

Isolation of *Fusarium* from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina Mexico

Aislamiento de *Fusarium* de plantas de vainilla cultivadas en la Huasteca Potosina México

José Leonardo Hernández-Martínez, Candy Carranza-Álvarez, Juan José Maldonado-Miranda, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Colonia Rafael Curiel, C.P. 79060, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México; **Domingo Martínez-Soto***, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of California, Riverside. 900 University Avenue, Riverside CA, 92521, USA. *Autor para correspondencia: domingom@ucr.edu

Recibido: 22 de Abril, 2020.

Aceptado: 20 de Junio, 2020.

Hernández-Martínez JL, Carranza-Álvarez C, Maldonado-Miranda JJ and Martínez-Soto D. 2020. Isolation of *Fusarium* from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 38(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2004-4

Primera publicación DOI: 07 de Julio, 2020.

First DOI publication: July 07, 2020.

Resumen. La vainilla es una orquídea de importancia económica en México y el mundo. Entre las principales zonas de México donde se produce esta orquídea se encuentra la región Huasteca en el estado de San Luis Potosí. Recientemente se observó en plantas de vainilla cultivadas en esta región, la presencia de síntomas como clorosis, necrosis y marchitamiento general. Considerando que dichos síntomas son característicos de infecciones causadas por hongos patógenos, en este trabajo se planteó el objetivo de identificar los hongos asociados a

Abstract. Vanilla is an orchid of economic importance in Mexico and the world. Among the zones of Mexico where this orchid is produced, we can find the Huasteca region in the state of San Luis Potosi. Recently it was observed in plants cultivated in this region, the presence of symptoms such as chlorosis, necrosis, and wilting. Considering these symptoms as characteristic of fungal infections, the goal of this work was to identify the fungi associated with these plants. To achieve it, leaves, stems, and fruits of plants with symptoms were collected, washed, cut, and inoculated on PDA medium. Under these conditions fungal colonies grew, which were used to obtain monospore cultures, identified later by microcultures and amplification and sequencing of Internal Transcribed Spacers (ITS) region. The sequences were analyzed by BLAST in NCBI. The isolated fungi showed morphological characteristics of the *Fusarium*: violet mycelium, yellow-brown coloration in the culture medium, development of chlamydospores, macroconidia and microconidia. The ITS sequences showed

dichas plantas. Para ello se colectaron hojas, tallos y frutos de plantas con síntomas; los cuales se lavaron, cortaron, y colocaron sobre medio PDA. Bajo estas condiciones se obtuvieron colonias fúngicas que fueron usadas para obtener aislados monospóricos, los cuales fueron identificados mediante microcultivos y mediante la amplificación y secuenciación de las regiones génicas conocidas como Espaciadores Transcritos Internos (ITS). Dichas secuencias fueron analizadas mediante BLAST en NCBI. Los hongos aislados mostraron características morfológicas del género *Fusarium*: micelio color violeta, coloración amarillo-marrón en el medio de cultivo, desarrollo de clamidosporas, macroconidios y microconidios. Las secuencias ITS mostraron una cobertura del 100% y una similitud del 99.5% con el aislado de *Fusarium oxysporum* O309 (MT032690.1), confirmando la presencia de *Fusarium* en las plantas analizadas. Interesantemente, este es el primer reporte del aislamiento e identificación de *Fusarium* en plantas de vainilla cultivadas en el estado de S.L.P.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, *Fusarium*, ITS.

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una planta hemiepífita de la familia *Orchidaceae* originaria de Mesoamérica, cuyo centro de domesticación y diversificación se encuentra en el centro-norte del estado de Veracruz, México. Esta orquídea se desarrolla en climas cálidos a temperaturas de entre 20 y 30 °C, bajo condiciones específicas de luz y sombra, y requiere de un “tutor” es decir una planta o construcción artificial que le da sostén. La vainilla requiere de dos años de crecimiento vegetativo, y es hasta el tercer año de vida cuando desarrollan los primeros frutos. En México existen 874.50 ha sembradas con plantas de vainilla, las cuales producen 494.69 toneladas anuales de frutos procesados o

100% of query cover and 99.5% similarity with *Fusarium oxysporum* isolate O309 (MT032690.1), confirming the presence of *Fusarium* in the plants analyzed. Interestingly, this work is the first report of *Fusarium* isolation and identification in vanilla plants grown in the state of San Luis Potosí.

