



# **UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES

## **Diagnóstico de enfermedades causadas por hongos en plantas de palmera y tipo palmera de uso ornamental, en un vivero de la Comunidad Valenciana**

**Trabajo Final**

Máster Universitario en Sanidad y Producción Vegetal

PRESENTADO POR:

**Francisco Javier Beluzan Flores**

DIRIGIDO POR:

**Dra. María Paloma Abad Campos**

CURSO ACADÉMICO 2017/2018

**SEPTIEMBRE DE 2018, VALENCIA, ESPAÑA**

## RESUMEN

Durante la última década, el cultivo de plantas ornamentales en España ha presentado un incremento paulatino y sostenido. Esto es debido a una fuerte corriente comercial que ha sido promovida principalmente por la industria viverística, sobre todo la dedicada a la producción de palmeras ornamentales. Estos cultivos al igual que los agrícolas, no están exentos de problemas sanitarios que perjudican directamente la producción. Por esta razón, es que surge la necesidad de determinar cuáles son los problemas fitopatológicos frecuentes en la producción de estas plantas en viveros, para establecer medidas agronómicas de manejo. Por lo anterior, este Trabajo de Fin de Máster, tiene como objetivo general diagnosticar enfermedades de etiología fúngica, en plantas de palmera y tipo palmera de uso ornamental, además de proponer medidas de manejo de las infecciones diagnosticadas. Para responder a los objetivos planteados se analizaron muestras de *Chamaerops humilis* cv. *vulcano*, *Yucca rostrata*, *Syagrus romanzoffiana* y *Cycas revoluta*, provenientes de un vivero de la Comunidad Valenciana, que presentaban síntomas de posibles infecciones causadas por hongos en la zona foliar y radical. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia, para su análisis. Los órganos vegetales sintomáticos a infecciones fúngicas, se sometieron al protocolo de desinfección y de aislamiento en cultivo puro de hongos presentes en tejido vegetal. Los hongos fueron identificados basándose en secuencias de las regiones ITS, Histona H3, Factor de Elongación  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Como resultado se diagnosticaron doce muestras vegetales, de las cuales en nueve se logró aislar hongos. De estas plantas, a seis se les pudo relacionar la sintomatología presentada con el organismo aislado e identificado, estableciéndolos como posibles agentes causales de las infecciones presentadas. Adicionalmente, se identificaron tres patógenos no descritos para los hospederos analizados, pudiendo ser los primeros reportes de los mismos. Estos últimos resultados quedan sujetos a la comprobación con pruebas de patogenicidad.

**Palabras clave:** diagnóstico, hongos, PCR.

## ABSTRACT

During the last decade, the cultivation of ornamental plants in Spain has presented a gradual and sustained increase. This is due to a strong commercial flow that has been promoted mainly by the nursery industry, especially that dedicated to the production of ornamental palms. These crops, like agricultural crops, are not exempt from sanitary problems that directly affect production. For this reason, it is necessary to determine the frequent phytopathological problems in the production of these plants in nurseries, in order to establish agronomic management measures. Because of this, this Master's Thesis aims to diagnose diseases of fungal etiology, in palm and palm-tree plants for ornamental use, as well as propose measures for the management of diagnosed infections. To answer the proposed objectives, samples of *Chamaerops humilis* cv. *vulcano*, *Yucca rostrata*, *Syagrus romanzoffiana* and *Cycas revoluta*, from a nursery in the Valencian Community, which presented symptoms of possible infections caused by fungi in the leaf and root zone were analyzed. The samples were processed in the Plant Pathology Laboratory of the Polytechnic University of Valencia, for analysis. Plant organs symptomatic to fungal infections were subjected to the protocol of disinfection and isolation in pure culture of fungi present in plant tissue. The fungi were identified based on sequences of the ITS, Histone H3, Elongation Factor  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin regions. As a result, twelve plant samples were diagnosed, and from nine of them were isolated fungi. Of these plants, six could be related to the symptomatology previously described with the isolated and identified organisms, establishing them as possible causal agents of the presented infections. Additionally, three pathogens not described for the analyzed hosts were identified, which may be the first reports of them. These last results are subject to verification with pathogenicity tests.

**Key words:** diagnosis, fungi, PCR.

## INDICE GENERAL

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 PLANTAS ORNAMENTALES EN ESPAÑA.....  | 1         |
| 1.2 GENERALIDADES DE PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.....  | 2         |
| 1.3 PRINCIPALES GÉNEROS DE PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.....                                    | 3         |
| 1.3.1 <i>Syagrus romanzoffiana</i> (Cham., Glassman).....  | 3         |
| 1.3.2 <i>Cycas revoluta</i> (Thunb.).....  | 3         |
| 1.3.3 <i>Yucca rostrata</i> (Engelm. ex Trelease).....   | 5         |
| 1.3.4 <i>Chamaerops humilis</i> (L.).....  | 5         |
| 1.4 PRINCIPALES AGENTES CAUSANTES DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS..... | 6         |
| 1.4.1 Especies del género <i>Fusarium</i> (Link ex Grey).....  | 6         |
| 1.4.2 Especies del género <i>Ilyonectria</i> (Chaverri y Salgado).....                                   | 7         |
| 1.4.3 Especies del género <i>Pestalotiopsis</i> (Steyaert).....  | 7         |
| 1.4.4 Especies del género <i>Colletotrichum</i> (Corda).....   | 8         |
| 1.4.5 Especies del género <i>Alternaria</i> (Nees ex Fr).....  | 8         |
| 1.4.6 Especies del género <i>Diaporthe</i> (Nitschke).....   | 9         |
| 1.4.7 Especies del género <i>Phoma</i> (Fr).....   | 10        |
| 1.4.8 Especies del género <i>Thielaviopsis</i> (Went).....   | 10        |
| 1.5 METODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES EN PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.....                 | 11        |
| 1.5.1 Diagnóstico por observación de síntomas.....   | 11        |
| 1.5.2 Diagnóstico por técnicas moleculares.....  | 11        |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>13</b> |
| 3.1 RECEPCIÓN DE MUESTRAS SINTOMÁTICAS EN LABORATORIO.....   | 13        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.1.1     | Sintomatología del material vegetal.....  | 14        |
| 3.2       | PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....  | 16        |
| 3.2.1     | Desinfección de tejido vegetal.....   | 17        |
| 3.2.2     | Siembra de tejido vegetal en medio de cultivo fúngico y aislamiento en cultivo puro.....      | 17        |
| 3.2.3     | Obtención de cultivos monospóricos.....   | 19        |
| 3.3       | IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS AISLADOS.....  | 20        |
| 3.4       | IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS.....  | 20        |
| 3.4.1     | Extracción de DNA.....  | 20        |
| 3.4.2     | Selección de cebadores universales.....   | 21        |
| 3.4.3     | Amplificación de DNA y electroforesis en gel de agarosa.....                                  | 21        |
| 3.4.4     | Secuenciación de DNA.....   | 23        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>24</b> |
| 4.1       | DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE <i>Chamaerops humilis</i> .....           | 24        |
| 4.2       | DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE <i>Yucca rostrata</i> .....               | 31        |
| 4.3       | DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE <i>Cycas revoluta</i> .....               | 32        |
| 4.4       | DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE <i>Syagrus romanzoffiana</i> .....        | 34        |
| 4.5       | RECOMENDACIONES DE MANEJO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PLANTAS DE PALMERAS Y TIPO PALMERA..... | 35        |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>6.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>7.</b> | <b>ANEXOS.....</b>  | <b>48</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Evolución de la superficie de producción de ornamentales en España.....   | 1  |
| <b>Figura 2.</b>  | Principales géneros de palmeras ornamentales y tipo palmeras. (A) <i>Syagrus romanzoffiana</i> , (B) <i>Cycas revoluta</i> , (C) <i>Yucca rostrata</i> y (D) <i>Chamaerops humilis</i> .....  | 4  |
| <b>Figura 3.</b>  | Sintomatología presente en plantas de palmera y tipo palmera de uso ornamental, a diagnosticar. Código de muestra se indica a pie de cada fotografía.....   | 14 |
| <b>Figura 4.</b>  | Siembra de tejido vegetal en medios de cultivo para crecimiento fúngico, antes de incubación (izquierda) y posterior a incubación en estufa (derecha).....  | 18 |
| <b>Figura 5.</b>  | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3384 de <i>C. humilis</i> . (A) <i>Chaetomium globosum</i> , (B) <i>Fusarium oxysporum</i> , (C) <i>Ilyonectria capensis</i> , (D) <i>I. liligena</i> , (E) <i>I. liriodendri</i> , (F) <i>Pestalotiopsis</i> sp. y (G) <i>Xenoacromonium</i> sp..... | 25 |
| <b>Figura 6.</b>  | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3385 de <i>C. humilis</i> . (A) <i>Fusarium oxysporum</i> y (B) <i>F. solani</i> .....  | 26 |
| <b>Figura 7.</b>  | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3386 de <i>C. humilis</i> . (A) <i>Colletotrichum siamense</i> , (B) <i>Colletotrichum</i> sp., (C) <i>Fusarium oxysporum</i> , (D) Ascomiceto no identificado y (E) <i>Zopfiella latipes</i> .....   | 27 |
| <b>Figura 8.</b>  | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3390 de <i>C. humilis</i> . (A) <i>Aureobasidium pullulans</i> , (B) <i>Cladosporium macrocarpum</i> , (C) <i>Cladosporium</i> sp., (D) <i>Penicillium polonicum</i> y (E) <i>Penicillium</i> sp.....   | 29 |
| <b>Figura 9.</b>  | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3391 de <i>C. humilis</i> . <i>Alternaria infectoria</i> .....  | 29 |
| <b>Figura 10.</b> | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3392 de <i>C. humilis</i> . (A) <i>A. alternata</i> , (B) <i>Alternaria</i> sp., (C) <i>Diaporthe foeniculina</i> , (D) <i>Penicillium</i> sp. y (E) <i>Phoma</i> sp.....   | 30 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 11.</b> | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3394 de <i>Y. rostrata</i> . (A) <i>Alternaria alternata</i> , (B) <i>A. infectoria</i> , (C) <i>Penicillium</i> sp. y (D) <i>Stemphyllium</i> sp..... | 31 |
| <b>Figura 12.</b> | Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3398 de <i>C. revoluta</i> . (A) <i>Fusarium oxysporum</i> , (B) <i>F. solani</i> y (C) <i>Trichoderma</i> sp.....                                     | 33 |
| <b>Figura 13.</b> | Hongos aislados de la muestra 3445 de <i>S. romanzoffiana</i> . (A) <i>Trichoderma</i> sp., (B) <i>Phaeoacremonium venezuelense</i> y (C) <i>Xenoacremonium falcatus</i> .....                     | 34 |

