinó que la enfermedad afecta la producción de las plantas. Basado en el número de frutos, las plantas del huerto STN produjeron más y con un rendimiento total de 150 Kg, seguido por el SC con 94 Kg y finalmente el SR el cual perdió el total de los frutos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, resaltan la importancia de conocer el comportamiento temporal de la enfermedad en relación a las condiciones climáticas y las etapas fenológicas del cultivo. Se obtuvo información que permite establecer nuevas estrategias para el manejo y la toma de decisiones para lograr un manejo adecuado del cultivo de vainilla y de la marchitez causada por *Fusarium* sp., considerando las características del sistema de producción. Dichas estrategias deberán tener un enfoque sustentable para reducir la población del patógeno, con aplicaciones de compostas, utilización de esquejes sanos en las nuevas plantaciones, favorecer el crecimiento de poblaciones de microorganismos benéficos del suelo. La nutrición de la planta es un factor muy importante ante el ataque de fitopatógenos y en la región del Totonacapan se ha detectado que los vainillales presentan deficiencias nutricionales en sus etapas fenológicas de crecimiento, floración y desarrollo de frutos (Carrillo y González, 2016); con base en lo anterior, también se debe considerar la nutrición de las plantas. La información obtenida en este trabajo aún es preliminar y por ello se sugiere que deben llevarse a cabo más estudios epidemiológicos a largo plazo tanto en condiciones naturales del cultivo como bajo condiciones experimentales en campo, laboratorio e invernadero, que permitan conocer mejor el comportamiento del patógeno, del hospedante y de las condiciones ambientales conducivas de la enfermedad marchitez de la vainilla.

1.7. CONCLUSIONES

Diversas especies de *Fusarium* forman parte del microbioma de la vainilla y *F. oxysporum* es el agente causante de la enfermedad marchitez, y su incidencia y densidad de inóculo en suelo de rizósfera son favorecidas por la temperatura y humedad del ambiente, generando infecciones a lo largo del ciclo del cultivo principalmente en las etapas de desarrollo de frutos (junio y septiembre) y crecimiento vegetativo (diciembre-febrero), periodos en los que se presentó un incremento en la severidad. La dinámica temporal de la densidad de inóculo e incidencia fueron descritas por el modelo monomolecular en los tres sistemas de manejo de la vainilla; el efecto de los sistemas de producción se observó en el STN, que presentó los niveles más bajos de severidad reflejándose de manera indirecta en el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas. Esta investigación permitió conocer la dinámica de la marchitez en cada sistema y con base en ello se podrán establecer estrategias de manejo preventivo que permitan disminuir el daño, principalmente en las etapas fenológicas donde se identificó el incremento de la enfermedad.

1.8. LITERATURA CITADA

- Adame GJ, Trigos LAR, Iglesias ALG, Flores EN y Luna RM. 2011 Variaciones isoenzimática y patogénica de *Fusarium* spp. asociadas con la pudrición de tallo y raíz de vainilla.. Tropical and Subtropical Agroecosystems 13: 299-306. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/939/93920942006.pdf>.
- Alabouvette, C. 1999. Australasian Plant Pathology 28: 57-64. <https://doi.org/10.1071/AP99008>
- Arneson PA. 2006. Epidemiología de las enfermedades de las plantas: los aspectos temporales. American Phytopathological Society. DOI.10.1094/PHI-A-2001-0524-01.
- Barrera RA, Herrera CH, Jaramillo VJL, Escobedo GJS y Bustamante GA. 2009. Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y malla sombra en el Totonacapan. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 10:199-212.
- Bhai RS and Dhanesh J. 2008. Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. Journal of Spices and Aromatic Crops 17(2): 140-148.
- Bory S, Grisoni M, Duval MF and Besse P. 2008. Biodiversity and preservation of *Vanilla*: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution* (55):551–571.
- Carrillo GR y González CMCA. 2016. Prácticas que favorecen la nutrición en el cultivo comercial de *Vanilla panifolia* Jacks. ex Andrew. Agroproductividad 9(9):23-24.
- De la Cruz JM, Rodrigue, JGC y García SH. 2009. Vanilla: post-harvest operations. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 50p.
- FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Geissman TA. 1973. Principles Of Organic Chemistry . Editorial Reverté 3da edición. 1010p.
- Havkin-Frenkel D and Belanger F. 2011. Handbook of vanilla science and technology. Ed. Wiley-Blackwell. 333p.
- Hernández HJ. 2007. Casa-sombra: sistema nuevo de producción intensiva de vainilla, en la Región del Totonacapan. Agroentorno. INIFAP 90. Año 10. Octubre.
- Hernández HJ y Sánchez MM. 2011. Producción de planta de calidad de vainilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson). INIFAP 60. 32p.
- Hernández HM. 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) establecimiento y mantenimiento. INIFAP. 25p.

- Hernández J, Sababria N, Blanco G, Ulacio D, Linares B y Pérez A. 2009. Progreso de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el ciclo I de plátano hartón con fertilización nitrogenada y potásica en el municipio de Veroes, estado de Yaracuy. Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. División Caribe (No. 3194).
- Herrera CBE, Salazar RM, Delgado AA, Campos, CJE and Cervantes VJ. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences* 2:37-44.
- Hollyday P. 1995. *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge University Press. 624p.
- Infante GS y Zárata PG. 2013. *Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario*. 3^{ra} edición. Colegio de Postgraduados. 610p.
- Kaur R, Kaur J and Singh R. 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology Journal* 9(3): 79-91. DOI.10.3923/ppj.2010.79.91.
- Koyyappurath S, Atuahiva T, Le Guen R, Batina H, Le SS, Gautheron N, Edel-Hermann V, Peribe J, Jahiel M, Steinberg C, Liew ECY, Alabouvette C, Besse P, Dron M, Sache I, Laval V and Grisoni M. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of *Vanilla*. *Plant Pathology* (2016) 65, 612–625.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. 386p.
- Lodovica GM, Daughtrey LM, Garibaldi A and Elmer H.W. 2015. *Fusarium* wilts of ornamentals crops and their management. *Crop Protection* 73: 50-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.003>.
- Menchaca GR. 2009. La Vainilla. *La Ciencia y el Hombre*. Universidad Veracruzana. 22(1): 31-34.
- Naseri B and Tabande L. 2017. Patterns of *Fusarium* wilt epidemics and bean production determined according to a large-scale dataset from agro-ecosystems. *Ehizosphere*. 3: 100-104.
- Noriega CDH, Téliz D, Mora AG, Rodríguez AJ, Zavaleta ME, Otero CG and Campbell, LC. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrated management. *Plant Dis*. 83:223-228.
- Ploetz RC. 2007. Disease management in tropical perennial crop. *Palmas* 28:326-338.
- Ponce HV, García ER, Rodríguez GMP y Zavaleta ME. 2008. Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia* 42(1): 71-83.

- Ramírez C, Castaño J, Villegas B y Aristizábal M. 2012. Efecto de inductores de resistencia sobre las sigatokas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach) en plátano. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 15 (2): 363–371.
- Ramos QF, Bautista HA y Sotelo NH. 2017. Relación de la temperatura y la humedad relativa con el brote del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(3): 713-720.
- Rekah Y, Shtienberg D and Katan J. 2001. Population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in relation to the onset of Fusarium crown and root rot of tomato. *European Journal of Plant Pathology* 107: 367–375, 2001.
- Sánchez MS, Becerril RAE, Tijerina CL y Santizo RJA. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Rev. Fitotec. Méx.* 24(1): 49.56.
- Santa CC, Montoya MM, Díez MC. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista Mexicana de Micología* (32): 23-34.
- Schlüter PM, Soto AMA and Harris SA. 2007. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economy Botany* 61(4): 328-236. Used and conservation of *Vanilla planifolia* J. in Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences* 2(1):43-50.
- Tombe M, Sitepu D and Mogi S, 1997. Present status of biological control Research of vanilla stem rot disease in Indonesia. In: *Proceedings of the 4th international workshop on plant growth promoting rhizobacteria*, Sapporo, Japan. (Eds. A. Ogosi, K. Kobayashi, Y. Homma, N. Kondo and S. Akino) Sapporo, Japan. pp: 13-21.
- Vargas HJ y Gámez VHG. 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra huasteca potosina. INIFAP-SAGARPA. 19p.

CAPÍTULO II. DINÁMICA DE LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA ASOCIADA A *Fusarium* spp. DURANTE DOS CICLOS DE CULTIVO EN PAPANTLA, VERACRUZ

**Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018**

2.1. RESUMEN

El trabajo se realizó con el objetivo de determinar la dinámica temporal de la marchitez de la vainilla durante dos ciclos de cultivo bajo manejo convencional. El experimento se realizó de mayo 2016 a diciembre 2017. Se seleccionaron 30 plantas en una plantación ya establecida de cinco años de edad; se cuantificó la densidad de inóculo (DI) de (número de propágulos de *Fusarium* g⁻¹ de suelo de rizósfera), así como su incidencia y severidad en raíces de vainilla; de la planta de vainilla se evaluó biomasa de raíces, número de entrenudos, hojas frutos, y longitud de tallos. También se evaluaron las variables climatológicas temperatura y humedad relativa del ambiente. Si hizo aplicación única de lombricomposta, *Trichoderma* sp. nativo, caldo bordelés, lombricosposta+*Trichoderma* sp. y un testigo. En base a las diferentes mediciones y observaciones se determinaron etapas fenológicas. La DI absoluta máxima fue de 5.7 y 11.2 propágulos g⁻¹ de suelo de rizósfera, incidencia de 79% y 80.6%, el para los ciclos 2016 y 2017 respectivamente. El progreso temporal de la DI e incidencia fue descrito por el modelo monomolecular, la mayor tasa de incremento de cada variable fue $r_M=0.011$ y $r_M=0.005$ y sólo la DI fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$). Las curvas del crecimiento y desarrollo del hospedante se ajustaron al modelo logístico y sus tasas de incremento mostraron diferencias significativas. La severidad más frecuente fue de clase 3 (18%) y el IS 32.1% y 32.6% generando epidemias estadísticamente iguales con un ABCPE de 2270.9 y 1772.3 para los ciclos 2016 y 2017. Durante las etapas desarrollo de frutos y crecimiento vegetativo, presentaron los porcentajes más altos de severidad y el T5 (lombricomposta) tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de daño en el ciclo 2017. La mayor caída de hojas (4.3%) y frutos (21.7%) se presentó en el ciclo 2016.

Palabras clave: tasa de incremento, progreso temporal, índice de severidad, etapas fenológicas, vainilla.

TEMPORAL DYNAMICS VANILLA WILT ASSOCIATED TO *Fusarium* spp., DURING TWO CULTIVATION CYCLES IN PAPANTLAVERACRUZ

Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

2.2. ABSTRACT

The work was realized with objective of determine the temporary dynamics vanilla wilt during two cultivation cycles under conventional handling. The experiment was realized from May 2016 until December 2017. Thirty plants five years old age were selected in already established plantation; inoculo density (ID) of *Fusarium* spp. (propagulos number of *Fusarium* g⁻¹ of rizosphere soil) was quantified, incidence and severity in vanilla roots; vanilla plant evaluate biomass of roots, internodes number, leaves, fruits, and stems length. Also there evaluated the climatological variables temperature and environmental moisture. In flowering were aplicated lombricomposta, native isalate *Trichoderma* sp.,bordeles broth, lombricosposta+*Trichoderma* sp. a test. Based on the different measurements and remarks were decided phenologics stage. ID maxim was 5.7 and 11.2 propagulos g⁻¹ of rizosphere soil, incidence of 79 % and 80.6 %, roots severity 27.5 % and 36.2 % in cycles 2016 and 2017 respectively. Biomass roots, internodes number, leaves and length of stems increased significantly in the cycle 2017. Temporary progress ID and incidence were described by the monomolecular model, the biggest increase rates of every variable was $r_M=0.011$ and $r_M=0.005$; the curves of the growth and development host plant fitted the logistic model; in two cycles. The epidemics comparison by means of the *t* test and taking into consideration the valuations increase of monomolecular model (r_M) and the severity index (*S*) showed that only ID it was per statistics different ($p\leq 0.05$). Host plant variables were significantly different. Were determined the stages fenologics vegetative growth, floral egg yolks, flowering and pollination, growth and development of fruits, harvest. During the fruits development and after the harvest the highest percentages of severity appeared. Only T5 (lombricomposta) had a significant effect in the roots severity. The biggest rotting leaves (4.3 %) and fruits (21.7 %) was evident in the cycle 2016.

Key words: valuation of increase, temporary progress, index of severity, fenologics stages, vanilla.

2.3. INTRODUCCIÓN

La Región del Totonacapan ubicada en el estado de Veracruz es considerada la zona productora más importante de México y aporta el 76.8% de la producción nacional (SIAP-SAGARPA, 2017). Sin embargo, el cultivo es severamente afectado por la enfermedad marchitez causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* que provoca pudrición de tallos y raíces (Adame *et al.*, 2015), y eventualmente la caída de hojas y frutos (González-Reyes *et al. en proceso*). Los mayores daños se presentan durante las etapas tempranas después del establecimiento del cultivo, y como consecuencia hay pérdidas en población y en el rendimiento (Hernández, 2011). Los estudios realizados en este patosistema han sido enfocados al control biológico (Athul *et al.*, 2012), filogenia (Pinaría *et al.* 2015; Flores *et al.*, 2018), incidencia de hongos asociados (Vijayan *et al.*, 2012), patogenicidad y virulencia (Adame *et al.*, 2015), y resistencia (Nielsen, 2000). De acuerdo a Hernández (2011), la marchitez de la vainilla se encuentra presente todo el tiempo en la región del Totonacapan en México, y se ha documentado que la forma especial *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, es la causante de esta enfermedad, ya que es la más frecuente y abundante en hojas, tallos y raíces (Adame *et al.*, 2015). En México se han llevado a cabo muy diversos estudios en relación al cultivo de la vainilla y a las posibles causas que favorecen la expresión y daño de la enfermedad de la marchitez (Borbolla *et al.*, 2016; Gangadhara *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2001). Sin embargo, se desconoce la dinámica espacio-temporal y otros aspectos epidemiológicos de este patosistema, siendo de vital importancia realizar estudios con este enfoque considerando los componentes del triángulo de la enfermedad. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue determinar el comportamiento temporal de *Fusarium* spp., asociado a la marchitez de la vainilla bajo un sistema de producción convencional en casa sombra, en relación a la aplicación de tratamientos que incluyeron: lombricomposta, del hongo antagonista *Trichoderma*, caldo bordelés, su combinación y un testigo fenología del cultivo y las variables temperatura y humedad relativa del ambiente, durante dos ciclos del cultivo.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Localización del área de estudio

Ésta segunda parte de la investigación se realizó de febrero a diciembre de 2017, dando seguimiento al vainillal con manejo convencional y bajo malla sombra, ubicado en la comunidad “Solteros de Juan Rosas” (20° 20' 19" N y 97° 12' 4" W), municipio de Papantla, Veracruz. Durante ese periodo se realizaron 10 muestreos periódicos y en las mismas plantas se evaluaron las variables: incidencia y severidad en raíces, densidad de inóculo de *Fusarium* en suelo de rizósfera (colonias g⁻¹). Se seleccionó siempre el mismo tallo (liana) para cuantificar número de hojas, número de entrenudos y longitud de tallo, número de frutos, caída de hojas, caída de frutos y rendimiento (kg/panta). Se registraron las fases fenológicas de la planta y las variables climáticas siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior.