Key words: *Vanilla planifolia*, *Fusarium*, ITS.

Vanilla (*Vanilla planifolia*) is a hemiepiphyte plant of the *Orchidaceae* family native to Mesoamerica, whose domestication and diversification center is located in the central-northern zone of the state of Veracruz, Mexico. This orchid grows in warm climates at temperatures between 20 and 30 °C, under specific light-shade conditions, and requires a “tutor,” that is, a plant or an artificial construction to support it. Vanilla plants require two years of vegetative growth, and the first fruits are not produced until the third year. In Mexico, vanilla plants are sown to 874.50 ha, where 494.69 annual tons of processed or “benefitted” fruits are harvested. The major vanilla producing states are Veracruz, Oaxaca, Puebla, and San Luis Potosí. In San Luis Potosí, the vanilla producing region is located in the southern Huasteca Potosina, which includes the municipalities of Axtla de Terrazas, Tamazunchale, Aquismón, Matlapa, Coxcatlán, Huehuetlán and Xilitla (Figure 1).

It is known that vanilla plants can be susceptible to infection caused by the *Fusarium oxysporum* fungus, which produces leaf chlorosis and root and stem rot, and eventually the loss of the whole plant (Adame-García *et al.*, 2015). For several decades, vanilla (*V. planifolia* Jacks. ex Andrews) has been cultivated under traditional systems in the southern Huasteca in San Luis Potosí, producing quality fruits with no apparent symptoms of infection. However, in the summer 2018, a group of vanilla

“Beneficiados”. Los estados con mayor producción son Veracruz, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí; en este último, la región vainillera se localiza en la Huasteca Potosina Sur que comprende los municipios de Axtla de Terrazas, Tamazunchale, Aquismón, Matlapa, Coxcatlán, Huehuetlán y Xilitla (Figura 1).

Se conoce que las plantas de vainilla pueden ser susceptibles a la infección causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, el cual produce clorosis en hojas y pudrición de la raíz y el tallo, llegando a ocasionar la pérdida total de la planta (Adame-García *et al.*, 2015). Desde hace varias décadas, se ha cultivado vainilla (*V. planifolia* Jacks. ex Andrews) bajo sistemas tradicionales en la Huasteca Sur de S.L.P., produciendo frutos de calidad y sin síntomas aparentes de infección. Sin embargo, en verano del 2018 un grupo de productores vainilleros de esta región observaron marchitez y clorosis, síntomas característicos de las infecciones causadas por hongos, en varias plantas de vainilla en edad de producción. Con el objetivo de identificar los posibles hongos asociados a dichas plantas, durante los meses de septiembre y octubre del mismo año se realizaron tres muestreos independientes de plantas cultivadas en dos parcelas de aproximadamente 1.5 ha, ubicadas en las coordenadas 21.316651, -98.831236 en la comunidad de Cuichiapa, Matlapa, S.L.P., México. En estas parcelas se cultiva vainilla a campo abierto y bajo el sistema llamado “casa malla”. Para los muestreos cada parcela fue dividida en cuatro cuadrantes, y se colectaron muestras de hojas, tallos y frutos de cinco plantas con síntomas en cada cuadrante. Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en cámaras húmedas a 4 °C para ser procesadas. Los tejidos de vainilla fueron lavados con hipoclorito de sodio al 10%, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril, y se secaron con toallas de papel estériles. Se realizaron cortes transversales y longitudinales