## INDICE DE TABLAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> | Muestras recibidas en el Laboratorio de Patología Vegetal, de la Universitat Politècnica de València..... | 13 |
| <b>Tabla 2.</b> | Cebadores universales utilizados en las reacciones de PCR, para identificación de hongos aislados.....    | 21 |
| <b>Tabla 3.</b> | Mezcla de PCR por cada reacción.....  | 22 |
| <b>Tabla 4.</b> | Programas para la amplificación de DNA, según región a analizar.....                                      | 22 |

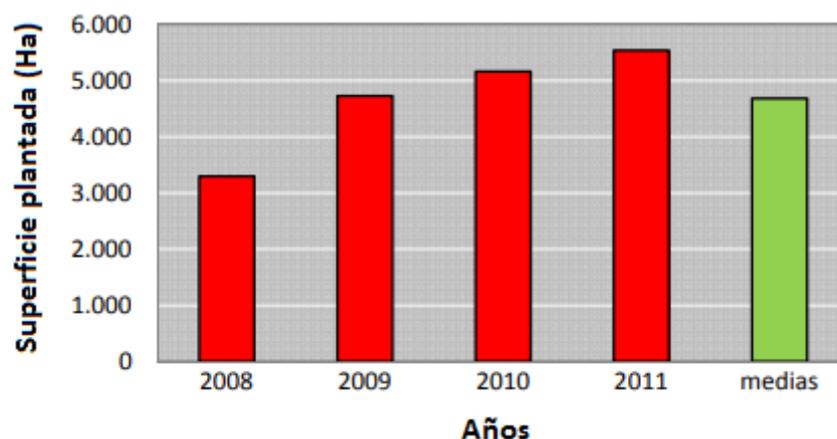
## INDICE DE ANEXOS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Anexo 1.</b> | Hongos aislados según muestra, hospedero y método de identificación. ITS: Espaciador Transcrito Interno, EF: Factor de Elongación de <i>Fusarium</i> , His: Histona, $\beta$ -Tub 2: Gen de la $\beta$ -Tubulina y MIC: identificación microscópica.....  | 48 |
| <b>Anexo 2.</b> | Observación e identificación microscópica de algunos hongos aislados. (A) conidióforo de <i>Penicillium</i> sp., aislado de las muestras 3390, 3392 y 3394; (B) conidias flageladas de <i>Pestalotiopsis</i> sp., aislado de la muestra 3384; (C) conidias coloreadas de <i>Alternaria</i> sp., aislada de la muestra 3392 y (D) conidióforos de <i>Trichoderma</i> sp., aislado de las muestras 3398 y 3445..... | 49 |
| <b>Anexo 3.</b> | Geles de Agarosa visto por el transiluminador de luz UV. Bandas claras indican una muestra positiva y ausencia de ella, una negativa. Números indican código de aislado (códigos no publicados).....  | 50 |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PLANTAS ORNAMENTALES EN ESPAÑA.

Durante la última década, el cultivo de plantas ornamentales en España ha presentado un incremento paulatino y sostenido (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2018). Esto es debido a una fuerte corriente comercial que ha sido promovida principalmente por la industria viverística, sobre todo la dedicada a la producción de palmeras ornamentales (Ballester-Olmos, 1996; Ballester-Olmos, 1999), las cuales se encuentran asociadas a las ideas de jardines tropicales y exóticos.



**FIGURA 1.** Evolución de la superficie de producción de ornamentales en España.

Fuente: MAPAMA (2018).

Albardiaz (1997), indica que las plantas ornamentales se encuentran relacionadas con un bien de consumo de lujo, demandados por países con mayor poder adquisitivo principalmente, lo que ha representado a lo largo de los años, un importante nicho de negocios y de producción agrícola para España. Por lo anterior, MAPAMA (2018), indica que la producción de ornamentales en el año 2011 logró superar las 5.500 hectáreas de producción en España (Figura 1), destacando las zonas de Andalucía y Comunidad Valenciana, caracterizadas por poseer condiciones climáticas adecuadas para su producción comercial masiva.

## 1.2 GENERALIDADES DE PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.

Las plantas ornamentales con forma de palmera producidas en España y en el resto del mundo, corresponden a especies monocotiledóneas, clasificadas taxonómicamente en varios órdenes, destacando Arecales, Asparagales y Cycadales. En estos órdenes, las principales familias producidas son Arecaceae, Agavaceae y Cycadaceae, respectivamente (AGP II, 2003).

Comúnmente, la denominación “palmera” responde a las plantas pertenecientes a la familia botánica Arecaceae (Plumed y Costa, 2013), no obstante, Mota (2006), indica que existen otras especies fuera de esta familia que comúnmente se conocen como plantas “tipo palmera” o “falsa palmera”, como las familias botánicas mencionadas anteriormente. Esto es debido a la similitud morfológica o arquetipo que existe con las verdaderas palmeras, propiamente tal.

En cuanto a su morfología, Mota (2006), indica que presentan raíz fasciculada, que se interna en el suelo para garantizar una adecuada fijación y nutrición. Algunas palmeras que son multicaules (en botánica: plantas que tiene varios tallos que nacen juntos), pueden desarrollar raíces adventicias o aéreas en la base de la planta o peana (Argimón de Vilardaga, 2001).

Puig y Ramoneda (2000), indican que las palmeras poseen estípite o estipe, que corresponde a un falso tronco, el cual generalmente se presenta de forma solitaria, aunque hay algunas especies que lo presentan de forma ramificada, multicaules y que forman pequeños hijuelos cercanos al suelo. En cuanto al tamaño, se presentan de variadas modalidades: largos, finos, cortos, gruesos y de muchas texturas como: lisos, ásperos, cubiertos de fibras o espinas que les sirven para trepar. Los estípites al ser falsos troncos, no poseen las mismas estructuras que una planta arbórea común, éstos carecen de cambium, por lo que la yema terminal al crecer es la encargada de formar el estípite.