2.4.2. Evaluación del efecto de cinco tratamientos sobre la enfermedad marchitez de la vainilla y el patógeno *Fusarium* spp.

Para proporcionar alternativas en el manejo del cultivo y a petición de los productores, el 19 de marzo de 2017 se hizo una aplicación única de cinco tratamientos para evaluar su efecto sobre la enfermedad (Cuadro 2.1). Los tratamientos se aplicaron en un diseño completamente al azar con seis repeticiones (plantas), donde la unidad experimental fue una planta de vainilla (Figura 2.1).

Cuadro 2.1. Tratamientos aplicados a plantas de vainilla para evaluar su efecto sobre la enfermedad marchitez, en la Región del Totonacapan.

Tratamiento	Vía de aplicación
T ₁ . Vermicomposta	Alrededor del cuello de la planta
T ₂ . <i>Trichoderma</i> sp.	Al cuello
T ₃ . Caldo bordelés 1%	Aspersión al follaje
T ₄ . Vermicomposta + <i>Trichoderma</i> sp.	En mezcla (3:1 peso/peso) alrededor del cuello de la planta.
T ₅ . Testigo absoluto	Sin aplicación

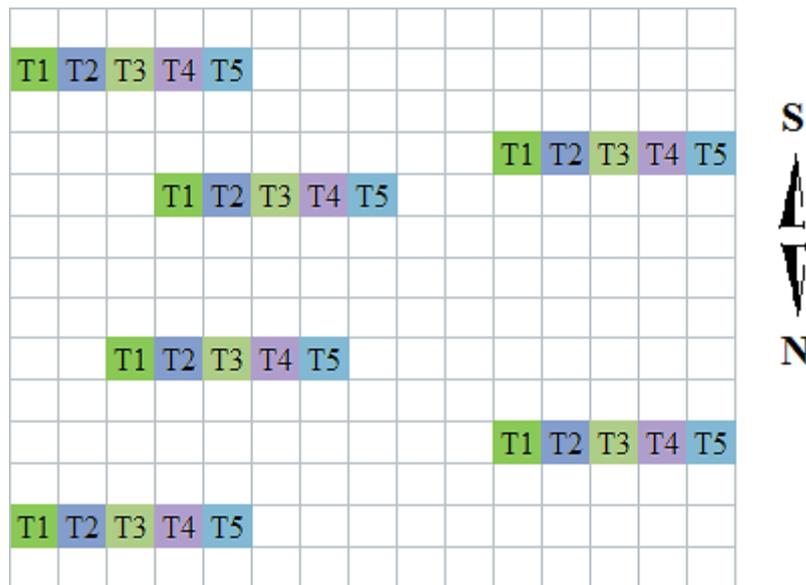


Figura 2.1. Arreglo de los tratamientos aplicados en campo, al inicio de la floración.

Aplicación de lombricomposta. La lombricomposta se obtuvo en el Centro de Investigación Capacitación y Transferencia de Tecnología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se aplicaron 3kg de vermicomposta por planta.

Trichoderma. En el caso de *Trichoderma*, se seleccionó un aislamiento nativo obtenido en julio de 2016 a partir de las raíces de vainilla extraídas en los muestreos. Éste aislamiento de *Trichoderma* (TV1) mostró *invitro* una alta capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *Fusarium* spp. La cepa de *Trichoderma* se purificó mediante la técnica de cultivo monospórico en medio de cultivo PDA, incubado en condiciones de oscuridad a 27 °C. Para su aplicación en campo la cepa se incrementó utilizando arroz como sustrato, con base en la metodología propuesta por Sivila y Álvarez (2013). La concentración del inóculo de esporas de *Trichoderma* a aplicar, se evaluó con apoyo de la cámara de Neubauer; se hizo un conteo de esporas para obtener la cantidad contenida en un gramo de sustrato. A partir de eso, se preparó una concentración de 1×10^9 conidios/g de sustrato. Se aplicaron 40.4g del sustrato de arroz por planta.

Caldo bordelés (1%). Se preparó a una concentración del 1%, para lo cual se elaboró una mezcla de 0.1g de Sulfato de cobre + 0.1g de Cal en 10L de agua, se mezcló perfectamente y se aplicó al follaje con una mochila aspersora de 15L de capacidad. .

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANAVA) y se aplicó la prueba de separación de medias de Tukey ($P=0.05$), con apoyo del paquete estadístico Software SAS V.9

2.4.3. Análisis estadístico

2.4.3.1. Ajuste de Curvas del desarrollo temporal de la enfermedad a modelos determinísticos no-flexibles de crecimiento.

Los datos de densidad de inóculo, incidencia y severidad obtenidos durante los muestreos de cada ciclo, se analizaron aplicando tres modelos empíricos de crecimiento temporal en su forma linearizada: Logístico ($\ln y/(1-y) = \ln (y_0/1-y_0) + r_L t$), Gompertz $-\ln(-\ln y) = -\ln(-\ln y_0) + r_G t$, y Monomolecular [$\ln (1/1-y)] = \ln [(1/1-y_0) + r_M t]$], de acuerdo a lo propuesto por Campbell y Madden (1990). Las tasas de incremento promedio de las epidemias para cada modelo: logístico (r_L), gompertz (r_G) y monomolecular (r_M) se estimaron aplicando el Modelo Lineal General (GLM) utilizando el método de mínimos cuadrados y usando el paquete estadístico SAS[®] 9.0. Se eligió el modelo que describió mejor el progreso temporal de la enfermedad para cada ciclo de evaluación con base en los estadísticos: coeficiente de terminación (R^2), cuadrado medio del error (CME), probabilidad del modelo (F), valor de los errores estándar de los parámetros β_0 y β_1 y su nivel de significancia, y distribución de los valores residuales. Para el ajuste de la incidencia de *Fusarium* spp. en raíces, se calculó la incidencia acumulada ajustada a la ecuación $Y_{ic} = Y_i/N$ (Noriega *et al.*, 1999); donde Y_{ic} es la incidencia acumulada, Y_i es el número acumulado de trocitos de raíces con crecimiento de *Fusarium* en el tiempo i y N es el total de trocitos de raíces sembrados durante el ciclo.

2.4.3.2. Análisis cuantitativo de la severidad

En el caso de la severidad se realizó una distribución de frecuencias y se calculó el índice de severidad (IS) mediante la fórmula: $IS = (\sum nv / (N-1) * T) * 100$ donde, IS=índice de severidad, n =número de plantas por cada clase, v =valor de clase y $N-1$ = número de clases y T =total de plantas (Ramírez *et al.*, 2012) y para éste análisis se utilizó el paquete estadístico Microsoft Excel 2010[®].

2.4.3.3. Análisis cuantitativo del comportamiento del crecimiento y desarrollo del hospedante

Los datos de las diferentes variables de la planta hospedante: biomasa de raíces, número de entrenudos, número de hojas y longitud de tallo se ajustaron a la función logística de crecimiento poblacional ($\ln (y/(k-y))$), considerando una $K_{máx}$ (capacidad de carga) de acuerdo al valor máximo de cada variable (Campbell y Madden, 1990).

2.4.3.4. Comparación de epidemias entre los dos ciclos de evaluación y comparación de los tratamientos aplicados en el segundo ciclo

Para determinar diferencias estadísticamente significativas de la enfermedad, crecimiento y desarrollo de la vainilla durante los ciclos de producción 2016 y 2017, se compararon las tasas de crecimiento obtenidas en el modelo de mejor ajuste. En el caso de la severidad se comparó el índice de severidad obtenido en cada ciclo. Para los datos de cada variable se aplicó la prueba estadística F para determinar si las varianzas fueron distintas o iguales. La comparación de la diferentes epidemias se hizo mediante una prueba de t , con el paquete estadístico Microsoft Excel 2010® y para determinar diferencias estadísticas significativas al 0.05 se aplicó la regla de decisión propuesta por Infante y Zárate (2013): Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq - t_{\alpha/2, n1 + n2}$.

2.4.3.5. Relación de incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo

Se realizaron diferentes análisis de regresión lineal simple entre las variables densidad de inóculo, incidencia y severidad en relación a las variables biomasa de raíces, número de entrenudos, número de hojas, longitud de liana, así como en relación a las variables climáticas de temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial. Para ello se aplicó el Modelo Lineal General usando el método de Mínimos Cuadrados, y con apoyo del Software SAS V.9. De esta manera se determinó la relación entre los componentes del triángulo de la enfermedad.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Dinámica de los principales componentes del patosistema marchitez de la vainilla, en relación a la fenología

La severidad en el ciclo 2016 se mantuvo constante en el periodo mayo-agosto (se presentaron altas temperaturas con fluctuaciones en la humedad relativa) y donde alcanzó un máximo de 56.1%; también se presentó una disminución en el mes de octubre (Figura 2.2). En diciembre se observó un incremento continuo hasta marzo 2017 y en mayo alcanzó un IS máximo (66.7%). El índice de severidad arrojó un incremento de la severidad durante el ciclo 2017, pero estadísticamente no fue significativo. Presentó una tendencia a incrementar en ciertos periodos como: abril-mayo (amarre de frutos), julio-septiembre (desarrollo de frutos) y diciembre (crecimiento vegetativo). Sin embargo, los mayores IS se presentaron durante la etapa fenológica de amarre de desarrollo de frutos (Figura 2.2).

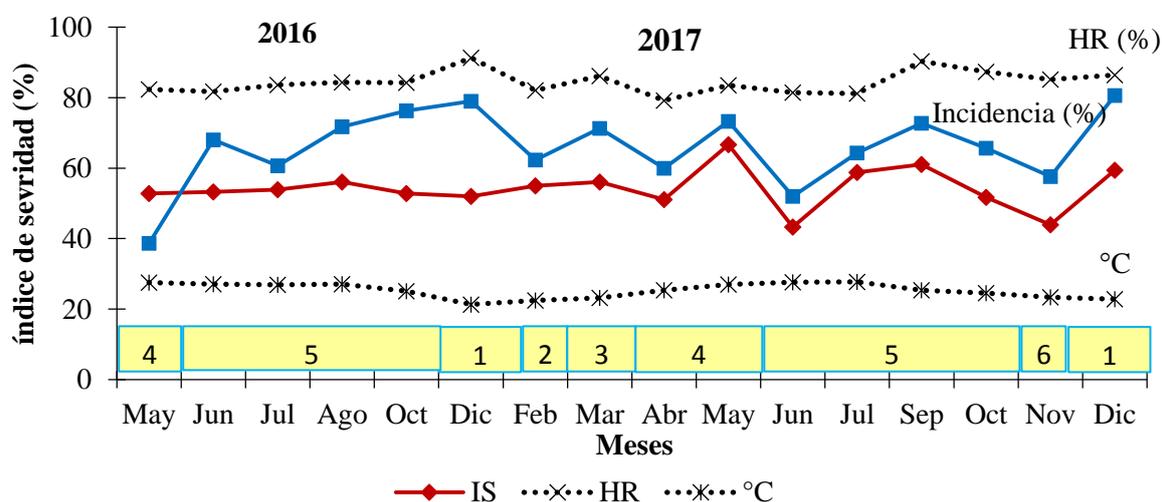


Figura 2.2. Dinámica de la incidencia y severidad de *Fusarium* spp., durante los ciclos 2016 y 2017 en un huerto de vainilla con sistema de producción convencional de vainilla, en la Región del Totonacapan, Veracruz; 1-6: etapas fenológicas.

La incidencia de *Fusarium* en raíces presentó un comportamiento similar severidad en el ciclo 2017. Los puntos máximos fueron junio y diciembre con 68 y 79% en 2016. Julio fue la fecha donde la incidencia tuvo el porcentaje más bajo y los meses restantes aumentó de manera constante y finalizó con una incidencia máxima del 79%. El ciclo 2017 inició con incidencia baja, los picos de incremento se presentaron en marzo, mayo y septiembre con 71.3, 73.3 y 72.7% respectivamente. Al finalizar los muestreos en diciembre se alcanzó la máxima incidencia que fue de 80.6% y la cual fue 1.6% mayor con respecto a la incidencia final del ciclo 2016 (Figura 2.2).

La densidad de inóculo presentó un comportamiento diferente durante los dos ciclos, aunque la tendencia fue similar a la de la incidencia. En 2016 se presentaron dos puntos de incremento (junio y diciembre) con 5.7 y 5.1 (1×10^3) colonias g^{-1} de suelo de rizósfera. El primero se presentó al iniciar la etapa de desarrollo de los frutos y el segundo después de la cosecha que es un periodo donde las plantas presentaron una reducción en su crecimiento. Para el ciclo 2017 se presentaron tres puntos muy marcados de la densidad de inóculo e incidencia, que fueron: marzo, mayo y julio, donde la DI fue de 11.2, 10.6, y 10.1 (1×10^3) colonias g^{-1} de suelo de rizósfera. Disminuyó considerablemente en noviembre y los meses restantes del ciclo aumentaron de manera constante. La DI absoluta máxima fue de 5.7 y 11.2 colonias g^{-1} de suelo de rizósfera para los ciclos 2016 y 2017 respectivamente (Figura 2.3).