producers from that region detected wilt and chlorosis, which are characteristic symptoms of infection caused by fungi, on several vanilla plants in production age. In order to identify the possible fungi associated with those plants, in September and October 2018, three independent samplings were conducted using plants from two fields of approximately 1.5 ha (coordinates 21.316651, -98.831236) at the community of Cuichiapa, Matlapa, San Luis Potosí, Mexico. In the sampling sites, vanilla is grown in the open field and under a system called “mesh house.” For the samplings, each plot was divided in four quadrants, and samples of leaves, stems, and fruits of five plants with infection symptoms from each quadrant were collected. The samples were placed in humid chambers at 4 °C and immediately taken to the laboratory to be processed. The vanilla tissues were washed with 10% sodium hypochlorite, rinsed with abundant sterile distilled water, and dried with sterile paper towels. Transverse and longitudinal cuts were made to the plant tissues and then small tissue fragments approximately 1 cm² in size were placed on agar-potato-dextrose (PDA) culture medium to which carbenicillin (100 µg mL⁻¹) was added to prevent bacterial contamination. Three tissue segments were placed on each Petri dish with culture medium; all the samples were sown in triplicate and then incubated at 28 °C in darkness. The cultures were monitored every day for eight days until fungal colonies started to grow at the contact sites of the tissue sample and the culture medium. From the Petri dishes where fungi grew, mycelium samples were taken and placed on new Petri dishes with PDA medium to obtain cultures with the same colony morphology, and then from these obtain monosporic cultures which were later used to conduct morphological and molecular identification of fungi. To obtain monosporic cultures, the fungus spores were

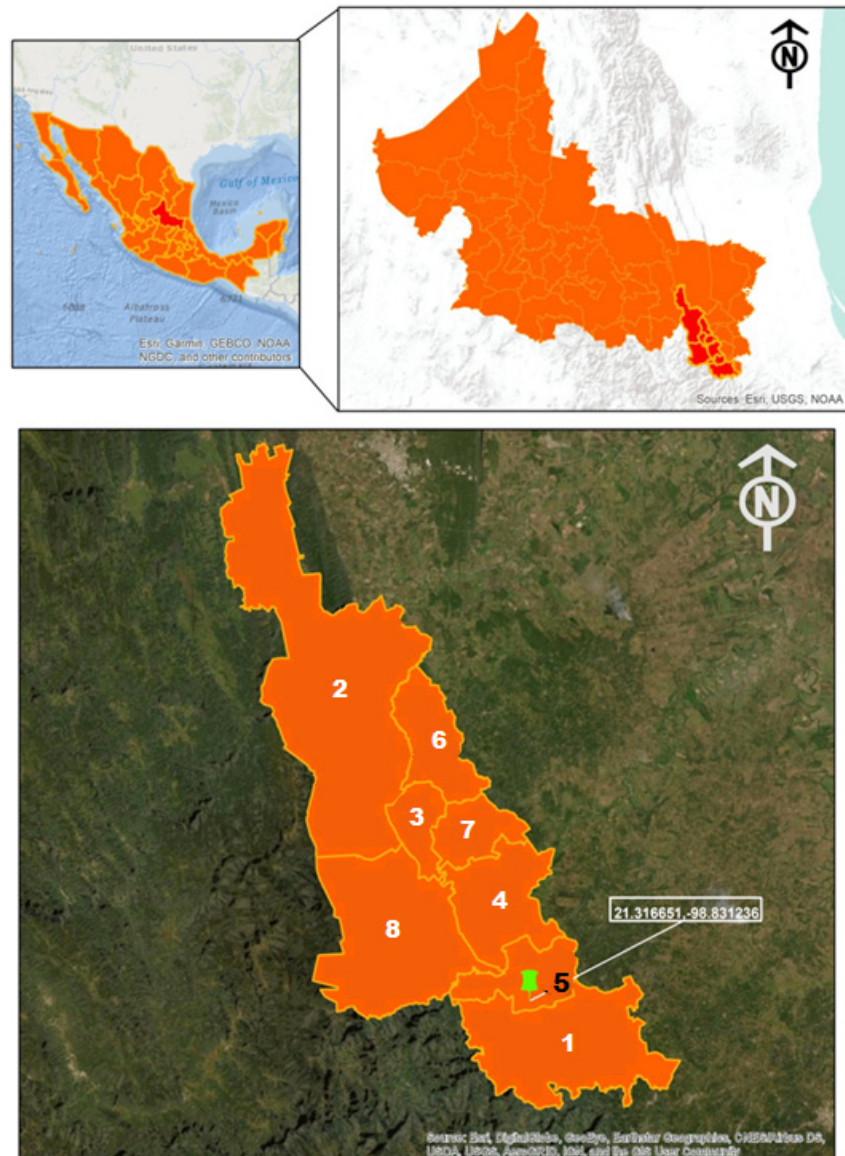


Figura 1. Localización de los municipios productores de vainilla de la Huasteca Potosina Sur, y sitio de estudio. 1) Tama-zunchale, 2) Aquismón, 3) Huehuetlán, 4) Axtla de Terrazas, 5) Matlapa, 6) Tancanhuitz de Santos, 7) Coxcatlán, 8) Xilitla. El número cinco en color negro indica el municipio donde se encuentra localizado el sitio de estudio de este trabajo.