Las hojas, también conocidas como palmas, son de carácter perenne, es decir, estas plantas están constantemente produciendo hojas nuevas, que se ubican en la parte superior del estípite. El peciolo de la hoja se encuentra lignificado y abrazando el estípite, ésta puede ser de diferentes formas: palmeadas (forma de abanico), pinnadas (forma de pluma), costapalmadas (forma entre abanico y pluma) y enteras (sin divisiones) (Mota, 2006). Según la dirección de la curvatura de los foliolos, hacia el haz

o el envés, se puede hablar de induplicados y reduplicados, respectivamente (Puig y Ramoneda, 2000).

Las flores son unisexuales o bisexuales, de tamaño pequeño y colores poco vistosos como el blanco y el beige, es por esto que la polinización principalmente es anemófila y en menor medida es entomófila. Se agrupan en inflorescencias protegidas por brácteas (Puig y Ramoneda, 2000; Mota, 2006).

Finalmente, los frutos pueden ser bayas, drupas o una nuez, de tamaños variados, donde no todos son comestibles, algunos pueden ser altamente tóxicos para humanos y animales (Puig y Ramoneda, 2000).

### **1.3 PRINCIPALES GÉNEROS DE PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.**

#### **1.3.1 *Syagrus romanzoffiana* (Cham., Glassman).**

Corresponde a una palmera de gran tamaño (Figura 2-A), de origen neotropical (Plumed y Costa, 2013). También llamada Palmera Reina y Coco Plumoso, se caracteriza por tener hojas pinnadas de hasta seis metros, con aspecto plumoso por la elevada cantidad de foliolos que presenta. Posee un tronco solitario, es decir, sin ramificaciones, creciendo sobre los 10 m y 60 cm de diámetro (Puig y Ramoneda, 2000).

Si bien esta palmera puede crecer y cultivarse en zonas templadas mediterráneas, Albano (2005); Mota (2006), indican que es recomendable la aportación de fertilizantes y elevar la frecuencia de riegos, sobre todo en los primeros años de producción, donde la susceptibilidad a la desecación se agudiza. Los mismos autores recomiendan ubicarlas en zonas soleadas del vivero o jardín, ya que es un cultivo susceptible a las bajas temperaturas, por lo que poseer un sistema de control de heladas, representa una ventaja comercial a la hora de su producción masiva. En cuanto al tipo de suelo, se recomienda un suelo profundo para poder maximizar la producción de follaje. Optimizando los requerimientos productivos, esta palmera puede crecer rápidamente varios metros, en pocos años.

#### **1.3.2 *Cycas revoluta* (Thunb).**

Planta de origen japonés. Corresponde a una planta perenne, con tamaño medio (1 a 3 metros) (Figura 2-B). Forma parte de las llamadas falsas palmeras ya que

corresponde a una planta gimnosperma. Posee un tronco principal, sin ramificaciones y con numerosos brotes en la base del tronco. Las hojas se presentan en una roseta apical que persiste, con foliolos rígidos, espinescentes y de color verde brillante, los que al llegar a la base se transforman en espinas (Montes y Romero, 2005; Hill, 2010).



**FIGURA 2.** Principales géneros de palmeras ornamentales y tipo palmeras. (A) *Syagrus romanzoffiana*, (B) *Cycas revoluta*, (C) *Yucca rostrata* y (D) *Chamaerops humilis*.

Fuente: (A) Universidad de Málaga (2018); (B) Romero (2005); (C) The University of Arizona (2016); (D) Galán y col. (2013).

Actualmente existen pocas especies del género *Cycas*, debido a procesos de extinción (Donaldson, 2003), relacionados con la extracción de poblaciones silvestres con fines comerciales (Moreno y col. 2014). Sin embargo, algunas especies como la *C. revoluta*, debido a su elevado valor ornamental, ha encontrado nicho en la reproducción comercial, pese a la dificultad de su propagación, escasas de semillas y tasa lenta de crecimiento (Perez y Vovides, 1997)

### **1.3.3 *Yucca rostrata* (Engelm. ex Trelease).**

Según The University of Arizona (2016), esta falsa palmera se caracteriza por hojas largas y estrechas pero ligeramente ensanchadas en la base foliar, de color verde-azulado, con bordes amarillentos, que forman una roseta simétrica densa en la parte superior (Figura 2-C). El tallo principal está cubierto por una falda de hojas viejas y secas, las cuales proporcionan sombra y protegen al tronco de las quemaduras solares que pueden generar pequeñas grietas, desencadenando problemas fúngicos.

Sánchez de Lorenzo (2003), indica que esta planta se multiplica por semillas, por hijuelos y por esquejes o estacas de la raíz. Guillot y Van Der Meer (2009); Ortiz y col. (2013), agregan que, desde el punto de vista viverístico, se producen principalmente de manera asexual, siendo utilizada la reproducción sexual con el objeto de mejoramiento vegetal en la obtención de híbridos altamente demandados en la actualidad. Los mismos autores señalan que esta planta prospera en variados tipos de suelos, principalmente los arenosos, como los de su zona de origen en el norte de México y sur de Estados Unidos (donde es resistente a sequía), por lo que necesita poco riego. Vive bajo un amplio rango de temperaturas, desde muy bajas a elevadas, siendo cultivadas en viveros al aire libre, valorando su elevada rusticidad como cultivo comercial.

### **1.3.4 *Chamaerops humilis* (L).**

También conocida como Margalló, Palmito, Palma di San Pietro y Palma Mediterránea (Figura 2-D), Albano (2005), indica que es una pequeña palmera endémica de la región mediterránea de Europa. Está caracterizada por tener hojas palmeadas y coriáceas. Algunas variedades presentan una capa de cera recubriendo las hojas, confiriéndoles una coloración grisácea a blanquecina. Los peciolos se presentan densamente dentados. Esta palmera presenta producción de hijuelos basales, los que se inclinan para apartarse uno del otro y tener espacio para la

producción del folio. Albano (2005); Mota (2006), indican que crece normalmente en lugares soleados y acantilados que bordean el mar de la zona mediterránea. Puig y Ramoneda (2000) indican que es muy rústica y que tolera todo tipo de suelos, aunque crece vigorosamente en suelos bien regados. Es resistente a los vientos marinos, frío, sequía, pleno sol y condiciones de sombra. A lo anterior, Plumed y Costa (2013) discrepan con respecto la tolerancia al frío, indicando que es susceptible a heladas. Su cultivo masivo se realiza al aire libre, preferentemente el periodo de cría se realiza con las temperaturas de otoño-primavera. El riego es realizado según condiciones edáficas, variando de dos a tres riegos por semana (Mota, 2006).

#### **1.4 PRINCIPALES AGENTES CAUSANTES DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.**

##### **1.4.1 Especies del género *Fusarium* (Link ex Grey).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género corresponden a hongos de la familia Nectriaceae, de la División Ascomycota.

Chase y col. (1991); Chase y Broschat (1993); Ballester-Olmos (1996); Albano (2005); Hernández-Hernández y col. (2010); Rodríguez y Rodríguez (2010), indican que los agentes causales *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* se han aislado de la palmera canaria (*Phoenix canariensis*), provocando síntomas de bandeados necróticos del raquis de las hojas y necrosamiento progresivo de los folíolos de un lado de la hoja, manteniéndose sanos en el otro, dándole una apariencia asimétrica. La infección continúa con el marchitamiento general de las hojas a causa de la invasión vascular desde las raíces hacia la parte superior de la planta. Los síntomas se agravan cuando las condiciones medioambientales son de altas temperaturas y humedad relativa media.

Ballester-Olmos (1996) informa sobre infecciones causadas por *F. oxysporum* en viveros de palmera, indicando que la infección ingresa y parte por las raíces, a través de heridas ocasionadas por el manejo del cultivo (arranque o trasplante) y sube hasta llegar a las hojas más altas, alcanzando la yema terminal, dando lugar a la muerte de la palmera.

Armengol y col. (2005), reportó por primera vez a *F. proliferatum* afectando a la palmera mediterránea *C. humilis*, con síntomas similares a los causados por este patógeno en la palmera canaria. El modo de infección de este patógeno se basa en la

producción de una batería de micotoxinas que necrosan tejidos vegetales, éstas son fumonisina, beauvericina, fusaproliferina, moniliformina y ácido fusárico.

#### **1.4.2 Especies del género *Ilyonectria* (Chaverri y Salgado).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género recaen bajo la clasificación momentánea de “*Incertae sedis*”, que significa falta de acuerdo entre los especialistas para ubicarlos en una familia. Con certeza se sabe que son hongos de la División Ascomycota.