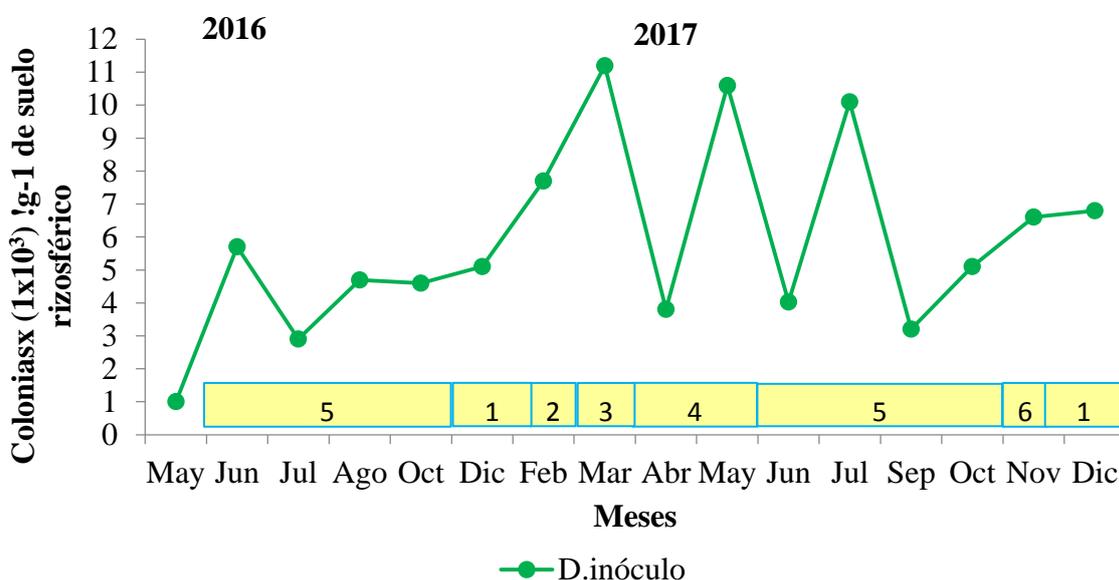


Figura 2.3. Dinámica de la densidad de inóculo en las diferentes etapas fenológicas de la vainilla; 1-6: etapas fenológicas.

2.5.2. Dinámica del crecimiento y desarrollo del hospedante

Las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante, mostraron de manera general una etapa (julio-septiembre que es la fase de desarrollo y madurez de frutos) en el ciclo de cultivo donde los valores fueron elevados. La biomasa presentó los valores más altos (0.85-1.41g) en el periodo junio-agosto durante el ciclo 2016, y para 2017 en mayo-octubre con valores que oscilaron en 0.82-1.08g. En el caso del número de entrenudos, hojas y longitud de tallo, en el segundo ciclo los valores más altos se presentaron en junio-noviembre que corresponde a la etapa de desarrollo de los frutos. Se presentaron tres puntos de incremento en abril, junio y septiembre. Diciembre mostró un descenso muy marcado en estas tres variables en los dos

ciclos de producción. En el ciclo 2017 se observó un aumento significativo en número de todas las variables (Figura 2.4).

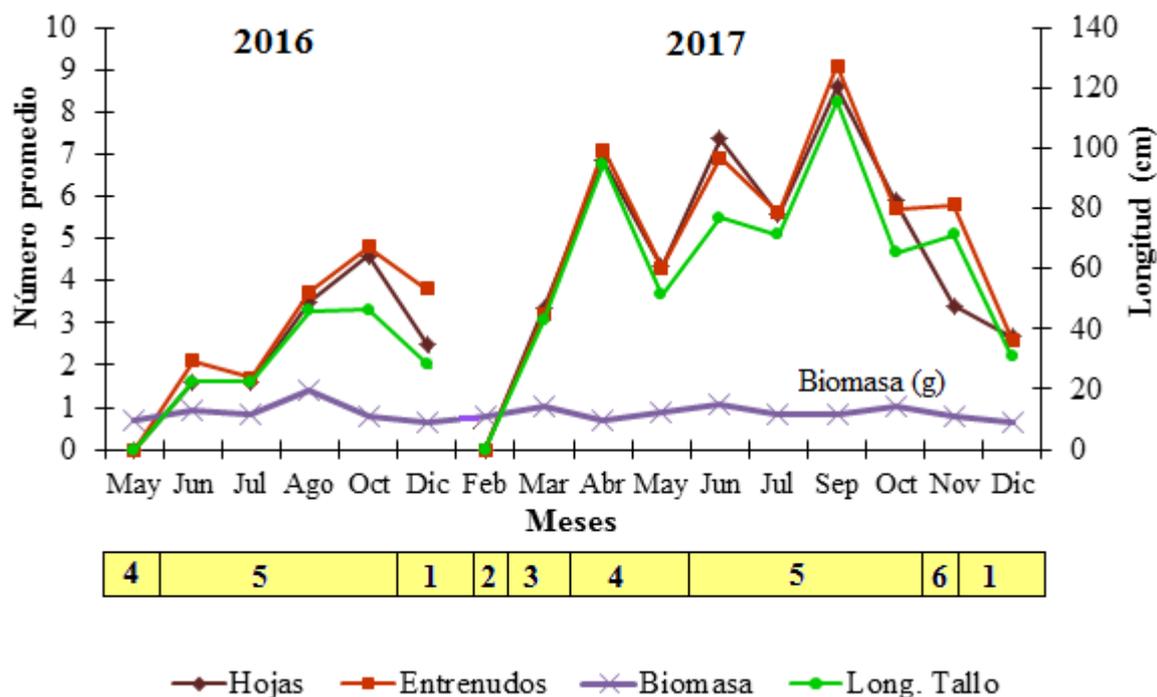


Figura 2.4. Dinámica de las variables de crecimiento promedio de la vainilla en un sistema de producción convencional durante dos ciclos de cultivo, de 2016-2017; 1-6: etapas fenológicas.

2.5.3. Análisis del efecto de tratamientos sobre la enfermedad marchitez de la vainilla

En base al análisis estadístico de los tratamientos, se obtuvo que sólo el T1 (lombricomposta) tuvo un efecto significativo en la severidad de la enfermedad. En comparación con el testigo que presentó una media de 33.18, el T1 representó el mejor tratamiento para la severidad en raíces con una media de 19.36 (Cuadro 2.2). Para la DI e incidencia no hubo diferencias estadísticamente significativas en el efecto de los tratamientos. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos respecto a biomasa, entrenudos, hojas y longitud de tallo (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.2. Severidad del daño causado por marchitez en raíces de vainilla en los tratamientos establecidos en un sistema de producción convencional en el ciclo febrero-diciembre 2017, y su agrupación de acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey.

Tratamiento	Media	Grupo Tukey*
T5	33.18	a
T2	27.69	ab
T3	25.66	ab
T4	22.64	ab
T1	19.36	b

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 2.3. Medias de las variables del patógeno, crecimiento y desarrollo de la vainilla, agrupados de acuerdo a la separación de medias de Tukey, para un sistema de manejo convencional en la Región del Totonacapan.

Tratamiento	DI*	Incidencia*	Biomasa de raíces*	Entrenudos*	Hojas*	Longitud de tallo*
T1	7.6 a	6.32 a	0.85 a	5.23 a	4.16 a	58.8 a
T2	6.4 a	6.37 a	0.84 a	6.53 a	5.0 a	84.4 a
T3	6.0 a	6.82 a	0.89 a	6.28 a	5.2 a	74.6 a
T4	7.9 a	7.02 a	0.88 a	6.17 a	4.8 a	73.0 a
T5	7.8 a	6.63 a	0.83 a	5.57 a	4.8 a	66.9 a

* Valores con la misma letra, son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).

2.5.4. Evaluación de la caída de hojas y frutos

La caída de hojas en el ciclo 2017 fue más baja respecto al ciclo 2016, con una disminución del 2.58%. El porcentaje de caída de frutos en el ciclo 2017 fue del 5.01%, con una disminución de 16.76% respecto al ciclo 2016 (Cuadro 2.4). Los meses donde se presentó la mayor caída de hoja fue en junio y julio del ciclo 2016, en el ciclo 2017 se presentó en mayo y septiembre. La mayor caída de frutos se presentó en el mes de julio en los dos ciclos de producción (Figura 2.5), coincidiendo con la época en que se tuvo el mayor amarillamiento y pudrición de frutos observado en campo y que también fue el mes de julio, lo cual probablemente fue favorecido por las temperaturas de 26.9-27.7 °C y HR de 81.2-83.6%

registradas en ese periodo; por otra parte, fue también en este periodo cuando se presentó un incremento en la severidad.

Cuadro 2.4. Porcentaje de caída de hojas y frutos respecto al total, en un huerto de vainilla bajo producción convencional en la Región del Totonacapan, Veracruz, durante los ciclos de producción 2016 y 2017.

Ciclo	Hojas			Frutos		
	Totales	Caídas	Pérdida (%)	Totales	Caídas	Pérdida (%)
2016	806	34	4.25a	294	64	21.77a
2017	1432	24	1.67b	1397	70	5.01b

*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

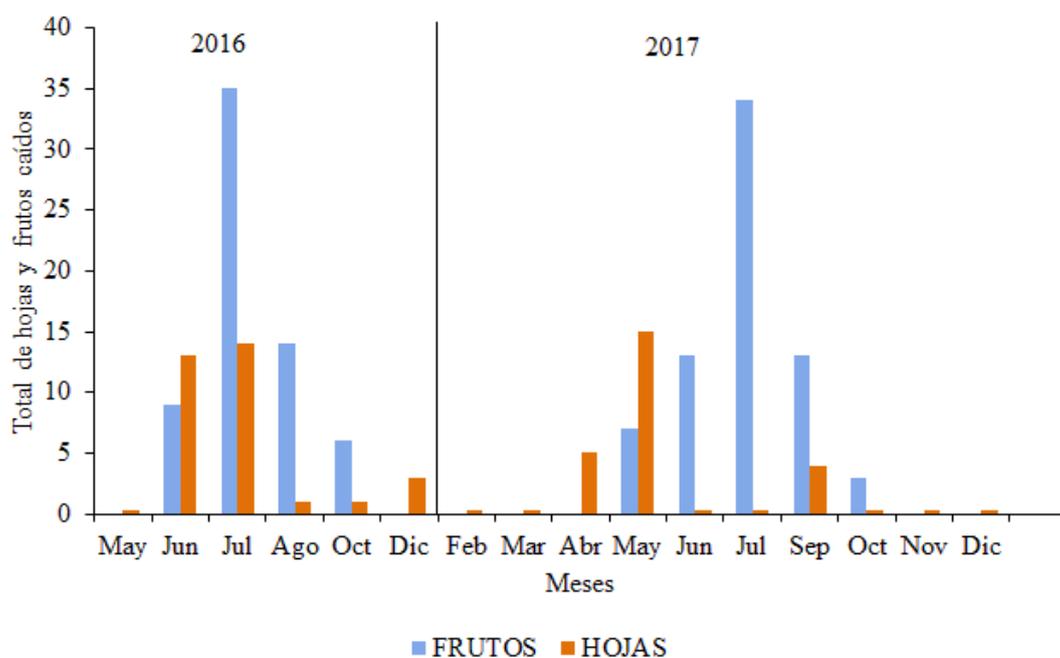


Figura 2.5. Caída de hojas y frutos de vainilla durante los ciclos de producción 2016 y 2017, en la Región del Totonacapan.

Con base en la prueba de chi-cuadrado (X^2) se obtuvo que el porcentaje de caída de hojas y frutos a causa de amarillamiento y pudrición, fueron significativamente diferentes entre los ciclos de producción 2016 y 2017. En el ciclo 2017 el porcentaje de pérdida se redujo significativamente (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5. Datos de porcentaje de la caída de hojas y frutos, sometidos a la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para determinar diferencias significativas entre los ciclos 2016 y 2017.

Ciclo	Hojas		Frutos	
	Pérdida (%)	X^2 (Pr \geq F)	Pérdida (%)	X^2 (Pr \geq F)
2016	4.25	2.03×10^{-40} *	21.77	2.16×10^{-26} *
2017	1.67		5.01	

* Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

2.5.5. Evaluación del rendimiento

La cosecha de los frutos de vainilla se establece en base a diferentes criterios, pero generalmente se realiza durante la segunda semana de noviembre una vez cumplidos los nueve meses del ciclo. En el ciclo 2016 no se evaluaron todas las variables de producción, pero en 2017 el rendimiento total superó al obtenido en el ciclo anterior (Cuadro 2.6). Las plantas evaluadas presentaron un rendimiento promedio de 0.57 Kg y 44.2 frutos por planta. Cabe resaltar que el ciclo 2016 presentó la severidad más baja y en el 2017 se obtuvo un rendimiento con un 36.2% más respecto al anterior (Figura 2.6).

Cuadro 2.6. Rendimiento de vainilla bajo sistema de producción convencional en la Región del Totonacapan.

Ciclo	Rendimiento total (Kg)	Rendimiento promedio (Kg)	Total de frutos	Frutos promedio
2016	94	NE	NE	NE
2017	149	0.57	1327	44.2

NE= no evaluado

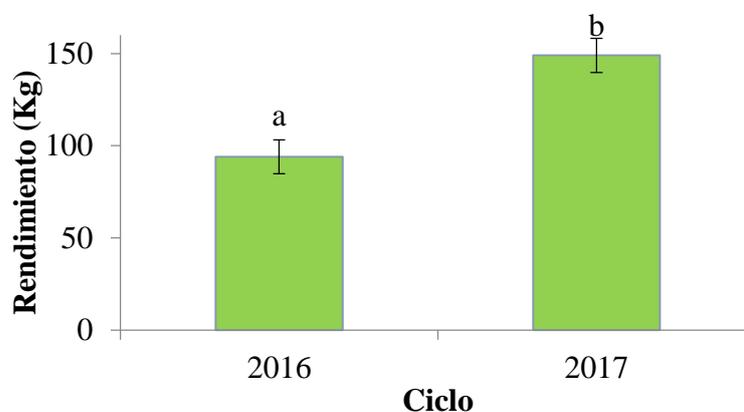


Figura 2.6. Rendimiento total del huerto durante dos ciclos de producción.