Figure 1. Location of the vanilla producing municipalities in the southern Huasteca Potosina and study site. 1) Tama-zunchale, 2) Aquismón, 3) Huehuetlán, 4) Axtla de Terrazas, 5) Matlapa, 6) Tancanhuitz de Santos, 7) Coxcatlán, 8) Xilitla. The number five in black indicates the municipality where the study site is located.

de los tejidos vegetales, después se colocaron pequeños segmentos de aproximadamente 1 cm² de tejido sobre agar papa dextrosa (PDA) adicionado con carbenicilina (100 µg mL⁻¹) para evitar la contaminación por bacterias. Se colocaron tres segmentos de tejido por cada caja de Petri con medio de cultivo y todas las muestras fueron sembradas por triplicado, incubadas a 28 °C y en oscuridad. Los cultivos fueron observados diariamente durante ocho días, hasta observar el crecimiento de colonias fúngicas en los sitios de contacto de la muestra de tejido y el medio de cultivo. De las cajas de Petri donde se observó el desarrollo de hongos, se tomaron muestras del micelio y se colocaron en nuevas cajas de Petri con medio PDA para obtener cultivos con una misma morfología colonial y a partir de los cuales se obtuvieron cultivos monospóricos que posteriormente fueron usados para identificación morfológica y molecular de los hongos. Para la obtención de cultivos monospóricos, se colectaron las esporas del hongo con una solución estéril de Tween 80 al 0.1%, se preparó una suspensión de 100 esporas mL⁻¹, y con una espátula Drigalsky se sembraron 100 µL de dicha suspensión en medio PDA. Las cajas de Petri fueron incubadas como se describió anteriormente hasta observar el inicio del crecimiento de colonias fúngicas, las cuales fueron transferidas a nuevas cajas de Petri con medio de cultivo. Tres de estas colonias provenientes de tres aislados diferentes de hongos con características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) similares fueron posteriormente utilizadas para la extracción de ADN, la amplificación de los ITS, y secuenciación de los mismos.

La identificación microscópica de los aislados fúngicos se realizó mediante la técnica de microcultivo. Las hifas y estructuras de los hongos fueron teñidas con azul algodón lactofenol (Sigma-Aldrich, 113741) y observadas directamente en un microscopio de campo claro (Carl Zeiss, Oberko-

collected using a 0.1% Tween 80 sterile solution; a suspension of 100 spores mL⁻¹ was prepared, and using a spatula Drigalski, 100 µL of the suspension were sown in PDA culture medium. The Petri dishes were incubated under the above described conditions until fungal colonies started to grow; the new colonies were transferred to new Petri dishes with culture medium. Three colonies from three different fungi isolates with similar morphological characteristics (macroscopic and microscopic) were later used to extract DNA and amplify and sequence the ITS.

The microscopical identification of the fungi isolates was performed using the microculture technique. The fungi hyphae and structures were stained with lactophenol cotton blue solution (Sigma-Aldrich, 113741) and directly observed under a light field microscope (Carl Zeiss, Oberkochen). Their morphological characteristics were determined using the taxonomic keys described by Leslie and Summerell (2006). Mycelium of the three different fungi isolates that had grown for six days in PDA solid culture medium was also collected and frozen with liquid nitrogen. The mycelium was pulverized with a mortar, and 100 mg were used to extract genomic DNA. The DNA was extracted using phenol-chloroform, washed with 70% ethanol, and re-suspended in sterile deionized water. The DNA integrity was observed using 1% ultrapure agarose gel electrophoresis (Sigma, MA) and its concentration was determined in a NanoDrop Thermo Scientific spectrophotometer (Waltham, MA). Later, the Internal Transcribed Spacers (ITS) region of the genomic DNA samples was amplified by PCR. The amplification was carried out using Taq DNA polymerase Platinum High Fidelity (Invitrogen, MA), the oligonucleotides ITS1 CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA and ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC (Bellemain *et al.* 2010), and 100 ng of genomic DNA of each fungus.