Aiello y col. (2014), aislaron variadas cepas patogénicas de *I. palmarum* provenientes de palmeras ornamentales. La sintomatología descrita por los autores fue una podredumbre basal del tallo o tronco en plantas de viveros en maceta. Los vástagos principales se doblaban con facilidad e inusualmente las plantas enfermas producían hojas por debajo de la lesión causada por el patógeno. La podredumbre de la raíz se observó ocasionalmente. Opuestamente, Chaverri y col. (2011), indican que especies del género *Ilyonectria* se encuentran en el suelo y producen pudriciones radicales en variados cultivos.

#### **1.4.3 Especies del género *Pestalotiopsis* (Steyaert).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género corresponden a hongos de la familia Pestalotiopsidaceae, de la División Ascomycota.

En palmeras ornamentales, se ha descrito la enfermedad causada por la especie *P. palmarum*, descrita por Chase y col. (1991); Chase y Broschat (1993); Elliott y American Phytopathological Society (2004), como una pequeña mancha de color oscuro, que con el pasar de los días (y si hay condiciones predisponentes para la infección), crecen para formar lesiones circulares de hasta 2 mm de diámetro. En la madurez de la planta, las lesiones se vuelven de un color amarillo, casi blanco, con un halo y un centro necrótico. Las lesiones pueden aparecer en el raquis y en los folíolos. La infección por *P. palmarum*, se encuentra restringida a la familia Arecaceae. Rodríguez y Rodríguez (2010), indican que además de *P. palmarum*, las especies *P. phoenicis* y *P. papposa* también son patógenas para la familia Arecaceae. Específicamente, Khey y col. (2013), aislaron desde la palmera mediterránea *C. humilis*, la especie patogénica *P. cruenta*, desde los esporodoquios formados en el haz de las hojas. Braithwaite y col. (2006), determinaron que especies del género *Cycas*,

son hospederos susceptibles para *P. versicolor*. Para ambos casos, la sintomatología descrita corresponde a la anteriormente mencionada.

#### **1.4.4 Especies del género *Colletotrichum* (Corda).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género corresponden a hongos de la familia Glomerellaceae, de la División Ascomycota.

Ballester-Olmos (1996); Puig y Ramoneda (2000), informan infecciones causadas por *C. gloeosporioides* en viveros de palmeras, donde se inicia con pequeñas manchas aceitosas o grandes lesiones necróticas redondeadas o irregulares, con halo clorótico, síntomas que van cambiando según hospedero. Pequeños puntos en el centro de las lesiones corresponden a la formación de acérvulos del hongo. Al avanzar la infección, las manchas pueden llegar a coalescer. Chase y col. (1991); Chase y Broschat (1993), agregan que en algunas especies, la mancha necrótica se delimita por la nervadura de la hoja. Plantas pequeñas de viveros son extremadamente susceptibles, debido a las condiciones de elevada humedad en que se producen. En campo, la mancha ocasionada por *C. gloeosporioides*, es fácilmente confundible con la ocasionada por *Bipolaris* spp., debido a la similitud de la sintomatología. Shtereva y Mirkova (2006), informan infecciones por *C. gloeosporioides*, afectando a las palmeras *C. humilis*, *Phoenix dactylifera* y *Elaeis guineensis*. Braithwaite y col. (2006), informan infecciones por *C. capsici* en ornamentales tipo palmera como *Yucca* sp. y a *C. acutatum* infectando palmeras verdaderas como *Archontophoenix* sp. y *Jubaea chilensis*.

#### **1.4.5 Especies del género *Alternaria* (Nees ex Fr).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género corresponden a hongos de la familia Pleosporaceae, de la División Ascomycota.

De Corato y col. (2003), describe la enfermedad afectando a *C. humilis*, *C. excelsa* y *Washingtonia robusta*, todas palmeras de la familia Arecaceae. La alteración se observó como un intenso color amarillento que cubría la mayoría de las hojas de la parte basal del follaje de plantas adultas. Posteriormente en las manchas cloróticas aparece un halo necrótico de color marrón-negruzco. Estas manchas se multiplican, y se distribuyen uniformemente en toda la hoja y en algunos peciolo. Las lesiones pueden ser vistas tanto por el haz como el envés de la hoja. Conforme avanza la infección, las plantas presentan síntomas de marchitamiento generalizado.

Suwannarach y col. (2015), describieron síntomas similares afectando a la especie *Elaeis guineensis* (Arecaceae), la palma aceitera, causados por *A. longipes*. Posteriormente Haldhar y col. (2017), reportaron daños causados por *A. alternata* en *P. dactylifera*.

Cabe mencionar que según Agrios (2005), los síntomas ocasionados por especies de *Alternaria*, corresponden a manchas necróticas con formación de halos concéntricos, lo que no es posible observar en algunas palmeras, ya que éstas son monocotiledóneas y la distribución de los haces vasculares en las hojas es paralela, por lo que la observación del síntoma común en dicotiledóneas se vislumbra, como los reportados por De Corato y col. (2003).

Rocha (2012), realizó una prospección de hongos asociados a manchas foliares en *Yucca* spp., en las que aisló *Alternaria* sp. La misma autora explica que a pesar de que esta planta produzca grandes cantidades de saponinas como mecanismo de defensa a patógenos foliares, distintas especies de *Alternaria*, pueden detoxificar dichos compuestos, superando esta barrera y produciendo infecciones en *Yucca* spp.

#### **1.4.6 Especies del género *Diaporthe* (Nitschke).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género, corresponden a hongos de la familia Diaporthaceae, de la División Ascomycota.

Las especies de *Diaporthe* y su fase anamorfa *Phomopsis*, son endófitos y patógenos en una amplia gama de plantas, incluidas las palmeras ornamentales (Santos y Phillips, 2009). Abbas y col. (1991), informan sobre los daños ocasionados por *P. phoenicola* (actual *D. phoenicola*, Index Fungorum, 2018) a *P. dactylifera*, en los que se describe la muerte del brote terminal del tallo, ocasionando la muerte de todas las hojas de la planta. El-Deeb y col. (2007), indican para el mismo hospedero, muerte de raíces ocasionada por *Phomopsis* sp. Los autores antes mencionados indican que la infección en *P. dactylifera*, se encuentra asociada a un complejo de hongos, en los que se encuentran especies como *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp. y *Diplodia* sp., donde todos son patógenos habitantes comunes del suelo.

Charchar y col. (2003), inocularon plantas de *Syagrus oleracea* (Arecaceae) con aislados de *Diaporthe* sp., obtenidos de una leguminosa, observando que en el 90% de la plantas inoculadas se presentaron síntomas asociados a la infección por este patógeno, indicando el carácter polífago del mismo.

#### **1.4.7 Especies del género *Phoma* (Fr).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género, corresponden a hongos de la familia Didymellaceae, de la División Ascomycota.

El-Deeb y col. (2007), indican una baja frecuencia de aparición de *Phoma* spp. en palma datilera *P. dactylifera* (Arecaceae), muestreadas en Egipto, donde describe la enfermedad como manchas marrones, limitadas por la nervadura de la hoja. Solo se encontró generando infección en hojas.

Nayab y Akhtar (2016), presentan el primer reporte de *P. herbarum* en *C. revoluta* (Cycadaceae) en Pakistán, describiendo la enfermedad inicialmente como pequeñas manchas circulares (1 a 3 mm), de color marrón, con márgenes amarillos, que cubrían el 30% de la hoja. Con el pasar del tiempo, las manchas necróticas se fusionaban formando macro lesiones necróticas, angulosas al limitarse por la nervadura de la hoja.

#### **1.4.8 Especies del género *Thielaviopsis* (Went).**

Según Index Fungorum (2018), las especies de este género, corresponden a hongos de la familia Ceratocystidaceae, de la División Ascomycota.

La especie de *T. paradoxa* y su teleomorfo *Ceratocystis paradoxa*, son agentes causales de infecciones en las especies de Arecáceas, *P. canariensis*, *P. dactylifera* y Caña de azúcar. La sintomatología que presenta en dichas especies es similar. Generalmente esta enfermedad es considerada poco importante debido a que sólo afecta a plantas debilitadas, en las que puede generar síntomas severos como: escaldado o quemadura de hojas, podredumbre de inflorescencias, corazón, estípites y de la yema terminal, posterior a esto la planta muere. La expresión de los síntomas suele acelerarse cuando las condiciones de elevada humedad relativa y temperatura moderada se presentan (Rodríguez y Rodríguez, 2010).