2.5.6. Variables climatológicas.

La temperatura media incrementó a partir de abril durante la etapa de amarre de frutos, y los registros más altos permanecieron hasta septiembre que corresponde a la etapa de desarrollo del fruto. Los porcentajes más altos de humedad relativa oscilaron entre 84.2 y 91.3% y se registraron de septiembre a diciembre, periodo en el que la temperatura disminuyó considerablemente. Este comportamiento de la temperatura y humedad relativa es similar para ambos ciclos de cultivo (Figura 2.7).

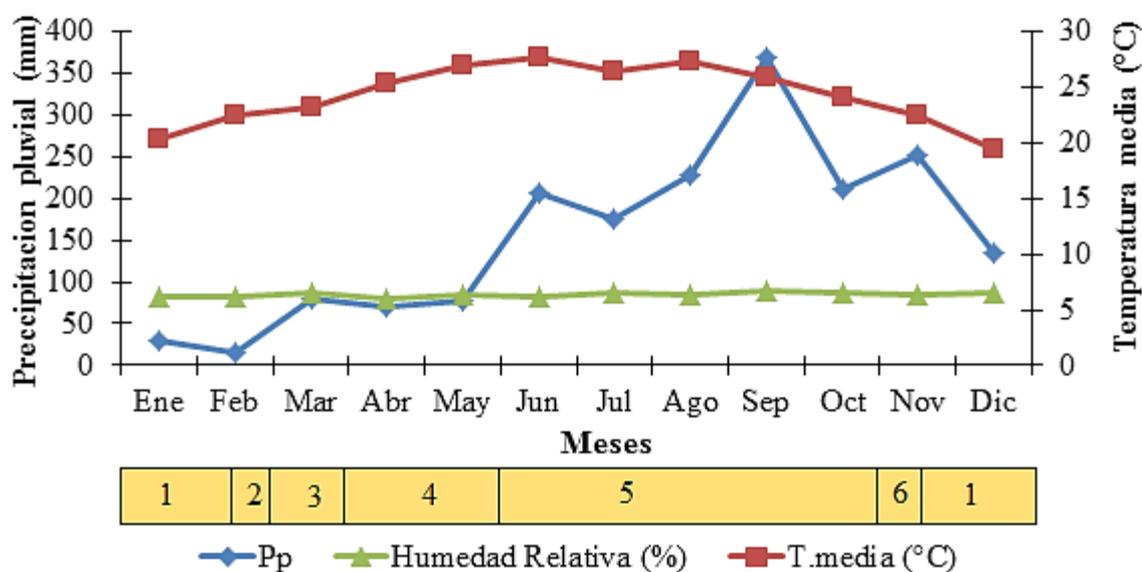


Figura 2.7. Temperatura y humedad relativa en relación a las etapas fenológicas de la vainilla durante el ciclo 2017; 1-6: etapas fenológicas.

2.5.7. Análisis cuantitativo de la dinámica de *Fusarium* asociado a la marchitez y pudrición de las raíces en vainilla.

2.5.7.1. Ajuste a modelos epidemiológicos de comportamiento temporal

Los datos de incidencia de *Fusarium* en raíces, densidad de inóculo (DI= colonias g⁻¹ de suelo de rizósfera) y severidad, fueron descritos adecuadamente por el modelo monomolecular. Con base en los parámetros considerados, las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante fueron descritos por el modelo logístico. Ambos modelos describieron el comportamiento de la enfermedad y del hospedante respectivamente para los dos ciclos de producción (Figura 2.8). En los ciclos 2016 y 2017, las variables DI, incidencia fueron bien descritas por el modelo monomolecular de acuerdo a los estadísticos presentados en el (Cuadro 2.7).

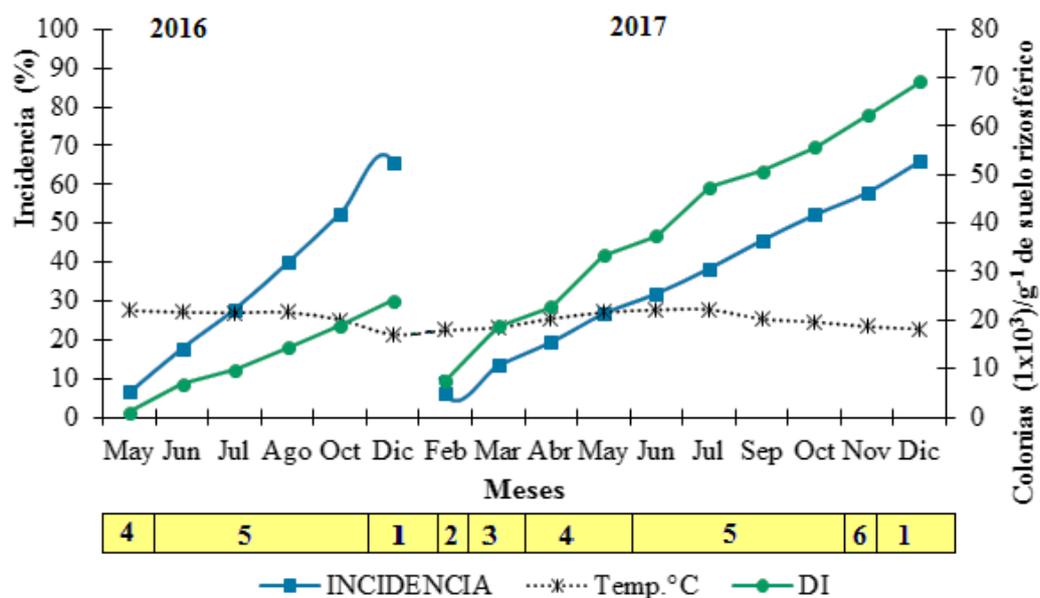


Figura 2.8. Curvas del progreso temporal de la densidad de inóculo e incidencia descritas por el modelo monomolecular en dos ciclos de reproducción; 1-6 etapas fenológicas

Cuadro 2.7. Estadísticos considerados para el ajuste al modelo de crecimiento monomolecular aplicado a la incidencia, densidad de inóculo en suelo de rizósfera (colonias/g⁻¹ suelo) de *Fusarium* spp., en raíces de vainilla durante los ciclo 2016 y 2017.

Estadísticos	Incidencia		Densidad de inóculo	
	2016	2017	2016	2017
R ² (%)	99.5	97.6	98.3	74.1
CME	0.0001	0.0030	0.0005	0.4850
Pr>F	<.0001	<.0001	0.0001	0.0014
$\hat{S}_{\beta 0}$	0.0060	0.0307	0.0139	0.3907
Pr	0.0003	0.2827	0.0399	0.5385
$\hat{S}_{\beta 1}$	0.0001	0.0002	0.0001	0.0023
Pr	<.0001	<.0001	0.0001	0.0014
r	0.0048	0.0032	0.002	0.011
Re	A	A	A	A

R²= Coeficiente de determinación, CME= Cuadrado medio del error, Pr>F= probabilidad del modelo, r= tasa de crecimiento, $\hat{S}_{\beta 0}$ =error estándar del intercepto, $\hat{S}_{\beta 1}$ =error estándar de la pendiente, Re=residuales, A=adecuado

2.5.7.2. Análisis cuantitativo de la severidad en raíces

En base al análisis de distribución de frecuencias, se determinó que para los ciclos 2016 y 2017 la clase de severidad más frecuente fue 3(18%) con un porcentaje de plantas del 44.4 y 37.3% en esa categoría. En el 2016 sólo el 0.6% de las plantas presentaron la clase 1(0% de daño). De manera general, los porcentajes de daño que presentó la mayoría de las plantas fueron 18%(Coloración café + necrosis), 38%(coloración café + pérdida de turgencia+ necrosis+ pudrición) y 5.5% (coloración café); lo cual se puede observar en la Figura 2.9.

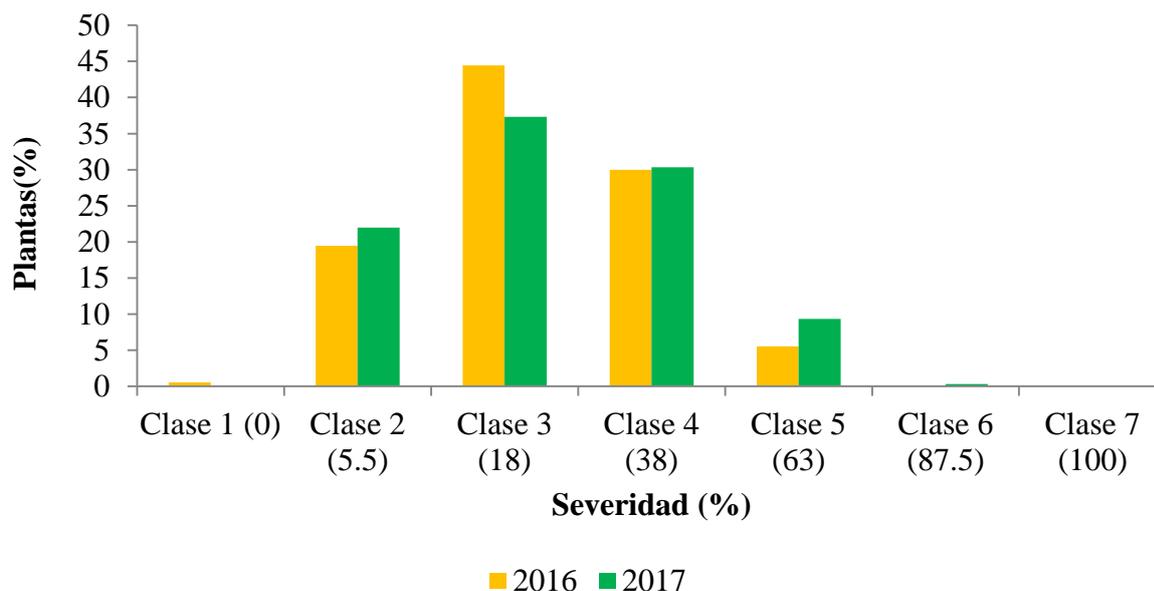


Figura 2.9. Frecuencia del porcentaje de la severidad en raíces de vainilla durante mayo-diciembre 2016 y febrero-diciembre 2017, en un huerto con manejo convencional, en la Región del Totonacapan, Veracruz.

2.5.7.3. Análisis cuantitativo de las variables de crecimiento y desarrollo de la planta hospedante.

Las variables longitud de tallo, entrenudos (Figura 2.10A), biomasa de raíces y hojas (Figura 2.10B) mostraron un incremento en número en el ciclo 2017. En ambos ciclos la curva de cada variable fueron descritas por el modelo Logístico, donde la biomasa de raíces se ajustó con $R^2=92.1\%$ y la longitud de tallo con un $R^2=84.6\%$, el número de entrenudos con $R^2=80.2\%$ y el número de hojas con un $R^2=84.7\%$; y los estadísticos considerados se especifican en el Cuadro 2.8.

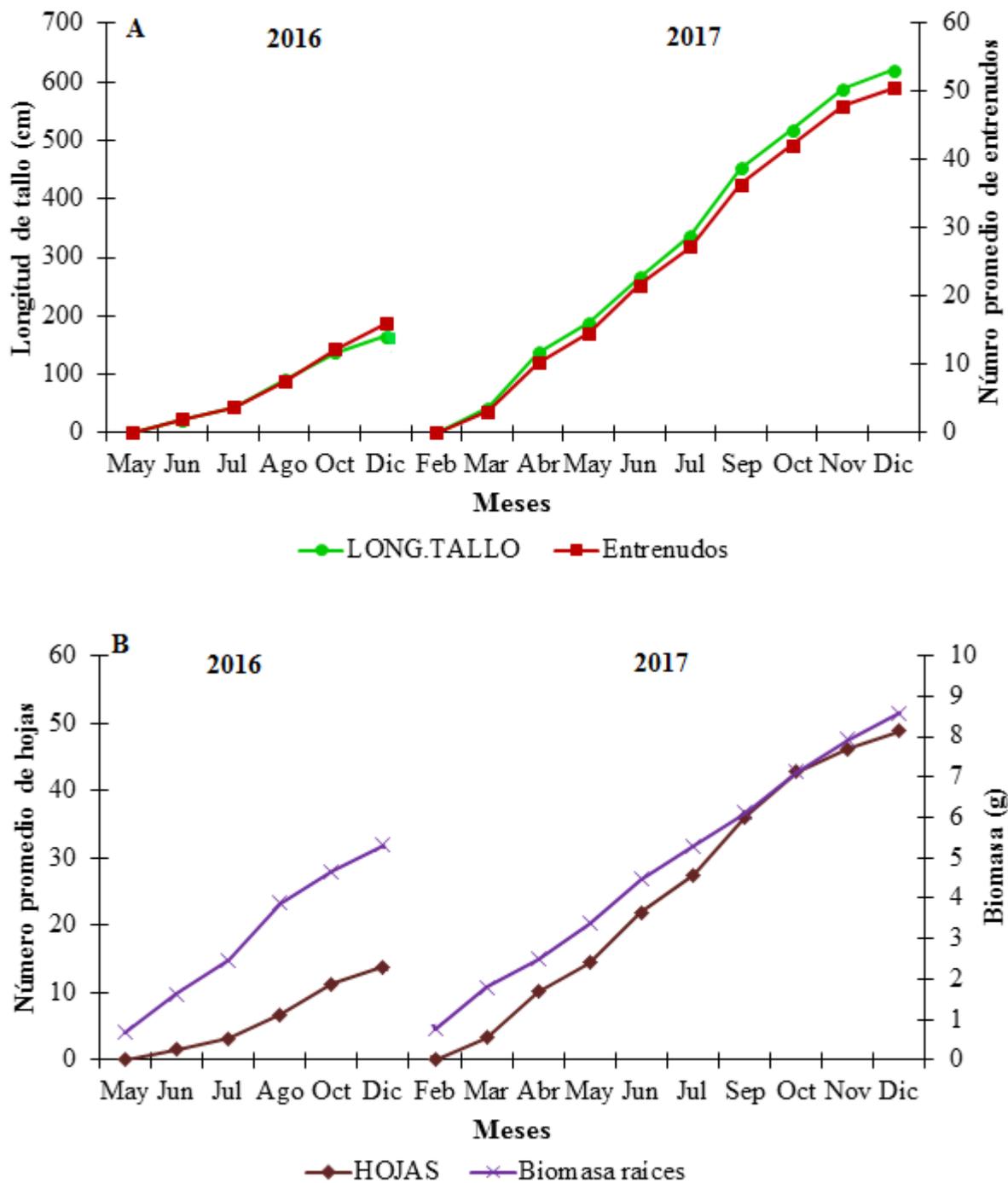


Figura 2.10. Curvas de crecimiento descritas por el modelo logístico: A) longitud de tallos y entrenados, B) hojas y biomasa de raíces, durante dos ciclos de producción.