chen). Para determinar sus características morfológicas, se siguieron las claves taxonómicas descritas por Leslie y Summerell (2006). También se colectó y congeló con nitrógeno líquido, el micelio de tres diferentes aislados fúngicos a los seis días de crecimiento en medio sólido PDA. El micelio se pulverizó con la ayuda de un mortero, y se usaron 100 mg para la extracción de ADN genómico. El ADN se extrajo con fenol-cloroformo, se lavó con etanol al 70%, y se resuspendió en agua desionizada estéril. La integridad del ADN se observó mediante electroforesis en gel al 1% de agarosa ultrapura (Sigma, MA), y su concentración se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific (Waltham, MA). Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR de la región de Espaciadores Internos Transcritos (ITS) de las muestras de ADN genómico. Para ello se usó la Taq DNA polimerase Platinum High Fidelity (Invitrogen, MA), los oligonucleótidos ITS1 CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA e ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC (Bellemain *et al.* 2010), y 100 ng de DNA genómico de cada hongo. Las condiciones usadas en la PCR fueron las siguientes: temperatura inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 min; 35 ciclos con una desnaturalización a 94 °C por 15 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, extensión a 68 °C por 20 s; y una extensión final a 72 °C durante 1 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel al 1% de agarosa ultrapura (Thermo Fischer Scientific), se purificaron mediante el kit D4033 de Zymo Research (Irvine, CA), y se cuantificó su concentración en espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific (Waltham, MA). Los productos de PCR fueron secuenciados usando el oligonucleótido ITS1, y utilizando la plataforma de Sanger (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) en el Laboratorio de Servicios Genómicos de la UGA-CINVESTAV, en Irapuato Guanajuato, México. Las secuencias fueron editadas en el software BioEdit 7.2.5, y posteriormente

The conditions for PCR were as follows: initial denaturation temperature at 94 °C for 2 min; 35 cycles with denaturation at 94 °C for 15 s, alignment at 55 °C for 30 s, extension at 68 °C for 20 s, and one final extension at 72 °C for 1 min. The PCR products were visualized in 1% ultrapure agarose gel (Thermo Fischer Scientific), purified with a D4033 kit from Zymo Research (Irvine, CA), and their concentration was quantified in a NanoDrop Thermo Scientific spectrophotometer (Waltham, MA). The PCR products were sequenced with the ITS1 oligonucleotide and the Sanger platform (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) in the Genomic Services Laboratory of UGA-CINVESTAV, in Irapuato, Guanajuato, Mexico. The sequences were edited with the BioEdit 7.2.5 software and subsequently analyzed with BLAST on the online site of the National Center for Biotechnology (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finally, spores of the three pure isolates were cryopreserved in tubes containing 25% glycerol at -80 °C in the strain pool of the Fungi Development and Differentiation Laboratory of CINVESTAV, Irapuato Unit.

Based on the guidelines to determine the damage caused to agricultural crops described by Gabriel *et al.* (2017), it was observed that approximately 70% of the vanilla plants with symptoms showed general wilt. In addition, some leaves and fruits had chlorotic areas and necrotic or rotten spots (Figures 2A and 2B). Interestingly, the leaves and fruits with symptoms were easily detached from the stem at different times during the sampling. Five days after the tissue segments were sown in PDA medium, the growth of filamentous fungal colonies was observed at the contact areas between the plant tissue and the culture medium. After obtaining fungal isolates with similar macroscopic characteristics, approximately 15 fungal isolates per sampling were taken, which were then used

analizadas mediante BLAST en el sitio en línea del National Center for Biotechnology (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finalmente, esporas de los tres aislados puros fueron criopreservadas en tubos con glicerol al 25% y a -80°C en el cepario del laboratorio de desarrollo y diferenciación de hongos, del Cinvestav Unidad Irapuato.