Chase y Broschat (1993), indican que la infección en las hojas parte de la base de las mismas o a lo largo de ellas, con lesiones irregulares de color marrón a negras, debido a la abundante producción de clamidosporas del hongo. Las hojas nuevas tienden a deformarse.

Garofalo y McMillan (2004), reportaron 23 especies de Arecáceas como susceptibles a *T. paradoxa*, indicando que los brotes enfermos se encuentran asociados a estrés ambiental y con el daño mecánico del tronco, siendo las heridas su principal vía de ingreso a la planta.

## **1.5 METODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES EN PALMERAS ORNAMENTALES Y TIPO PALMERAS.**

### **1.5.1 Diagnóstico por observación de síntomas.**

El diagnóstico por síntomas es el primer acercamiento a la determinación del agente causal de una infección. Éstos, nos entregarán información sobre el tejido vegetal que debe ser analizado en laboratorio y a su vez en que órgano/s está/n repercutiendo la infección. El diagnóstico en campo debe ir de la mano con el diagnóstico en laboratorio, de esta forma, se evitan los falsos positivos, que son muy comunes en enfermedades de palmeras, sobre todo cuando se muestrea el tejido vegetal incorrecto o una planta con síntomas avanzados (Elliott y Broschat, 2017).

En algunas palmeras, no se observarán síntomas hasta cuando la infección se encuentre avanzada, perdiendo años de cría en plantas de crecimiento lento, por lo que la prevención de infecciones toma importancia junto con un diagnóstico certero.

Arango y col. (2012), indican que en el diagnóstico de hojas de palmera, se deben observar desde las hojas viejas a las nuevas y si existe presencia de bronceado, necrosis o clorosis. En el caso del tallo, observar grietas de la madera a distintas alturas y buscar tejido blanco o podrido. En raíces, observar pigmentaciones rojizas a marrones, las que contrastan fácilmente con las raíces sanas de la planta.

### **1.5.2 Diagnóstico por técnicas moleculares.**

Riley y col. (2002), indican que actualmente se desarrollan con frecuencia en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades, pruebas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la que busca detectar organismos específicamente según su secuencia de DNA. Este tipo de procedimientos requiere de equipos de laboratorio y material especializado. Para dicho análisis es necesario obtener micelio del hongo a identificar, por lo que ésta metodología cobra importancia a la hora de realizar diagnosis de patógenos que no se pueden cultivar en medios *in vitro*.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades de los cultivos en general, representan un problema importante que los agricultores deben solucionar si quieren resguardar el patrimonio fitosanitario de su unidad productiva. En los viveros de plantas ornamentales, este problema toma mayor relevancia, ya que patologías que afecten las hojas o incluso problemas fúngicos en raíces, repercutirán sobre la parte aérea de la planta, disminuyendo de inmediato el valor ornamental de dichos cultivos, el cual es el principal propósito de su producción.

Es por esto que el diagnóstico temprano toma gran relevancia en los viveros de plantas ornamentales, considerando que en el caso de las plantas de palmera y tipo palmera, el crecimiento es lento y el costo de producción es elevado, pudiendo perderse años de trabajo y dinero en una planta que puede ver alterado su valor ornamental y económico a causa de una infección fúngica.

Por lo anteriormente descrito, se plantearon como objetivos de este Trabajo Fin de Máster, los siguientes:

### **Objetivo general:**

Diagnosticar enfermedades de etiología fúngica, en plantas de palmera y tipo palmera de uso ornamental.

### **Objetivo específico:**

Proponer medidas de manejo de las infecciones diagnosticadas, enmarcándose en el Manejo Integrado de Enfermedades (MIE).

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 RECEPCIÓN DE MUESTRAS SINTOMÁTICAS EN LABORATORIO.

Se recibieron en el Laboratorio de Patología Vegetal, perteneciente al Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Universitat Politècnica de València, doce muestras de plantas de palmera y tipo palmera de uso ornamental, provenientes de un vivero de plantas ornamentales ubicado en la Comunidad Valenciana.

Las muestras fueron analizadas escalonadamente mientras fueron llegando desde el vivero hasta el Laboratorio (Tabla 1).

**Tabla 1.** Muestras recibidas en el Laboratorio de Patología Vegetal, de la Universitat Politècnica de València

| FECHA        | MUESTRA | ESPECIE VEGETAL                               | FAM. BOTANICA |
|--------------|---------|---|---------------|
| 14 dic. 2017 | 3384    | <i>Chamaerops humilis</i> var. <i>Vulcano</i> | Areaceae      |
|              | 3385    | <i>C. humilis</i> var. <i>vulcano</i>         | Areaceae      |
|              | 3386    | <i>C. humilis</i> var. <i>vulcano</i>         | Areaceae      |
| 28 feb. 2018 | 3390    | <i>C. humilis</i> var. <i>vulcano</i>         | Areaceae      |
|              | 3391    | <i>C. humilis</i> var. <i>vulcano</i>         | Areaceae      |
|              | 3392    | <i>C. humilis</i> var. <i>vulcano</i>         | Areaceae      |
|              | 3393    | <i>C. humilis</i> var. <i>vulcano</i>         | Areaceae      |
|              | 3394    | <i>Yucca rostrata</i>                         | Asparagaceae  |
| 15 mar.2018  | 3396    | <i>Cycas revoluta</i>                         | Cycadaceae    |
|              | 3397    | <i>C. revoluta</i>                            | Cycadaceae    |
| 11 jun. 2018 | 3445    | <i>Syagrus romanzoffiana</i>                  | Areaceae      |

Las muestras analizadas presentaban síntomas de posibles infecciones causadas por microorganismos, en diversos órganos de la planta como tallos o estípites, raíces, hojas y peciolo, apareciendo con mayor frecuencia las manchas necróticas en las hojas y lesiones necróticas en las raíces principales y secundarias.

### 3.1.1 Sintomatología del material vegetal.

Las muestras analizadas presentaron variados síntomas en diferentes órganos vegetales, expuestos en la Figura 3 y descritos a continuación.



**FIGURA 3.** Sintomatología presente en plantas de palmera y tipo palmera de uso ornamental, a diagnosticar. Código de muestra se indica a pie de cada fotografía.

Muestra N° 3384, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta en maceta, que presenta en base del estípite una zona despoblada de raíces gruesas y de anclaje, provocando menor arraigamiento de la planta al sustrato. La planta presenta abundante producción de raíces finas en zonas periféricas de la raíz. Presencia de lesión necrótica en zona media del estípite de la planta. Raíces secundarias presentan lesiones necróticas en zonas medias, sin llegar a los ápices radicales.

Muestra N° 3385, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta en maceta, que presenta en base del estípite una zona despoblada de raíces gruesas y de anclaje, provocando menor arraigamiento de la planta al sustrato. La planta presenta abundante producción de raíces finas en zonas periféricas de la raíz. Lesiones foliares cercanas al peciolo.

Muestra N° 3386, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta en maceta, que presenta en base del estípite una zona despoblada de raíces gruesas y de anclaje, provocando menor arraigamiento de la planta al sustrato. Necrosis en raíces principales en zona del cuello de la planta. Manchas necróticas con halo clorótico en hojas basales.

Muestra N° 3390, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta con algunas hojas completamente secas.

Muestra N° 3391, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta que presenta muchas hojas con la totalidad de su superficie cubierta de pequeñas manchas marrón-violáceas. En zonas distales de la hoja, las manchas presentan un halo clorótico que se limita a la nervadura de la hoja. Cuando la mancha necrótica crece, pasa de forma redonda a forma angular. Base de la hoja con manchas necróticas de forma estriada, a lo largo del pliegue de la hoja.

Muestra N° 3392, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta con lesiones necróticas concentradas en la base de los folíolos y en peciolo. Las manchas son de color claro a oscuro en los bordes y presentan un halo clorótico delgado que coalesce con los demás. Mancha necrótica inicialmente delimitada por la nervadura de la hoja.

Muestra N° 3393, Especie *C. humilis* var. *vulcano*: planta con lesiones necróticas estriadas en hojas que aún no se han expandido en su totalidad.