Cuadro 2.8. Estadísticos considerados para el ajuste al modelo logístico que describió el progreso temporal de la biomasa, número de hojas, entrenudos y longitud de lianas de la vainilla en tres sistemas de manejo con una significancia de 0.05.

Estadísticos	Biomasa de raíces ($K_{\text{máx}}=8.7$)		Entrenudos ($K_{\text{máx}}= 51$)		Hojas ($K_{\text{máx}}= 49$)		Longitud de tallo ($K_{\text{máx}}=650$)	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
R^2 (%)	85.4	92.1	0.578216	80.2	80.7	84.7	0.66.3	84.6
CME	0.2161	0.3345	4.3121	2.8544	3.1521	2.3769	1.6865	1.2902
Pr>F	0.0084	<.0001	0.0792	0.0005	0.0150	0.0002	0.0486	0.0002
\hat{S}_{β_0}	0.2999	0.325	1.3398	0.9478	1.1456	1.0532	0.8379	0.6372
Pr	0.0035	0.0002	0.0157	0.0009	0.0155	0.0003	0.0055	0.0003
\hat{S}_{β_1}	0.0026	0.0019	0.0118	0.0055	0.0101	0.16973	0.0074	0.0037
Pr	0.0084	<.0001	0.0792	0.0005	0.0150	0.0002	0.0486	0.0002
r	0.013	0.018	0.028	0.031	0.041	1.131	0.021	0.024
Re	A	A	A	A	A	A	A	A

R^2 = Coeficiente de determinación, CME= Cuadrado medio del error, $Pr>F$ (α)= probabilidad del modelo, r= tasa de crecimiento, \hat{S}_{β_0} =error estándar del intercepto, \hat{S}_{β_1} =error estándar de la pendiente, Re=residuales, A=adecuado.

2.5.7.4. Comparación de epidemias

La comparación de tasas fue de manera directa debido a que los datos se ajustaron al modelo Monomolecular (r_M) en los dos ciclos de producción (Cuadro 2.9). Los resultados indicaron que las tasas de crecimiento de la densidad de inóculo fueron estadísticamente diferentes entre los ciclos 2016 y 2017. En el caso de la incidencia de *Fusarium* en suelo de rizósfera, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tasas (Cuadro 2.10).

Cuadro 2.9. Tasas de crecimiento del modelo monomolecular, usadas para comparar el progreso de la marchitez de la vainilla durante dos ciclos de producción bajo sistema convencional

Variable	Ciclo	Tasa de crecimiento (r)
Densidad de inóculo	2016	0.002
	2017	0.011
Incidencia	2016	0.005
	2017	0.003

Cuadro 2.10. Comparación de las tasas de crecimiento de los componentes de la enfermedad marchitez de la vainilla mediante la prueba de t (Infante y Zárate, 2013).

Variable	Comparación	Tasa de crecimiento(r_M)	t_c	$t_{\alpha/2, n1 + n2}$	Regla de decisión Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq - t_{\alpha/2, n1 + n2}$ hay diferencia entre tasas
Densidad de inóculo	C1 vs. C2	$r_M=0.002$ vs. $r_M=0.011$	15.68	2.035	Las tasas son distintas (P=0.05)
Incidencia	C1 vs. C2	$r_M=0.005$ vs. $r_M=0.003$	1.130	2.002	Las tasas son iguales (P=0.05)

C1= ciclo 2016, C2= ciclo 2017

La severidad de la enfermedad se comparó con los índices de severidad (IS) obtenidos para cada ciclo de producción, donde se obtuvo con IS=32.1% para el ciclo 2016 y IS=32.6% para el ciclo 2017. La comparación mediante la prueba de t , tanto del IS (Cuadro 2.11) como el ABCPE (Cuadro 2.12), indicó que no existió diferencia estadísticamente significativa en la severidad entre los dos ciclos 2016 y 2017.

Cuadro 2.11. Comparación de índices de severidad en raíces de vainilla mediante la prueba de t (P=0.05), para los ciclos de producción 2016 y 2017.

Variable	Ciclo	IS	Comparación	t_c	$t_{t \alpha/2, n1 + n2}$	Regla de decisión: Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq - t_{t \alpha/2, n1 + n2}$ hay diferencia entre índices
Severidad	2016	32.1	Ciclo 2016 vs. Ciclo 2017	0.0107	2.179	Los índices son iguales (P=0.05)
	2017	32.6				

IS= índice de severidad

Cuadro 2.12. Comparación del ABCPE de la severidad en raíces de vainilla mediante la prueba de t (Infante y Zárate, 2013), para los ciclo producción 2016 y 2017.

Ciclo	ABCPE	t_c	$t_{t \alpha/2, n1 + n2}$	Regla de decisión
2016	2270.9			1.028
2017	1772.3			

t_c = valor calculado, $t_{t \alpha/2, n1 + n2}$ = valor de tablas

2.5.7.5. Comparación del crecimiento y desarrollo de la vainilla

La comparación de las tasas de crecimiento del modelo logístico, indicaron diferencias estadísticamente significativas de las variables de crecimiento y desarrollo del hospedante durante los ciclos de producción 2016 y 2017 (Cuadro 2.13).

Cuadro 2.13. Comparación de las tasas de incremento (modelo logístico) de las variables de crecimiento y desarrollo de la vainilla mediante la prueba de t ($P=0.05$), durante los ciclos de producción 2016 y 2017.

Variable	Comparación	Tasa de crecimiento(r_M)	t_c	$t_{t \alpha/2, n1 + n2}$
Biomasa	C1 vs. C2	$r_L=0.013$ vs. $r_L=0.018$	9.642*	2.011
Entrenudos	C1 vs. C2	$r_L=0.028$ vs. $r_L=0.031$	9.658*	2.002
Hojas	C1 vs. C2	$r_L=0.041$ vs. $r_L=1.131$	10.048*	2.002
Longitud de tallo	C1 vs. C2	$r_L=0.021$ vs. $r_L=0.024$	10.070*	2.002

* Regla de decisión: Si $t_c \geq t_{\alpha/2, n1 + n2}$ o Si $t_c \leq -t_{\alpha/2, n1 + n2}$ Las tasas son distintas ($P=0.05$);

C1= ciclo 2016, C2= ciclo 2017

2.5.7.6 Relación de incidencia y severidad con las variables del clima, crecimiento y desarrollo del cultivo.

Con base en el análisis de regresión lineal simple, en el ciclo 2016 la DI se relacionó de manera directa con la incidencia en raíces con un $R^2= 81.3\%$, biomasa presentó una relación directa con la severidad con un $R^2=80.4\%$ y una probabilidad de 0.0154. La incidencia indicó una relación positiva con la severidad con un $R^2= 67.6\%$ y una probabilidad de 0.0035 sólo para el ciclo 2017. Se ha reportado que en las epidemias con origen en el suelo causadas por *Fusarium oxysporum* existe una relación directa de la densidad de inóculo inicial con la incidencia y severidad (Rekah *et al.* 2001). En este caso, el resto de las variables evaluadas no indicaron relación directa durante los ciclos de producción (Cuadro 2.14).

Cuadro 2.14. Análisis de regresión lineal entre las variables de la enfermedad y el hospedante.

Variables	Ciclo 2016		Ciclo 2017	
	R^2 (%)	$Pr>F$	R^2 (%)	$Pr>F$
DI-Incidencia	81.3*	0.014*	11.5	0.3367
Incidencia-severidad	3.8	0.712	67.6*	0.0035*
Severidad-biomasa	80.4*	0.015*	14.2	0.2834
Severidad-entrenudos	0.9	0.86	2.8	0.6411
Severidad-longitud de tallo	4.7	0.7	0.3	0.8820

*Relaciones positivas estadísticamente significativas

2.6 DISCUSIÓN

Las enfermedades causadas por hongos patógenos con origen en el suelo representan una de las limitantes más importante en los sistemas de producción agrícola. La infección depende de la habilidad del hongo para sobrevivir a las condiciones del suelo y las propiedades físicas de éste tienen un efecto en el progreso temporal de la enfermedad (Otten and Gilligan, 1998). Existen muchas estrategias culturales para el manejo de estas epidemias, sin embargo, se ha demostrado que el hongo tiene la capacidad para persistir y causar daños en años posteriores (Tebkwe and Ojiewo, 2016). En la presente investigación se obtuvieron niveles significativos en la densidad promedio del inóculo de *Fusarium* con valores de 5.7 y 11.2(x1000) colonias g⁻¹ de suelo de rizósfera para los ciclos 2016 y 2017. Una incidencia máxima de 80.6% y una severidad de 27.5% en raíces de vainilla durante el segundo ciclo. Estos valores altos en la densidad de inóculo e incidencia, se pueden explicar debido a que la vainilla es un monocultivo perenne y se ha demostrado que con el paso de los años hay un incremento en la población del patógeno, esto debido a que las prácticas de monocultivo propician la disminución de las comunidades microbianas benéficas del suelo cultivado con vainilla (Xiong *et al.* 2016).

En esta investigación, el comportamiento temporal la enfermedad fue descrito por el modelo de crecimiento monomolecular para los dos ciclos de producción, dicho modelo explica que el incremento en la enfermedad se da en relación a la cantidad de inóculo. Para el caso del crecimiento y desarrollo de las plantas, las curvas de crecimiento se ajustaron al modelo logístico.

El ciclo 2017 mostró un incremento en las variables absolutas de la enfermedad, de la planta y de la producción. Sin embargo, al comparar las variables se obtuvo que la tasa de incremento de la incidencia y el índice de severidad no fueron estadísticamente significativos; pero las tasas de crecimiento de la densidad de inóculo si fueron estadísticamente diferentes. Estos resultados podrían atribuirse al efecto de los tratamientos aplicados a inicios del ciclo, sin embargo, el análisis indicó que sólo el T1 (lombricomposta) tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la severidad de las raíces. Probablemente, el efecto sobre la severidad contribuyó indirectamente en el crecimiento y desarrollo de la vainilla. Cabe destacar que la aplicación de dichos tratamientos sólo se hizo una vez y esto puede representar una limitante para poder explicar el incremento en las variables. En base a lo anterior, se recalca la importancia de tomar en cuenta otros factores que pueden afectar el comportamiento tanto de la enfermedad y del hospedante, tales como la nutrición, prácticas sanitarias, calidad y sanidad de coberturas o materia orgánica que se aplica a las plantas.

También es importante resaltar, que la investigación se hizo en plantaciones ya establecidas y bajo prácticas de manejo que el productor establece, por lo que no se tuvo control estricto de la población evaluada.

En el ciclo 2016 los datos indicaron que la severidad tiene un efecto directo sobre la biomasa de las raíces, es decir, que a medida que la severidad aumenta la biomasa disminuye, y de manera indirecta son afectados el crecimiento y desarrollo de la planta. Para el ciclo 2017, la regresión lineal indicó que la biomasa de raíces no estuvo relacionada de manera directa con la severidad.

Cabe resaltar que se trata de un cultivo perenne y la enfermedad se encuentra presente todo el año, pero en determinadas etapas es más agresiva, por lo que puede considerarse como una enfermedad endémica con fases epidémicas. Esto se puede demostrar con las curvas de fluctuaciones de la enfermedad, en las que se observó que en el periodo noviembre-diciembre hay un incremento en la enfermedad y una marcada reducción en las variables de la planta. Este periodo es una etapa intermedia en la que la planta detiene la actividad reproductiva, y en campo se observó que el crecimiento vegetativo es más lento, debido a que la formación de nuevos entrenudos y hojas se reduce. En este periodo se incrementó la precipitación pluvial y humedad relativa, además se observó una disminución en la temperatura ambiental. Aunque no se encontró una relación directa entre los componentes del patosistema, como se esperaba, se sugiere que las condiciones climáticas del suelo como temperatura y humedad relativa, favorecen el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, en este trabajo sólo se evaluaron las variables climáticas del ambiente exterior.

El sistema de producción tiene un papel muy importante en el progreso de la enfermedad y generalmente, los cultivos intensivos son los más afectados. Con base en lo anterior, se plantea la recomendación de aplicar estrategias que disminuyan la incidencia del patógeno y una de éstas es incrementar las poblaciones de microorganismos benéficos en la rizósfera (Fu *et al.* 2016). Ésta práctica sería la más apropiada debido a que el sistema radical de la vainilla generalmente crece en la parte superficial del suelo. El manejo del suelo es sumamente importante y es en donde las prácticas del manejo de la enfermedad deben ser enfocadas. Para darle validez al argumento anterior, se ha demostrado que un suelo conducivo de vainilla alcanza niveles de incidencia de la enfermedad marchitez hasta un 70% y en un suelo supresivo la enfermedad se reduce al 22% de incidencia, debido al incremento en las comunidades microbianas principalmente hongos y bacterias (Xiong *et al.* 2017).

Con base en esto, se recalca la importancia de aplicar medidas preventivas para que al inicio del siguiente ciclo de producción, la marchitez no cause daños significativos. Adicionalmente,

se determinó que el periodo intermedio entre final de ciclo e inicio de otro dura dos meses (Diciembre-Enero), y considerando los resultados de esta investigación, dicho periodo es una etapa muy importante donde se puede dar tratamiento al suelo y reducir el impacto del patógeno. Por otro lado, como recomendación para el manejo preventivo se sugiere la aplicación de compostas adicionadas con diversos microorganismos benéficos, entre ellos endémicas de *Trichoderma*, como se realizó en este trabajo.