Considerando los lineamientos para determinación de daño en cultivos agrícolas descritos por Gabriel *et al.* (2017), se observó que aproximadamente un 70% de las plantas de vainilla con síntomas, presentaban marchitamiento general. Además, algunas de sus hojas y frutos presentaban zonas clorosis y puntos de necrosis o pudrición (Figura 2A y 2B). Interesantemente, las hojas y frutos con síntomas fueron fácilmente desprendidas del tallo, en los diferentes momentos de muestreo. A los cinco días post-siembra de los segmentos de tejido en medio PDA, se observó el crecimiento de colonias fúngicas filamentosas en las zonas de contacto entre los tejidos de planta y el medio de cultivo. Después de obtener aislados fúngicos con características macroscópicas similares, se obtuvieron aproximadamente 15 aislados fúngicos por muestreo, los cuales fueron usados para la obtención de cultivos monospóricos. Las colonias fúngicas puras mostraron desarrollo de micelio filamentosos, esparcido y abundante, con ligera acumulación de macroconidios y microconidios en el centro de la colonia. Se observó la producción de pigmentos color violeta por el anverso de la colonia y mostró una coloración amarillo-marrón por el reverso del medio de cultivo (Figura 2E). Bajo el microscopio se observó abundante micelio septado, hialino y después de una semana de crecimiento se observó el desarrollo de clamidosporas de aproximadamente 8 µm de diámetro (Figura 2F). Además, se observaron microconidios con forma arriñonada, u ovalada de aproximadamente 7 µm de largo (Figura 2G).

Las secuencias de ITS de los tres aislados fueron

to obtain monosporic cultures. The pure fungal colonies developed filamentous, scattered, and abundant mycelium, with slight accumulation of macronidia and microconidia in the middle of the colony. The production of pigments violet in color was observed on the front of the colony, and yellow-brown coloration on the back of the culture medium (Figure 2E). Abundant septate and hyaline mycelium was observed under the microscope and, after one week of growth, the formation of chlamydospores approximately 8 µm in diameter was also observed (Figure 2F), as well as kidney-shaped or oval microconidia approximately 7 µm long (Figure 2G).

The ITS sequences of the three isolates were deposited in the GenBank of the NCBI with accession numbers MT573368, MT573369, and MT573370. Those sequences were approximately 230 nucleotides in length, and had 100% coverage and 99.55% similarity with the *Fusarium oxysporum* species complex, in particular with the O309 isolate reported in NCBI under code MT032690.1, which was isolated from roots, leaves and stems of pumpkin plants. These results prove that the three fungal isolates that were sequenced correspond to the same species of the *Fusarium* genus, but conducting more robust molecular and phylogenetic studies would make it possible to confirm the species, as well as the *forma specialis* (f. sp.) of the fungus, that is, the taxonomic group within the *F. oxysporum* species to which the isolated fungus belongs considering its range of host plants.

Fusarium oxysporum is a group with over 100 *formae speciales* (ff. spp.) of phytopathogenic and highly virulent fungi that can saprophytically survive for long periods in soil organic matter waiting for weak plants or hosts. Many of these fungi are pathogen agents of economically important plant species worldwide. In Mexico,