Muestra N° 3394, Especie *Y. rostrata*: planta cuyas hojas se encuentran con marchitez en expansión desde la zona distal a la proximal de la hoja. Se observan tres zonas: una marchita de color claro, una clorótica y una sana. En zona seca se observan bandas o rayas longitudinales de color marrón.

Muestra N° 3396, Especie *C. revoluta*: planta cuyas hojas se encuentran con foliolos completamente secos, distribuidos de forma aleatoria, tanto en el lado izquierdo como derecho de la hoja. El resto de los foliolos se encuentran con color verde intenso, incluso los adyacentes a los foliolos secos.

Muestra N° 3397, Especie *C. revoluta*: planta que presenta todos los foliolos de las hojas con desecación desde el extremo distal al proximal. En cada foliolo se diferencian cuatro zonas, partiendo desde un extremo seco, siguiendo con una zona en proceso de necrosis, seguido de una zona clorótica (en proceso de marchitamiento) y una zona sana de color verde intenso.

Muestra N° 3398, Especie *C. revoluta*: planta que presenta algunas hojas con todos los foliolos encrespados hacia el interior de los mismos, cuyos extremos distales presentan marchitez. La planta presenta una hendidura en el tronco, acusando una lesión necrótica progresiva y profunda, en dirección transversal en el tallo. Al aserrar la lesión, esta presenta un color rosado pálido y abundante producción de exudados inodoros y de dudosa procedencia.

Muestra N° 3445, Especie *S. romanzoffiana*: planta que se troncha en el vivero a una altura media del estípite, por lesión necrótica. Cortes transversales al estípite acusan una lesión profunda, concentrada en la zona central del estípite, sin llegar a los bordes del cilindro. En la zona central y de mayor edad de la lesión, fibras de madera comienzan a degradarse fuertemente, cambiando de color marrón a negro. En corte longitudinal del estípite se pueden observar fibras de madera completamente necrosadas, otras en vías de necrosarse y otras completamente sanas. La planta no presenta síntomas en zona radical ni en follaje.

### **3.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.**

Las muestras vegetales fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Vegetal, del Departamento de Ecosistemas Agroforestales, en donde se lavaron con agua de grifo a presión, para eliminar restos de suelo en raíces y excesos de fungicidas cúpricos en hojas. Posterior a esto se identificaron los órganos vegetales a analizar según sintomatología descrita en el punto anterior y se separaron las partes aéreas de las subterráneas. En aquellas muestras donde las infecciones se localizaron en el tronco o el estípite (donde existe una zona lignificada), éstas fueron trozadas con sierra metálica en dirección transversal y longitudinal a la lesión.

Para el caso de las muestras en donde la sintomatología se encontraba en la zona radical, se tomó tejido vegetal de raíces finas y gruesas que presentaban necrosis en zona proximal y apical.

En el caso de las muestras sintomáticas en hojas, se lavaron cuidadosamente procurando no eliminar signos correspondientes a estructuras reproductivas sexuales o asexuales presentes en el tejido vegetal.

### **3.2.1 Desinfección de tejido vegetal.**

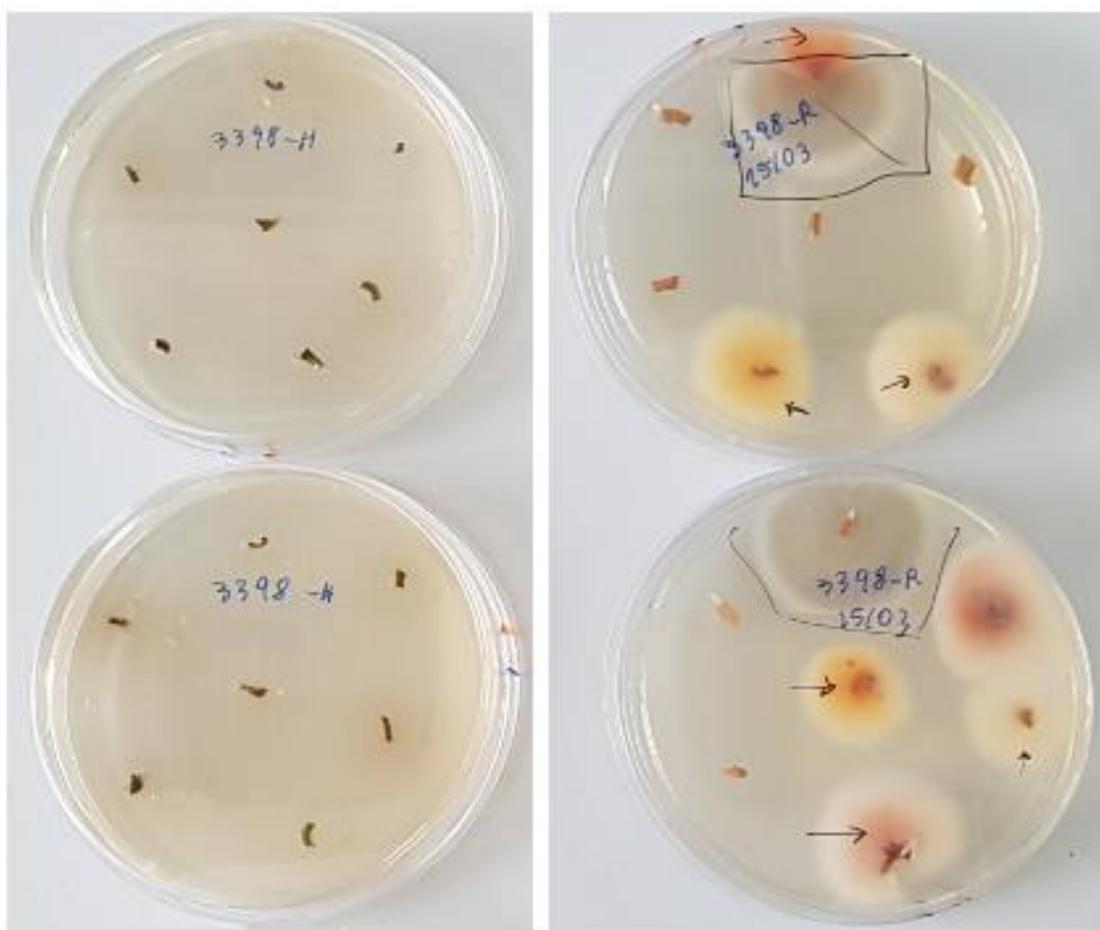
Con la finalidad de eliminar posibles contaminantes ubicados en la superficie del tejido vegetal a analizar, ya sean esporas de hongos o bacterias cosmopolitas, se utilizaron dos métodos de desinfección de la superficie externa del tejido vegetal, con hipoclorito de sodio (NaClO) al 4% y alcohol etílico al 70%.

La desinfección con NaClO se utilizó para muestras de tejido verde y radical, es decir, hojas, tallos y raíces. El método consistió en hacer una dilución de 0,25 L de NaClO al 4% con 0,75 L de agua destilada estéril. Cada muestra analizada, se sumergió por un tiempo variable entre tres y cinco minutos (dependiendo de la consistencia del tejido) en dicha solución, acabado el tiempo, se retiró el tejido de la solución y se pasó en dos ocasiones por agua destilada estéril, dos minutos más, para retirar excesos del desinfectante.

La desinfección con alcohol etílico al 70%, se utilizó para muestras de tejido vegetal lignificado, es decir, partes de troncos o estípites, los cuales tienen una elevada capacidad de absorber agua, por lo que si se desinfecta con NaClO, se arriesga a absorber mayor cantidad de desinfectante, afectando a los microorganismos internos de la muestra, los que son el objetivo de este estudio. El método consistió en sumergir la muestra durante un segundo en alcohol etílico al 70% y flamearla hasta consumir el combustible.

### **3.2.2 Siembra de tejido vegetal en medio de cultivo fúngico y aislamiento en cultivo puro.**

Posterior a la desinfección, se sembraron en tres medios de cultivo deferentes, pequeños fragmentos de tejido vegetal en la placa Petri (Figura 4), para luego ser incubadas en estufa a 26 °C +/- 1 °C, por 7 días. El crecimiento fúngico fue monitoreado desde el segundo día, por la presencia de algunos hongos con rápido crecimiento micelial que pudieran obstaculizar el crecimiento de los demás puntos.



**FIGURA 4.** Siembra de tejido vegetal en medios de cultivo para crecimiento fúngico, antes de incubación (izquierda) y posterior a incubación en estufa (derecha).