2.7 CONCLUSIONES

La enfermedad se presentó durante todo el ciclo del cultivo y la relación entre las curvas absolutas del progreso de la enfermedad y la fenología, demostraron que las etapas más afectadas son el amarre de frutos y el periodo Julio-septiembre que se ubica en la etapa de desarrollo de frutos; después de la cosecha la enfermedad incrementa considerablemente y los efectos se ven reflejados al iniciar el nuevo ciclo productivo.

La aplicación de lombricomposta tuvo un efecto en la severidad de la enfermedad, lo que se reflejó de manera indirecta en el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas. La aplicación de organismos benéficos y materia orgánica deberán aplicarse varias veces durante el año para lograr un efecto positivo continuo sobre la enfermedad y el patógeno.

Con base en la DI, incidencia y severidad de *Fusarium* se determinaron características epidemiológicas importantes como la forma de la curva de crecimiento de la enfermedad, tasa de incremento de la enfermedad (r) y etapa donde se presenta la máxima enfermedad (y_{max}), duración de la epidemia, que son parámetros epidemiológicos que permiten entender el comportamiento de la enfermedad y en trabajos futuros ayudarán a predecir cuando aplicar estrategias adecuadas para el mejor manejo de este sistema de producción.

El comportamiento temporal de la epidemia está fuertemente relacionado con la fenología de la vainilla, y la marchitez de la vainilla es una enfermedad endémica con ciclos epidémicos.

2.8 LITERATURA CITADA

- Adame GJ, Rodríguez GR, Iglesias AL, Ramos PM and Luna, RM 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93 (3): 669-678.
- Athul SR, Aju K and Jisha MS. 2012. Biocontrol of *Fusarium* wilt of vanilla (*Vanilla planifolia*) using combined inoculation of *Trichoderma* sp. and *Pseudomonas* sp. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(3): 706–716.
- Borbolla PV, Iglesias-Andreu LG, Herrera CBE y Vovides PA. 2016. Aborción prematura de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9(9):11-12.
- Campbell LC y Madden VL. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York. 532p.
- Flores, DFR, De Luna E, Adame GJ, Iglesias ALG andy Luna, RM. 2018. Phylogenetic Position and Nucleotide Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* worldwide based on Translation Elongation Factor 1 α sequences. DOI: 10.1111/ppa.12847/full.
- Fu L, Penton R, Ruan Y, Shen Z, Xue C, Li R, Shen Q. 2016. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. *Soil Biology & Biochemistry* 104: 39-48.
- Gangadhara NB, Nagaraja R, Basavaraja MK and Krishna NR. 2010. Variability studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* isolates. *International Journal of Science and Nature* 1(1): 12-16.
- Hernández HM. 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) establecimiento y mantenimiento. INIFAP. 25p.
- Infante GS y Zárata PG. 2013. *Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario*. 3^{ra} edición. Colegio de Postgraduados. 610p.
- Nielsen LR. (2000). Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W. Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb. f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133(3): 285-302(18) <http://doi: 10.1006/bojl.2000.0336>.
- Otten W and Guilligan, CA. 1998. Effect of physical conditions on the spatial and temporal dynamics of the soil-borne fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *New Phytol.* 138: 629-637.
- Pinaria AG, Laurence MH, Burgess LWY and Liew ECY. 2015. Phylogeny and origen of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in Indonesia. *Plant Pathology*. 64:1358-1365.

- Rekah Y, Shtienberg D and Katan J. 2001. Population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in relation to the onset of *Fusarium* crown and root rot of tomato. *European Journal of Plant Pathology* 107: 367–375, 2001.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2016. Servicio de Información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index (consulta, agosto 2017).
- Sánchez MS, Becerril RAE, Tijerina CL y Santizo RJA. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Rev. Fitotecnia Memicana* 24(1): 49.56.
- Silvila N y Alvarez S, 2013. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar: producción artesanal de *Trichoderma*. Universidad Nacional de Jujuy. Argentina. 44p.
- Vijayan AK, Sithara L, Sreelakshmi KP, Thomas JJ, Thomas MRS. and Saju K.A. 2012. Molecular diversity of *Fusarium oxysporum* causing rot diseases of vanilla in south India, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45 (11): 1319-1326, DOI: 10.1080/03235408.2012.673265.
- Xiong W, Zhao Q, Xue C, Xun W, Zhao J, Wu H, Li R and Shen Q. 2016 Comparison of fungal community in black pepper-panilla and anilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease. *Frontiers in Microbiology* 27:117-
- Xiong W, Li R., Ren Y, Liu C, Zhao Q, Wu H, Jousset A, Shen Q. 2017. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla *Fusarium* wilt disease. *Soil Biology & Biochemistry* 107 (2017) 198e207.

CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DEL AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks.), EN PAPANTLA VERACRUZ

**Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018**

3.1. RESUMEN

Son varias las especies de *Fusarium* que están asociadas al cultivo de vainilla y trabajos realizados por Adame *et al.* en la Región del Totonacapan Veracruz indican que sólo *F. oxysporum* f sp. *vanillae* es el agente causal de la marchitez en México, sin embargo, con el objetivo de determinar el agente causal de la marchitez considerando la variabilidad que presentan los hongos fitopatógenos y la dinámica temporal de la enfermedad, en este trabajo se llevaron a cabo 16 muestreos a lo largo de dos ciclos de cultivo obteniéndose 40 aislamientos de *Fusarium*, morfológicamente diferentes. Para ello colectaron raíces con síntomas de pudrición y se sembraron pequeños fragmentos en medio de cultivo Kerr; también se sembró suelo de rizósfera en PDA por el método de dilución en placa usando dilución 10^{-3} . De los 40 aislamientos de *Fusarium* obtenidos se seleccionaron los cuatro más frecuentes, dos aisladas de raíces y dos de suelo de rizósfera, obteniéndose aislamientos monospóricos, los cuales se incubaron a 27 °C durante siete días. Con base en sus características morfológicas los aislamientos seleccionados fueron identificados como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, presentes tanto en raíz como en suelo de rizósfera. Se realizaron pruebas de patogenicidad con éstas dos especies de *Fusarium* estableciendo un diseño experimental completamente al azar; se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} de cada aislamiento y un testigo absoluto al que se agregó sólo agua destilada estéril. Por tratamiento se inocularon por el método de inmersión, cuatro plantas de vainilla de seis meses de edad y se mantuvieron bajo condiciones controladas en cámara bioclimática a 25 °C y fotoperiodo 12/12 horas luz-oscuridad. Los síntomas se evaluaron cada siete días durante 45 días. La pudrición y el estrangulamiento del tallo iniciaron a los 14 días; la pudrición del sistema radical, amarillamiento de tallo y hojas se observó a los 28 y 35 días; y se presentó caída de hojas después de la inoculación. La sintomatología de la marchitez sólo fue inducida por *Fusarium oxysporum*; las plantas inoculadas con *F. solani* y el testigo fueron asintomáticas. Se concluyó que el agente causal de la marchitez de la vainilla fue *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: *Fusarium*, marchitez de la vainilla, pruebas de patogenicidad, patógenos de las raíces

MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF THE WILT VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks.), IN THE TOTONACAPAN REGION

Héctor González Reyes, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

3.2. ABSTRACT

There are several *Fusarium* species that are associated with the cultivation of vanilla and work done by Adame *et al.* in the Totonacapan Veracruz Region indicate that only *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* is the causal agent of wilt in Mexico, however, with the objective of determining the causal agent of wilt considering the variability of phytopathogenic fungi and the temporal dynamics of the disease, in this work 16 samplings were carried out over two crop cycles obtaining 40 *Fusarium* isolates, morphologically different. Were collected roots with symptoms of rot and planted small fragments in Kerr culture medium; rhizosphere soil was also planted in PDA by the plate dilution method using 10^{-3} dilution. Of the 40 *Fusarium* isolates obtained, the four most frequent isolates were selected, two isolated from roots and two from rhizosphere soil, obtaining monosporic isolates, which were incubated at 27 °C for seven days. Based on their morphological characteristics, the selected isolates were identified as *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, present in both root and rhizosphere soil. Pathogenicity tests were performed with the two *Fusarium* species establishing a completely randomized experimental design; a spore suspension was prepared at a concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹ of each isolate and an absolute control to which only sterile distilled water was added. By treatment, four vanilla plants of six months of age were inoculated by the immersion method and kept under controlled conditions in bioclimatic chamber at 25 °C and photoperiod 12/12 light-dark hours. The symptoms were evaluated every seven days for 35 days. Rotting and choking of the stem started at 14 days; rotting of the root system, stalk and leaf yellowing was observed at 28 and 35 days; and leaf fall occurred after inoculation. Symptomatology of wilt was only induced by *F. oxysporum*; the plants inoculated with *F. solani* and the control were asymptomatic. It was concluded that the causal agent of vanilla wilt was *Fusarium oxysporum*.

Key words: *Fusarium*, vanilla wilt, pathogenicity tests, root pathogens

3.3. INTRODUCCIÓN

La pudrición de tallo y raíz de la vainilla, síntomas conocidos comúnmente como ‘*marchitez de la vainilla*’, es en la actualidad una de las enfermedades más limitante en la producción (Hernández, 2011; Santa *et al.*, 2012; Pinaría *et al.*, 2010). Recientemente se ha reportado que esta enfermedad es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-vanillae* en la Isla de La Reunión (Koyyappurath *et al.*, 2016) . En la Región del Totonacapan se han encontrado cepas de *Fusarium oxysporum* altamente patogénicas, causando pudrición de raíces y tallos y se han identificado como *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*; otras especies frecuentes son *F. solani*, *F. proliferatum* y *Fusarium* sp. en raíces de vainilla (Adame *et al.*, 2015). En las regiones productoras de vainilla en México, ésta enfermedad puede dañar el 67% de la población en plantaciones menores a cuatro años de edad y cuando ataca plantaciones mayores a los cuatro años puede afectar hasta un 15% (Hernández, 2011).

V. planifolia es la especie más susceptible a la enfermedad y cuando las plantas son atacadas durante sus primeras etapas de crecimiento los daños son muy severos. Sin embargo, en etapa adulta las plantas pueden permanecer vivas varios años después de una infección debido a que tienen la capacidad de generar nuevas raíces que les permiten sobrevivir; pero esto se convierte en un problema puesto que es una fuente de inóculo permanente para futuras infecciones (Xia-Hong, 2007).

Fusarium oxysporum es un hongo habitante natural del suelo y desempeña un papel importante en la ecología microbiana del suelo como endófito (Demers *et al.*, 2015), antagonista (Kaur *et al.*, 2010; Alabouvette, 1999), saprófito (Imazaki y Kadota, 2015) y patógeno (Michelse y Rep, 2009). En trabajo realizado por González-Reyes (*en proceso*), en relación al comportamiento epidemiológico temporal de la *marchitez* de la vainilla en la Región del Totonacapan, se obtuvieron diferentes aislamientos de *Fusarium* spp. provenientes de raíces con pudrición y del suelo de la rizósfera de tales raíces. Con el propósito de corroborar los Postulados de Koch, el objetivo del presente trabajo fue realizar pruebas de patogenicidad con las cepas más frecuentes de *Fusarium* aisladas de raíces y suelo de rizósfera, y mostrar si tales aislamientos son los causantes de la *marchitez* de la vainilla.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Obtención de cepas

A partir de plantas de vainilla que mostraban síntomas de marchitez, se muestrearon raíces con daño de pudrición y suelo de rizósfera adherido a dichas raíces. Se tomó una muestra de 1.0 g de raíces con síntomas de marchitez y sin quitar el suelo adherido a estas raíces, se colocaron en un matraz que contenía 99 mL de agua-agar al 0.2% y se agitaron con un agitador (Vortex Genie®) durante cinco minutos, con la finalidad de obtener una solución madre de suelo de rizósfera. A partir de ésta solución, se tomó 1 mL y se colocó en tubos de ensayo que contenían 9 mL de agua-agar al 0.2%; se continuó con las diluciones hasta obtener la concentración 10^{-3} . De ésta concentración se tomó un 1mL, se aplicó en una caja de Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) acidificado con ácido láctico (1.0 mL/L), y se esparció en toda la caja con una varilla de vidrio en forma de L. Las cajas se incubaron en estufa bajo condiciones de oscuridad y temperatura controlada a 27 °C de cinco a ocho días. De cada planta muestreada y de sus mismas raíces de donde se obtuvo el suelo de rizósfera, éstas se lavaron con agua corriente, eliminando el exceso de suelo, se cortaron 10 trocitos de 0.5 cm de longitud aproximadamente, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, después se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril durante un minuto cada vez, se pusieron sobre sanitas estériles y se colocaron a lado de la flama de un mechero para su secado. Una vez que los trocitos de raíces se secaron, fueron sembrados en cajas Petri con medio de cultivo PDA, las cajas se incubaron bajo condiciones controladas de temperatura a 27°C y oscuridad. Cinco días después se evaluó el crecimiento de colonias de *Fusarium* tanto en raíces como en suelo de rizósfera. Se seleccionaron los aislamientos de *Fusarium* spp. que se hallaron más frecuentes y abundantes, obtenidos a partir de raíces y de suelo de rizósfera. En total se obtuvieron 40 aislamientos morfológicamente diferentes de *Fusarium*. Para las pruebas de patogenicidad se seleccionaron los aislamientos de *Fusarium* más abundantes tanto de raíz como de suelo de rizósfera y correspondieron a cuatro cepas de *Fusarium* agrupadas con base en características físicas y morfológicas de la colonia, identificándolas como VFO_{1R}, VFS_{2R}, VFO_{1S} y VFS_{2S} (Cuadro 6.1); donde V= vainilla, F= *Fusarium*, R= raíz, S=suelo de rizósfera (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Características de cuatro de los aislamientos de *Fusarium* más frecuentes obtenidos de raíces y suelo de rizósfera de vainilla.