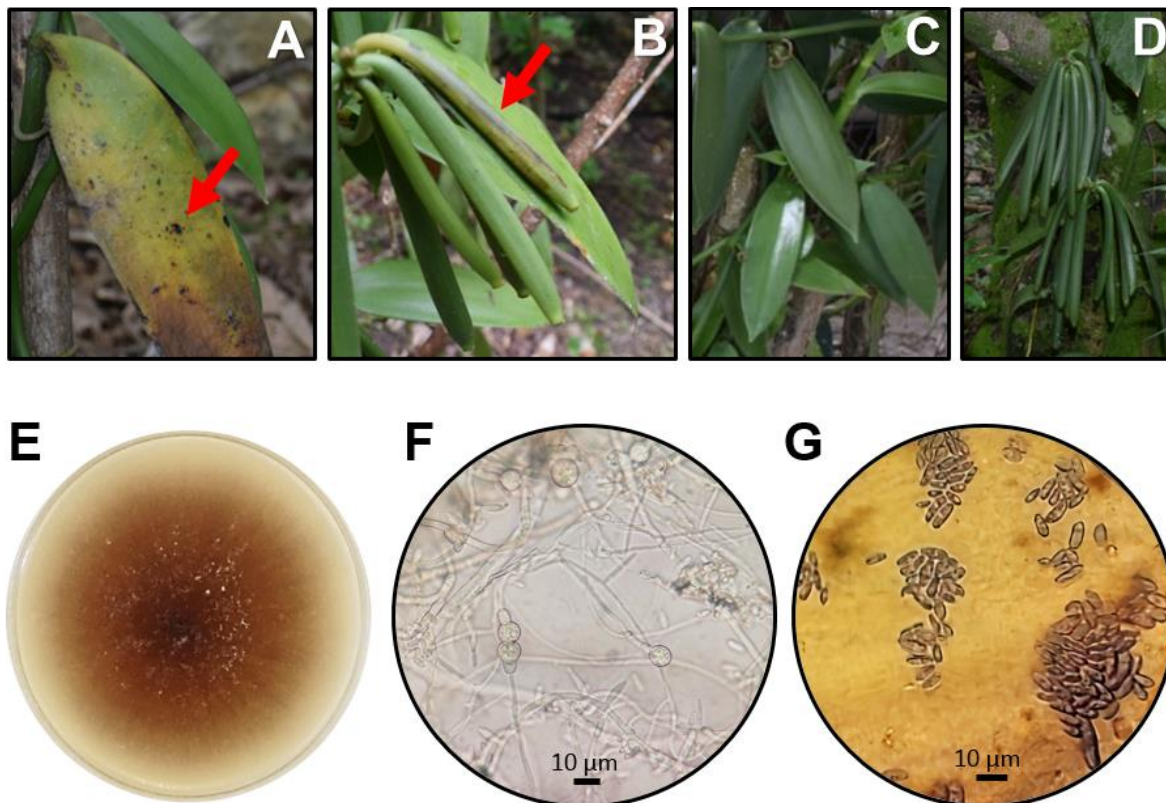


Figura 2. Síntomas de infección observados en las plantas de vainilla cultivada en la Huasteca Potosina Sur, e imágenes de la morfología del hongo *Fusarium* aislado. A, Hoja de vainilla con clorosis y puntos de necrosis (flecha roja). B, Frutos de vainilla con clorosis e importantes zonas de necrosis (flecha roja). C y D, Hojas y frutos de plantas de vainillas sin síntomas de infección. E, Crecimiento de *Fusarium* en medio PDA y en oscuridad. F, Micelio y clamidosporas de *Fusarium*. G, Microconidios de *Fusarium*.

Figure 2. Infection symptoms observed on vanilla plants cultivated in the southern Huasteca Potosina, and images of the isolated *Fusarium* fungus. A: Vanilla leaf with chlorotic and necrotic spots (red arrow). B: Vanilla fruits with chlorosis and important areas with necrosis (red arrow). C and D: Leaves and fruits of vanilla plants with no infection symptoms. E: *Fusarium* growth in PDA medium and in darkness. F: *Fusarium* mycelium and chlamydospores. G: *Fusarium* microconidia.

depositadas en GenBank de NCBI con los números de acceso MT573368, MT573369, y MT573370. Dichas secuencias presentaron una longitud de aproximadamente 230 nucleótidos y una cobertura del 100% y una similitud del 99.55% con el complejo de especies *Fusarium oxysporum*, en particular con el aislado O309 reportado en NCBI con la clave MT032690.1, el cual fue aislado de raíces, hojas y tallos de plantas de calabaza. Estos resul-

different species of the *Fusarium* genus have been reported in economically important crops with infection symptoms, for example, in Valencia var. orange trees and mango plants. Infection caused by *F. oxysporum* has also been previously reported on vanilla plants cultivated in the states of Veracruz (Adame-García *et al.*, 2015) and Nayarit (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017), where plants that had been directly inoculated with the fungus isolates showed

tados comprueban que los tres aislados fúngicos secuenciados corresponden a una misma especie del género *Fusarium*, aunque estudios moleculares y filogenéticos más robustos permitirían confirmar la especie y la *forma specialis* (f. sp.) del hongo, es decir el grupo taxonómico dentro de la especie *F. oxysporum* a la cual pertenece el hongo aislado considerando su rango de plantas huéspedes.