Los medios utilizados para el aislamiento de hongos desde el material vegetal y posterior repique en cultivo puro, fueron PDAS, PDA, PARPBH y SNA.

El medio PDAS es utilizado para crecimiento de cualquier hongo no obligado, que afecte a vegetales, inhibiendo la aparición de bacterias sensible a la estreptomycin, con la adición de dicho antibiótico. Se preparó con 39 g de Agar Patata Dextrosa (PDA) Biokar Diagnostics, por litro de agua destilada, se esterilizó por 15 minutos a 121°C en autoclave. Una vez tibio, se agregó 0,75 g de estreptomycin. Finalmente se dispuso en placas Petri para su solidificación y utilización. El medio PDA se preparó de la misma forma, pero sin la adición de estreptomycin.

El medio PARPBH es utilizado para el crecimiento de oomicetos. Se preparó con 17 g de CMA (Agar de Harina de Maíz) por 1 L de agua destilada y se esterilizó por 15 minutos a 121°C en autoclave. Una vez tibio, se agregó 0,4 g de pimaricina,

0,125 g de ampicilina, 0,01 g de rifampicina, 0,02 g de benomilo, 0,101 g de pentacloronitrobenzoceno y 0,069 g de himexazol. Finalmente se dispuso en placas Petri para su solidificación y utilización (Pérez y col., 2012).

El medio SNA (Synthetischer Nährstoffärmer Agar) es utilizado para observar esporulación en especies del género *Fusarium*, pudiendo crecer variados hongos en él. Se preparó con 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{KNO}_3$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de KCl, 0,2 g de glucosa, 0,2 g de sacarosa, 0,6 ml de NaOH 1N y 1 L de agua destilada. Se disolvieron todos los ingredientes y se ajustó el pH a 6-6,5. Luego se agregó 23 g de agar y se esterilizó por 15 minutos a 121°C en autoclave. Se dejó enfriar y se dispuso en placas Petri para su solidificación. Finalmente a cada placa Petri se agregaron dos rectángulos de papel filtro estéril (2x3 cm) sobre el agar (Nirenberg y O'Donnell, 1998).

Una vez incubadas las placas Petri con fragmentos de tejido vegetal infectado, se repicó el crecimiento micelial presente, en placas con medio PDA, para su aislamiento en cultivo puro, incubándose en estufa a 26 °C +/- 1 °C, por 5 días, para lograr obtener micelio suficiente que permitiera realizar las observaciones microscópicas y el análisis molecular.

### **3.2.3 Obtención de cultivos monospóricos.**

El cultivo monospórico es aquel que se desarrolla a partir de una única Unidad Formadora de Colonia (UFC), el cual busca generar un cultivo puro, es decir, con pureza genética.

En aquellos casos en que los organismos aislados correspondieran a *Fusarium* spp. e *Ilyonectria* spp. (identificados microscópicamente), se realizaron cultivos monospóricos. Algunas especies de estos géneros son patogénicas en raíces de palmeras de uso ornamental y su aparición o aislamiento es poco recurrente, por lo que su diagnóstico toma relevancia.

Para su realización se tomó un disco de micelio crecido en medio PDA con micelio de cada aislado de *Fusarium* spp. e *Ilyonectria* spp., se introdujo en un tubo Eppendorf con 1 mL de agua destilada estéril y se agitó en un vórtex para desprender las esporas del medio. Luego se extrajeron 100 µL de dicho tubo y se agregan a otro tubo Eppendorf con 1 ml de agua destilada estéril, luego se pasó por vórtex nuevamente. Esta operación se repite cinco veces hasta. Posteriormente se tomó 1 mL de las últimas tres diluciones y se sembraron en placas Petri con medio PDAS, respectivamente. Posteriormente las placas sembradas fueron dispuestas en la

cámara de flujo laminar para que se evapore una parte del agua agregada. Finalmente las placas fueron incubadas en estufa a 26 °C +/- 1 °C, por 2 a 3 días. Finalizado este periodo, se revisaron las placas y con ayuda de un bisturí, se extrajo una colonia aislada de cada muestra analizada y se repicó en medio PDA, de esta forma se garantiza que el cultivo obtenido corresponde al crecimiento de un solo organismo. Las nuevas placas fueron incubadas en estufa a 26 °C +/- 1 °C, por 4 días para su crecimiento.

### **3.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS AISLADOS.**

Se caracterizaron e identificaron morfológicamente algunos hongos aislados del tejido vegetal sintomático por medio de observación del patrón de crecimiento de la colonia en cultivo puro en PDA, incubado a 26°C +/- 1 °C, por 5 días, en donde se caracterizó coloración de colonia, presencia de esporulación, producción de exudados, etc. Para ello se realizaron preparaciones del tejido fúngico y se observaron al microscopio óptico.

La identificación de géneros se realizó por medio de las claves de reconocimiento de hongos de Barnett y Hunter (2006) y se registraron en fotografías las principales estructuras producidas.

### **3.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS.**

La identificación molecular de los aislados de hongos provenientes de tejido vegetal sintomático, se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa (PCR). Este procedimiento busca sintetizar *in vitro* grandes cantidades de DNA de una región concreta del genoma de la muestra, para luego secuenciarla y compararla con las depositadas en la base de datos de secuencias del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos. Los pasos para la identificación se describen a continuación.

#### **3.4.1 Extracción de DNA.**

Para iniciar el proceso de PCR, es necesario obtener DNA genómico de la muestra fúngica a analizar. Por lo anterior, se realizó una extracción rápida de DNA, donde se tomó una pequeña fracción del micelio de cada hongo a analizar con una

punta plástica de micropipeta, desde las placas Petri con cultivo puro. La muestra de micelio se introdujo en tubo de PCR con 20 µL de NaOH 25mM, pH 12. Posteriormente se introdujo en el termociclador programado que calentó la muestra hasta 100°C por 15 minutos y se enfrió a 4°C por cinco minutos. A continuación se agregó 40 µL de Tris-HCl 40mM a pH 5, para frenar el proceso de lisis celular. Este proceso corresponde a una lisis alcalina que se encarga de romper el micelio del hongo y desnaturalizar proteínas con acción endonucleasa, que puedan afectar a la reacción.

### 3.4.2 Selección de cebadores universales.

Para la identificación de los hongos aislados, se empleó cebadores universales que amplifican distintas regiones del DNA (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cebadores universales utilizados en las reacciones de PCR, para identificación de hongos aislados.

| REGIÓN GÉNICA | NOMBRE  | SECUENCIA 5'- 3'       | REFERENCIA             |
|---------------|---------|------------------------|------------------------|
| EF            | TEF-1α  | ATGGGTAAGGAGGACAAGAC   | Cong y col. (2016)     |
|               | TEF 2   | GGAAGTACCAGTGATCATGTT  |                        |
| Histona H3    | CyIH3F  | AGGTCCACTGGTGGCAAG     | Crous y col. (2004)    |
|               | CyIH3R  | AGCTGGATGTCCTTGGACTG   |                        |
| ITS           | ITS4    | TCCTCCGCTTATTGATATGC   | White y col. (1990)    |
|               | ITS1F   | CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA | Gardes y Bruns (1993)  |
| β-Tub 2       | BT CadF | *MATGCGTGAAATYGTAAAGT  | Travadon y col. (2015) |
|               | BT CadR | TCAGCACCCCTCAGTGTAATG  |                        |

\*M: A o C (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada IUPAC)

EF: Factor de elongación de *Fusarium*.

Histona H3: Histona.

ITS: Espaciador Transcrito Interno del DNA ribosómico.

β-Tub 2: Gen de la β-Tubulina.

### 3.4.3 Amplificación de DNA y electroforesis en gel de agarosa.

Para la PCR, se prepararon los reactivos según la región del DNA a amplificar, detallados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Mezcla de PCR por reacción.

| REACTIVOS                     | CONCENT.<br>STOCK | CONCENT.<br>FINAL | VOLUMEN<br>FINAL (µL) |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Agua                          | -                 | -                 | 13,3                  |
| Canvax Buffer B (x)           | 10                | 1                 | 2,5                   |
| Canvax MgCl <sub>2</sub> (mM) | 25                | 2,5               | 2,5                   |
| Canvax dNTPs (mM)             | 8                 | 0,8               | 2,5                   |
| Canvax Horse Power Taq (U/µL) | 5                 | 1                 | 0,2                   |
| Cebador 1*                    | 10                | 0,4               | 1                     |
| Cebador 2*                    | 10                | 0,4               | 1                     |
| DNA genómico                  | -                 | -                 | 2                     |
| Total                         | -                 | -                 | 25                    |

\*Pareja de cebadores varía según región a amplificar. Detalles en Tabla 2.