Aislamiento	Características de la colonia	Lugar de aislamiento
VFO _{1R}	Micelio aéreo abundante, algodonoso y color blanco a ligeramente color lila. En medio PDA, el reverso de la colonia blanco y posteriormente se pigmentó ligeramente de tonalidad lila. Abundantes macroconidios, microconidios y clamidiosporas.	raíz
VFO _{1S}		suelo de rizósfera
VFS _{2R}	Micelio aéreo grumoso, color amarillento. El reverso se tornó de color cremoso.	Raíz
VFS _{2S}	Macroconidios, microconidios y clamidiosporas abundantes.	Suelo de rizósfera

V= vainilla, F=*Fusarium*, 1=cepa1, 2= cepa 2, R= raíz, S=suelo de rizósfera.

3.4.2. Identificación morfológica

Los aislamientos seleccionados se purificaron en medio de cultivo PDA mediante la técnica de aislamientos monospóricos propuesta por Castellanos *et al.* (2004) y también se crecieron en el medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA: 1.0 g KH₂ PO₄; 1,0 g KNO₃; 0.5 g MgSO₄•7H₂O; 0.5 g KCL; 0.2 g Glucosa; 0.2 g Sucrosa; 20.0 g Agar; 1000 mL agua destilada) para obtener la formación de estructuras específicas para su identificación (Leslie and Sumerel, 2006). Las colonias puras se incubaron por siete días a 27 °C en oscuridad y tres días en luz natural bajo condiciones de laboratorio (± 22 °C); posteriormente se realizaron preparaciones permanentes de los diferentes aislamientos. La descripción morfológica se realizó con base en estructuras como macroconidios, microconidios, clamidiosporas, fiálides, color y forma de la colonia, utilizando las claves taxonómicas de Holliday (1995) y Leslie and Sumerel (2006). Se midieron 30 macroconidios y 30 microconidios de cada aislamiento con el Software Motic 2.0 controlado por una computadora (Dell®) de escritorio y cámara (Moticam® 2.0) adaptada a un microscopio (Quasar Qm15TM). Los datos de las mediciones de las diferentes estructuras morfológicas se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS ver. 9.0, y se obtuvo su media, varianza y desviación estándar.

3.4.3. Pruebas de patogenicidad

3.4.3.1. Obtención y crecimiento de material vegetal

La selección de esquejes y metodología para llevar a cabo las pruebas de patogenicidad fueron las propuestas por González-Reyes, 2014, para ello se obtuvieron esquejes sanos de vainilla con tres entrenudos y se dejaron una semana en reposo bajo condiciones de laboratorio (± 22 °C); pasado este tiempo se seleccionaron los más vigorosos. Posteriormente, con una navaja previamente esterilizada se hizo un corte transversal en la parte basal de cada esqueje y se sumergieron completamente en una solución del fungicida Captan (Captagro[®]) a una dosis de 1g/litro de agua durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, la parte basal del esqueje se colocó sobre la formulación en polvo del enraizador (Radix 1500[®]) y se sembraron en vasos de unicel de 1 Kg de capacidad, los cuales contenían la mezcla de sustrato Peatmoss[®]+agrolita[®] a una concentración 3:1 v/v, previamente esterilizado. Las plantas ya sembradas, se colocaron en una cámara bioclimática (Warner Sherer, Kysor Industrial) con condiciones controladas de temperatura a 27 °C y fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Se dejaron crecer durante un periodo de seis meses, con riegos cada tercer día y fertilización mensual con solución hidropónica nutritiva de uso múltiple (Triple 17 + microelementos), antes de ser inoculadas con los patógenos. Este proceso se realizó en el área de cámaras de crecimiento (Warner Sherer, Kysor Industrial) del Posgrado de Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

3.4.3.2. Crecimiento de aislamientos de hongos asociados a vainilla

Los aislamientos seleccionados y purificados previamente VFO_{1R}, VFS_{2R}, VFO_{1S} y VFS_{2S}, se resembraron en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron durante 7 días a 27 °C en condiciones de oscuridad y durante tres días se dejaron expuestas a luz natural en condiciones de laboratorio (± 22 °C), tiempo que permitió que las colonias crecieran y cubrieran completamente la caja.

3.4.3.3. Preparación de inóculo

Los aislamientos de *Fusarium* se incrementaron en cajas Petri con medio PDA, bajo condiciones de 27 °C de temperatura y oscuridad durante 7 días, y 3 días más bajo luz natural en condiciones de laboratorio (± 22 °C); posterior a ello, se agregó agua destilada estéril sobre la colonia hasta cubrirla, y con ayuda de una varilla de vidrio se realizó un barrido para coleccionar los conidios del hongo. Con ayuda de una cámara de Neubauer se hizo el conteo de esporas, y se preparó una suspensión de inóculo a una concentración de 1×10^6 propágulos mL⁻¹ (Castellanos *et al.*, 2006).

3.4.3.4. Inoculación de esquejes y evaluación de síntomas

El experimento de inoculación de las plantas con la suspensión de esporas de los aislamientos de *Fusarium*, se estableció siguiendo un diseño experimental completamente al azar; los tratamientos fueron VFO_{1R}, VFS_{2R}, VFO_{1S} y VFS_{2S}, y cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones (plantas) (Cuadro 3.2). Una vez preparada la suspensión de inóculo de las cuatro cepas de *Fusarium*, las plantas (esquejes) con seis meses de crecimiento fueron extraídas de su maceta y las raíces se lavaron en un contenedor con agua destilada estéril para eliminar el exceso de sustrato. El sistema radical se sumergió en la suspensión de inóculo durante cinco minutos. Las plantas ya inoculadas se mantuvieron en una cámara bioclimática (Warner Sherer, Kysor Industrial) en condiciones controladas a 25 °C de temperatura y fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con riegos e 200ml de agua corriente cada tercer día. El desarrollo de síntomas se evaluó cada siete días después de la inoculación, durante un periodo de 35 días.

Cuadro 3.2. Tratamientos aplicados en pruebas de patogenicidad para determinar al agente causal de la enfermedad marchitez de la vainilla, en la Región del Totonacapan, Veracruz.

Tratamiento	
T1. VFO _{1R}	<i>F. oxysporum</i> de raíces
T2. VFS _{2R}	<i>F. solani</i> de raíces
T3. VFO _{1S}	<i>F. oxysporum</i> de suelo de rizósera
T4. VFS _{2S}	<i>F. solani</i> de suelo de riósfera
T5. Testigo	Agua destilada estéril

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Identificación morfológica

Las cepas de *Fusarium* sp. más frecuentes, obtenidas a partir de raíces y suelo de rizósfera en cada fecha de muestreo fueron agrupadas como *Fusarium* de raíz y *Fusarium* de suelo de rizósfera. De acuerdo a las características morfológicas observadas de los aislamientos seleccionados y a las mediciones realizadas de sus diferentes estructuras, los hongos se identificaron como *Fusarium oxysporum* (VFO_{1R} y VFO_{1S}) y *Fusarium solani* (VFS_{2R} y VFS_{2S}), apoyados en lo descrito por Holliday (1995) y por Leslie y Summerell (2006), como se describe a continuación.

3.5.1.1. *Fusarium oxysporum*

Las colonias de los aislamientos VFO_{1R} y VFO_{1S} cultivadas en PDA presentaron abundante crecimiento micelial y con una coloración ligeramente púrpura, mientras que en el revés de la colonia se observó una coloración ligeramente lila (Figura 3.1a y 3.1b). Los macroconidios mostraron forma lunada del tipo fragmospora, de tres y cinco septos, en su mayoría de tres septos; ligeramente curvados, su célula basal presenta una estructura en forma de pie (pedicelo) y la célula apical es puntiaguda. La longitud promedio de los macroconidios fue de 36.4 x 4.8 µm (Figura 3.1c) y se ubicó en el rango (27-46 x 3-5µm) descrito por Holliday, (1995) y creciendo en esporodoquios (Figura 3.1d). Microconidios abundantes con medidas promedio de 5.4 x 3.1 µm, de formas elipsoidal, cilíndrica o arriñonada; con cero o un septo (Figura 3.1c), y creciendo en monofialides y polifialides (Figura 3.1e). Clamidosporas abundantes, intercalares, terminales y solitarias (Figura 3.1f).

3.5.1.2. *Fusarium solani*

Las colonias del aislamiento VFS_{2R} y VFS_{2S}, creciendo en PDA presentaron un micelio con crecimiento aéreo escaso y de color ligeramente amarillo, el revés de la colonia presentó un color cremoso (Figura 3.2a y 3.2b). Macroconidios creciendo en conidióforos cortos y ramificados; de forma recta, falcada, robusta y generalmente con 3-7 septos (en su mayoría de tres) y su célula basal es ligeramente redondeada o en forma de pie, mientras que la célula apical es suavemente redondeada; sus medidas de longitud promedio fueron 33.4 x 4.6 µm (Figura 3.2c). Microconidios abundantes, creciendo en monofialides largas; de forma oval, elipsoide y reniforme, con 0 ó 1 septo; sus medidas promedio fueron 12.7 x 4.6 µm (Figura 3.2d). Clamidosporas de pared ligeramente rugosa, terminales, intercalares, en parejas, pero generalmente solitarias (Figura 3.2).

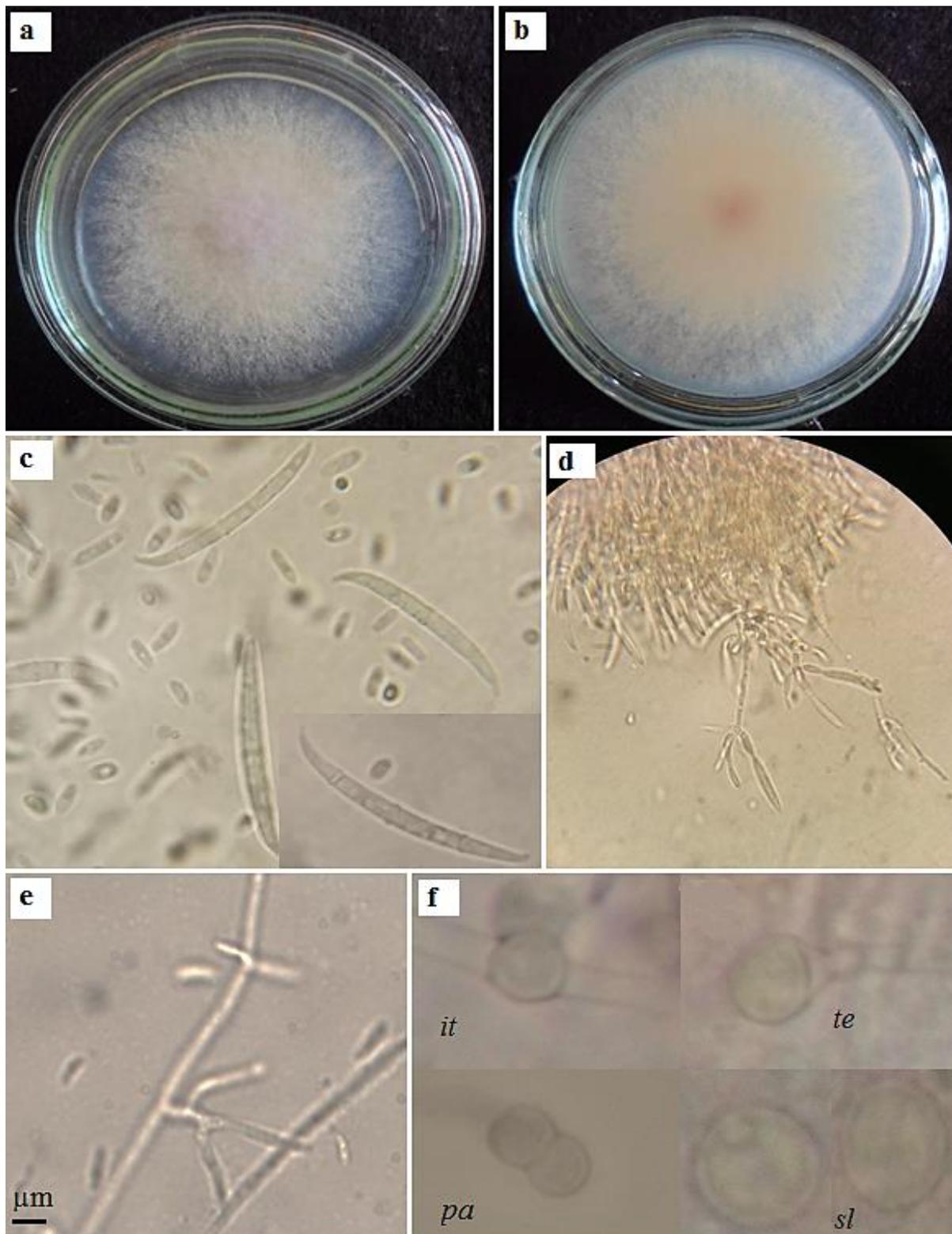


Figura 3.1. Morfología de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo PDA: a) frente de la colonia, b) reverso de la colonia, c) macroconidios y microconidios, d) esporoquicio, e) polifialides y f) clamidosporas (it=intercalar, te=terminal, pa=pareja y sl=libre o solitaria).