Fusarium oxysporum es un grupo con más de 100 *formae speciales* (ff. spp.) de hongos fitopatógenos altamente virulentos, con la capacidad de sobrevivir saprofiticamente por largos periodos de tiempo en la materia orgánica del suelo en espera de plantas u hospederos débiles. Muchos de estos hongos son agentes patógenos de especies de plantas económicamente importantes en todo el mundo. En México, diferentes especies del género *Fusarium* han sido reportadas en cultivos de importancia económica con síntomas de infección, por ejemplo, en naranjos *var.* Valencia y en plantas de mango. Incluso, previamente ha sido reportada la infección por *F. oxysporum* en plantas de vainilla cultivadas en los estados de Veracruz (Adame-García *et al.*, 2015) y Nayarit (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017), donde las plantas directamente inoculadas con aislados del hongo, mostraban importantes zonas de clorosis y necrosis o putrefacción; síntomas que también se observaron en las plantas utilizadas en este trabajo. En este trabajo se reporta por primera vez el aislamiento e identificación de *Fusarium* asociados a plantas de vainilla cultivadas en la región Huasteca del estado de San Luis Potosí. Por lo tanto, como perspectivas de este trabajo se plantea la infección de plantas de vainilla sanas con el aislado de *Fusarium* reportado, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Así como la realización de experimentos moleculares más robustos que permitan definir la *forma specialis* del hongo.

significant chlorotic and necrotic or rotten areas, symptoms that were also observed on the plants used in this study. This study reports for the first time the isolation and identification of *Fusarium* isolates associated with vanilla plants cultivated in the Huasteca region of the state of San Luis Potosí. Therefore, based on the results of this study, further research is proposed to evaluate infection on healthy vanilla plants using the reported *Fusarium* isolate, under *in vitro* and *in vivo conditions*, as well as conducting more robust molecular experiments that make possible to define the *forma specialis* of the fungus.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the Sociedad de Productores Vainilleros of the community of Cuichiapa, municipality of Matlapa, San Luis Potosí, for inviting us and supporting our activities in their fields. We also thank professor emeritus Dr. José Ruiz-Herrera of CINVESTAV Irapuato Unit for providing equipment from his laboratory to molecularly identify the fungi used in this study. We also thank B.S. in Geography José Joshua Josimar Silva Cortez for his support to draw the maps. DMS is a post-doctoral researcher with a scholarship granted by UC MEXUS CONACYT.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sociedad de Productores Vainilleros de la comunidad de Cuichiapa municipio de Matlapa, S.L.P., por la invitación y facilidades para trabajar en sus parcelas. Agradecemos al Profesor Emérito Dr. José Ruiz-Herrera del

CINVESTAV Unidad Irapuato, por facilitarnos equipo de su laboratorio para la identificación molecular de los hongos. También agradecemos al Lic. en Geografía José Joshua Josimar Silva Cortez, por su apoyo en la elaboración de mapas. DMS es investigador postdoctoral con beca de UC MEXUS CONACYT.

## LITERATURA CITADA

- Adame-García J, Rodríguez-Guerra R, Iglesias-Andreu L, Ramo-Prado JM, Luna-Rodríguez M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93(3):669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10(189). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Casillas-Isiordia R, Flores-de la Rosa F, Can-Chulim A, Luna-Esquivel G, Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Guerrero L, Luna-Rodríguez M. 2017. *Fusarium* sp. associated with *Vanilla* sp. rot in Nayarit Mexico. *Journal of Agricultural and Biological Science* 12(2):43-50. <https://hortintl.cals.ncsu.edu/articles/fusarium-sp-associated-vanilla-sp-rot-nayarit-mexico>
- Gabriel J, Ortuño N, Vera M, Castro C, Narváez W, Manobanda M. 2017. Manual para evaluación de daños de enfermedades en cultivos agrícolas. Primera Edición. Grupo COMPAS. Jipijapa, Ecuador. 53 p.
- Leslie JF, Summerell B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Wiley Blackwell Publishing. Iowa, USA. <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>