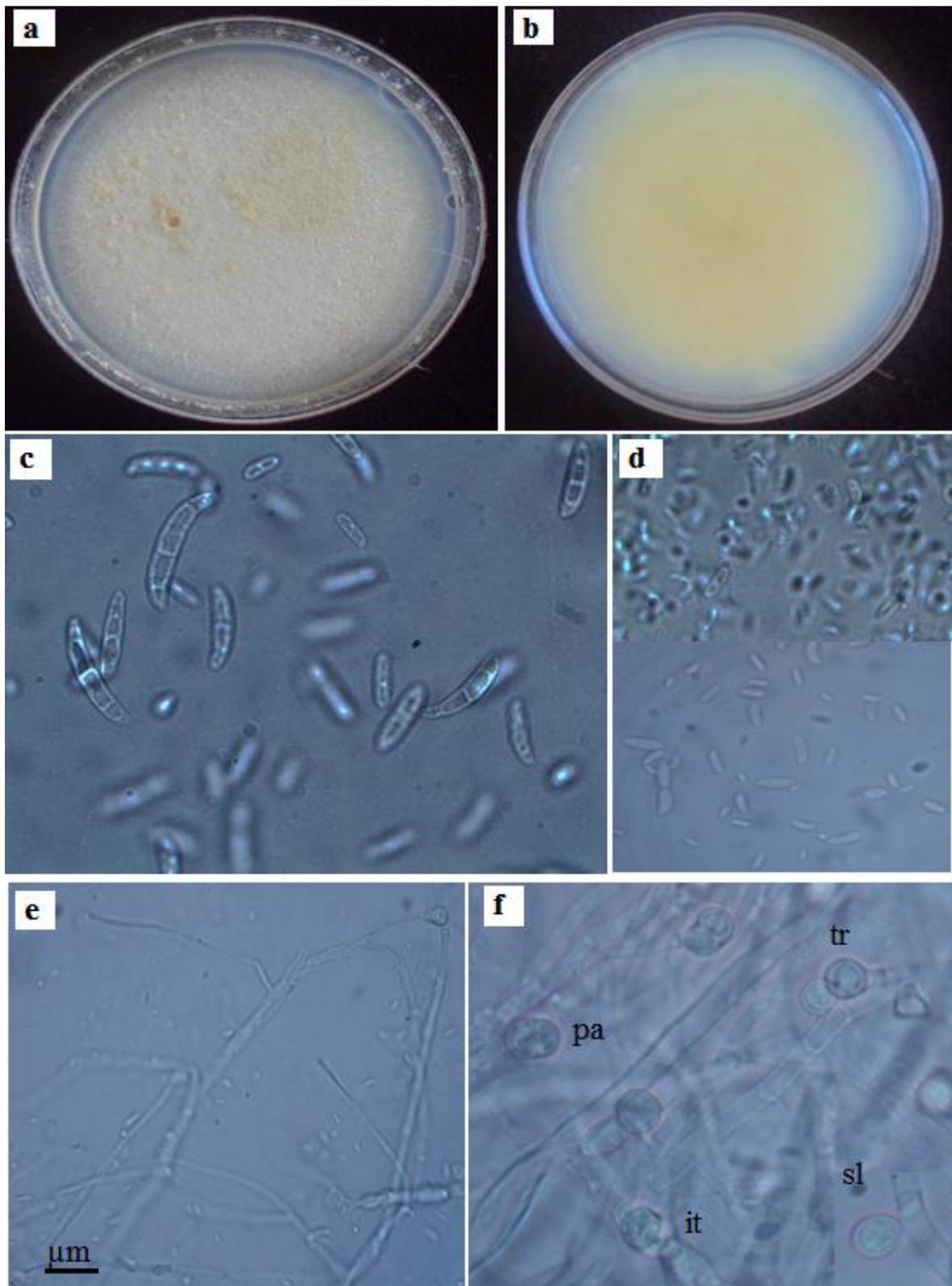


Figura 3.2. Morfología de *Fusarium solani* en medio de cultivo PDA: vista frontal de la colonia; b) reverso de la colonia c) macroconidios y d) microconidios, e) fialides y f) clamidiosporas (tr=terminales, pa= en pares, it=intercalares y sl=solitarias).

3.5.2. Pruebas de patogenicidad

De los cuatro aislamientos, los inoculados en T1 (VF_{1R}) y T3 (VF_{1S}) e identificados previamente como *Fusarium oxysporum*, indujeron el síntoma de marchitez (pudrición de tallo y raíces). Los síntomas iniciaron a los 14 días como una pequeña mancha acuosa en el cuello de las plantas de estos tratamientos. A los 21 días después de la inoculación se observó que el 50% de las plantas del T1 y el 25% del T3 presentaron una pudrición acuosa y color café en el cuello de la planta, y en el caso del T1 se observó un ligero amarillamiento; además, se observó que el avance de la pudrición ocurría de manera rápida hacia la parte basal de la planta y hacia el primer nudo. A los 28 días el 50% de las plantas en ambos tratamientos presentó estrangulamiento del tallo y pudrición completa del sistema radical; en el T1 el amarillamiento del tallo fue más notorio y en el T3 avanzó de manera lenta hacia el primer nudo (Figura 3.3a). A los 35 ddi el 100% de plantas manifestaron pudrición de raíces y tallos, en el caso del T1 el estrangulamiento del tallo se tornó de una consistencia papelosa y se presentó un amarillamiento en los entrenudos contiguos y en las primeras hojas. En las plantas inoculadas con el T3 el amarillamiento se detuvo al llegar al primer nudo y no avanzó a los entrenudos contiguos, pero las plantas perdieron el brillo natural de las hojas y se tornaron de un aspecto clorótico (Figura 3.3b-c), después de 4 días después de la inoculación se presentó la caída de hojas; este síntoma fue similar al que se observó en campo.

Las plantas inoculadas con los tratamiento T2 y T4 correspondientes a *Fusarium solani* no manifestaron síntomas de la marchitez. En lo que respecta al testigo absoluto (T5), las plantas de este tratamiento fueron asintomáticas (Figura 3.4a y c). Con base en los resultados indicados, se determinó que el agente causal de la marchitez de la vainilla es *Fusarium oxysporum*, ya que los síntomas observados en raíces y parte aérea fueron similares a los que se observaron y evaluaron en campo (Figura 3.5).



Figura 3.3. Resultados de las pruebas de patogenicidad efectuados en plantas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.): a) plantas inoculadas con *F. oxysporum*, *F. solani* y el testigo; b) comparación de plantas con síntomas inducidos por *F. oxysporum* y plantas testigo, c) sistema radical del testigo (ts) con decoloración de la base del tallo por permanecer bajo el sustrato y no por enfermedad, y planta inoculadas con *F. oxysporum* (Fo).



Figura 3.4. Comparación del sistema radical de las plantas de vainilla 35 después de su inoculación: a) sistema radical del testigo, b) sistema radical de planta inoculada con *F. oxysporum*, c) raíces sanas y turgentes y d) pudrición y descortezamiento de las raíces causados por el patógeno.



Figura 3.5. Sintomatología de la marchitez en plantaciones de la región del Totonacapan: a) muerte completa de plantas, b-c) pudrición de tallos con amarillamiento, d) raíces adventicias sanas adheridas al tutor, e) pudrición típica de las raíces al iniciar la infección, f) muerte de raíces adventicias, tallo y hojas con infección avanzada, g) raíces jóvenes infectadas al entrar en contacto con residuos de raíces muertas adheridas al tutor, h) raíces infectadas al entrar en contacto con el suelo y i) muerte total del sistema radical.

3.5.3. Reaislamiento del patógeno

A partir de tejido de las raíces de las plantas inoculadas e infectadas con el hongo *Fusarium oxysporum* y que presentaron daño por marchitez, se realizaron cortes del tejido dañado y siguiendo el protocolo ya expresado en la metodología para el aislamiento de patógenos de las raíces, se sembraron trozos de las raíces dañadas en medio PDA con el propósito de reaislar al patógeno y comprobar que efectivamente era *F. oxysporum*, y así poder cumplir con los Postulados de Koch. Las siembras en cajas de Petri se mantuvieron en incubación durante siete días bajo condiciones controladas de temperatura a 27 °C en oscuridad, y tres días en luz natural en condiciones de laboratorio ($T \pm 22$ °C). Después de los 10 días de incubación se obtuvieron crecimientos típicos del hongo *F. oxysporum* con micelio abundante y de color púrpura, abundante producción de macroconidios, microconidios y clamidosporas con morfología y dimensiones similares a las descritas anteriormente.

3.6. DISCUSIÓN

En ésta investigación se hizo énfasis en el hongo del género *Fusarium* y específicamente en *F. oxysporum*, porque en nuestro trabajo e el que se encontró de mnera más frecuente y abundante lo largo del ciclo de cultivo de la vainilla. Este hongo también ha sido reportado por varios autores, asociado al síntoma de marchitez de la vainilla (Adame *et al.*, 2015; Koyyappurath *et al.*, 2016; Santa *et al.*, 2012. Del total de aislamientos de *Fusarium* obtenidos en esta investigación, seis fueron los más frecuentes y dos de estos fueron los más abundantes e identificados como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Las pruebas de patogenicidad demostraron que de las dos especies de *Fusarium* inoculadas, *F. oxysporum* indujo una pudrición de cuello a los 21 días y el estrangulamiento del tallo y pudrición completa de raíces a los 28 y 35 día, y caída de hojas a los 45 días después de la inoculación. Koyyappurath *et al.* (2016), identificaron molecularmente en la isla de La Reunión, al patógeno causante de la marchitez de la vainilla como *F. oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*, el cual es responsable de pérdidas documentadas en la producción de hasta un 80% (Pinaría *et al.*, 2010). En las diferentes regiones productoras de vainilla a nivel mundial, además de *F. oxysporum* y *F. solani* se han reportado otras especies de *Fusarium* asociadas a la planta de vainilla tales como *F. concentricum*, *F. mangiferae*, *F. proliferatum*, (Koyyappurath *et al.*, 2016), *F. fujikuroi*, *F. sp.*, *F. verticilioides* (Adame, 2015) y *F. semitectum* (Pinaría *et al.*, 2010), *F. keratoplasticum* y *Fusarium* sp. (Aguirre *et al. en proceso*).

En ésta investigación sólo se realizó la caracterización morfológica de los aislamientos utilizados en las pruebas de patogenicidad, pero no la caracterización molecular. Sin embargo, en trabajo complementario con muestras de raíces de vainilla obtenidas en el mismo huerto de producción convencional en 2016, se llevó a cabo el aislamiento, purificación y caracterización morfológica y molecular de las siguientes especies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. keratoplasticum*, y *Fusarium sp.* (Aguirre-Andrade *en proceso*). Por lo anterior, queda abierto el campo para futuros estudios moleculares, filogenéticos y ecológicos tanto de los aislamientos patógenos como los no patógenos, su relación con la planta y su papel dentro del microbioma del suelo. *F. oxysporum* es el responsable de causar daño en todas las regiones productoras importantes de vainilla, y es favorecido por situaciones como una nutrición pobre y falta de prácticas adecuadas de manejo, sobre todo en los sistemas intensivos con casa sombra (Santa *et al.*, 2012). Esta enfermedad en vainilla ha sido un reto que ha motivado desarrollar diferentes estrategias de manejo; una de las principales es el mejoramiento genético debido a que la variabilidad

genética de la vainilla es escasa (Menchaca *et al.*, 2011). También se han aplicado alternativas como el control biológico con microorganismos benéficos (González *et al.*, 2014), prácticas culturales como podas fitosanitarias, aplicación de compostas y manejo de la densidad de plantas recomendadas para reducir el impacto negativo por la enfermedad (Vargas y Gámez, 2014).

Los resultados de este trabajo de investigación en relación a las pruebas de patogenicidad, y en el caso particular de la región del Totonacapan, indican que el agente causal de la enfermedad marchitez de la vainilla fue *Fusarium oxysporum*, y los aislamientos obtenidos de este hongo tienen la capacidad de producir abundantes macroconidios, microconidios y clamidosporas; estas últimas son estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo y acumular inóculo para futuras infecciones (Pinaría *et al.*, 2010; Santa *et al.*, 2012). Por lo anterior, resulta de gran importancia llevar a cabo estudios de biología básica así como epidemiológicos y ecológicos que permitan entender el comportamiento del patógeno y de la enfermedad que causa en relación al sistema de producción y a las variables climatológicas, y de esa manera tener las bases indispensables para aplicar estrategias adecuadas de manejo.

3.7. CONCLUSIONES

Los hongos más frecuentes y abundantes aislados de raíces con síntomas de pudrición fueron *F. oxysporum* y *F. solani*. En pruebas de patogenicidad, las plantas de vainilla que desarrollaron síntomas de pudrición de raíces, tallos, amarillamiento, marchitez y caída de hojas, fueron las inoculadas con *Fusarium oxysporum*, por lo que se concluye que éste patógeno es el agente causal de la marchitez de la vainilla en la Región del Totonacapan, Veracruz.

Fusarium solani no causó ningún síntoma de marchitez u otro daño en las plantas de vainilla en este trabajo.

3.8.LITERATURA CITADA

- Adame GJ, Rodríguez GR, Iglesias AL, Ramos PM y Luna RM. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93 (3): 669-678.
- Alabouvette, C. 1999. Australasian Plant Pathology 28: 57-64. <https://doi.org/10.1071/AP99008>
- Castellanos G, Jara C. y Mosquera G. 2004. Guía práctica. *Fusarium oxysporum*. Enfermedad: amarillamiento por Fusarium. CIAT. 39p.
- Demers JE, Gugina BK. and Gasco MJ. 2015. Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 81(1): 81-90.
- González-Reyes H. 2014. Diagnóstico de la marchitez de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) en Marqués de Comillas, Chiapas. Tesis. Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 31p.
- Hernández HM. 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) establecimiento y mantenimiento. INIFAP. 25p.
- Hollyday P. 1995. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University Press. 624p.
- Imazki I and Kadota, I. 2015. Molecular phylogeny and diversity of *Fusarium* endhopytes isolated from tomato stems. *FEMS Microbiology Ecology* 91(9): 16.
- Kaur R, Kaur J and Singh R. 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology Journal* 9(3): 79-91. DOI.10.3923/ppj.2010.79.91.
- Koyyappurath S, Atuahiva T, Le GR, Batina H, Le SS, Gautheron N, Edel HV, Peribe J, Jahiel M, Steinberg C, Liew ECY, Alabouvette C, Besse P, Dron M, Sache I, Laval V and Grisoni M. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of *Vanilla*. *Plant Pathology* (2016) 65, 612–625.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 386p.
- Michelse CB. Rep GA. 2009. Pathogen profil update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*. 10(3): 311-324. DOI:10.1111/J.1364-3703.2009.00538x.
- Pinaria AG. Liew ECY and Burgess LW. 2010. *Fusarium* species associated with *Vanilla* stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology* 39: 176–183.

- Menchaca GRA, Ramos PJM, Moreno MD, Luna RM, Mata RM, Vázquez GLM y Lozano R. MA. 2011. Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. Revista Colombiana de Biotecnología. 13(1): 80-84.
- Santa C. C., Montoya, M. M. y Díez, M. C. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. Revista Mexicana de Micología (32): 23-34.
- Vargas HJ y Gámez VHG. 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra huasteca potosina. INIFAP-SAGARPA. 19p.
- Xia-Hong H. 2007. Bio-control of root rot disease in vanilla. PhD. Thesis. Yunnan Agricultural University. 224p.