Para la amplificación del DNA, se utilizó un termociclador PTC 200 MJ Research. Los programas de amplificación se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Programas para la amplificación de DNA, según región a analizar.

| ETAPA                     | REGIÓN      |        |            |        |               |        |        |
|---------------------------|-------------|--------|------------|--------|---------------|--------|--------|
|                           | Fac. elong. |        | Histona H3 |        | ITS y β-Tub 2 |        | Ciclos |
|                           | °C          | Tiempo | °C         | Tiempo | °C            | Tiempo |        |
| Desnaturalización inicial | 94          | 3 min  | 94         | 2 min  | 94            | 3 min  | 1      |
| Desnaturalización         | 94          | 30 seg | 94         | 30 seg | 94            | 30 seg |        |
| Anillamiento              | 62          | 30 seg | 60         | 30 seg | 55            | 30 seg | 35     |
| Extensión                 | 72          | 45 seg | 72         | 45 seg | 72            | 45 seg |        |
| Amplificación final       | 72          | 10 min | 72         | 10 min | 72            | 10 min | 1      |

Junto con las muestras de DNA a amplificar, también se añadió un tubo con DNA de *Cylindrocarpon* spp. actuando como control positivo de la reacción y un tubo sólo con los reactivos de PCR, sin adición de DNA genómico, actuando como control negativo.

Para comprobar si hubo amplificación, el producto obtenido luego de la PCR, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, el cual se preparó utilizando

agarosa al 1,5 % disuelta en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA, 40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) 1X. La mezcla se calentó en microondas de 600W por un minuto, hasta quedar completamente disuelta, finalmente se le agregó una solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe (20.000x). Dicha mezcla se volcó en el molde con un peine de 30 pocillos para su solidificación.

Paralelamente se prepararon las muestras con 5  $\mu$ L de producto PCR, 1  $\mu$ L de tampón de carga (10 mM Tris-HCl a 7,6 de pH), 0,03% de azul de bromofenol, 0,03% de xylencyanol FF, 60% glicerol y 60 mM EDTA).

Cuando el gel solidificó, se montó en la cubeta de electroforesis junto con el tampón TAE y se cargaron los pocillos con la mezcla del producto PCR y los demás reactivos mencionados anteriormente. Para identificar el tamaño de las bandas, se cargó en el primer pocillo del gel, un marcador molecular (GeneRuler<sup>T.M.</sup> 100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

La electroforesis se realizó a 140 V y se dejó hasta que el frente de avance llegó a las 3/4 partes del largo total del gel. La presencia de las bandas se observó con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó una banda y negativo cuando no se presentó (Anexo 3).

#### **3.4.4 Secuenciación de DNA.**

Aquellas muestras que amplificaron correctamente (observadas en el gel de agarosa tras la electroforesis), fueron enviadas a secuenciar a la empresa Macrogen (Madrid, España), previamente preparadas con 5  $\mu$ L de producto PCR y 5  $\mu$ L de uno de los cebadores específicos, usados en la amplificación de la región del DNA correspondiente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

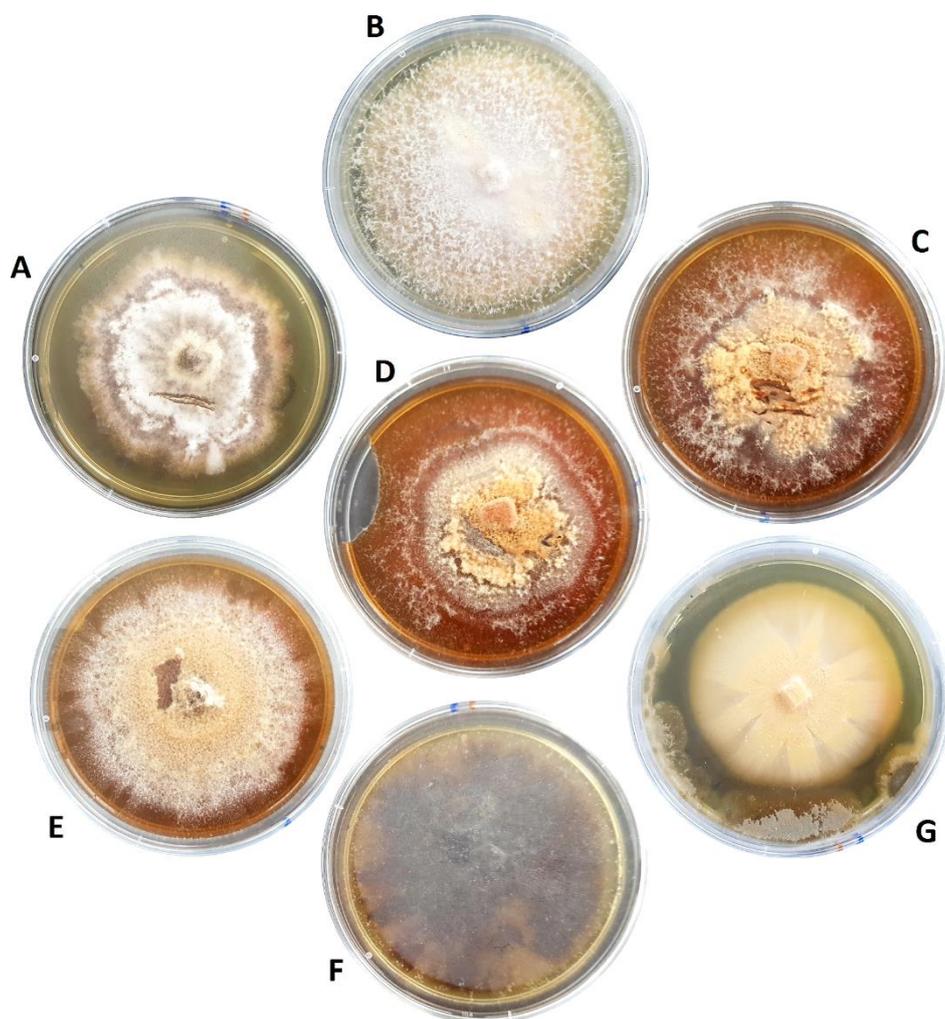
### 4.1 DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE *Chamaerops humilis*.

Las muestras analizadas de *C. humilis* corresponden a los códigos 3384, 3385, 3386, 3390, 3391, 3392 y 3393. En la muestra 3393 no se logró aislar microorganismos debido a que el viverista realizó un control con fungicidas una semana antes de enviar las muestras al laboratorio.

En el caso de la muestra **3384**, se aislaron e identificaron los hongos *Chaetomium globosum*, *F. oxysporum*, *Ilyonectria capensis*, *I. liligena*, *I. liriodendri*, *Pestalotiopsis* sp. y *Xenoacromonium* sp. (Figura 5, Anexo 1 y 2-B). Al relacionar la sintomatología presente con los organismos identificados, se determinó que los posibles agentes causales de dicha infección son el complejo patogénico formado por *I. capensis*, *I. liligena* e *I. liriodendri*.

Los síntomas presentados como la podredumbre seca del estípote, con una lesión profunda y de color marrón, se corresponden con los síntomas de infecciones descritos por Aiello y col. (2014), ocasionados por otra especie del género *Ilyonectria*, afectando a variadas plantas de la familia Arecaceae. Junto con lo anterior, el necrosamiento de raíces presentado en la planta, coincide con los síntomas descritos por Chaverri y col. (2011).

Actualmente no existe registro de *I. liligena* afectando a esta especie en España, por lo que este hallazgo representaría el primer reporte de dicho patógeno afectando a *C. humilis*. Estos resultados se deben comprobar con pruebas de patogenicidad, las cuales no se realizaron por escaparse del tiempo de realización de esta investigación. Junto con estos patógenos, desde la lesión fue aislado otro hongo descrito como patógeno para este hospedero, *Pestalotiopsis* sp. Este resultado no concuerda con lo planteado por Khey y col., 2013, ya que generalmente infecciones por este hongo se encuentran asociados a manchas foliares en palmeras, pero no a pudriciones de estípote ni radicales, aunque en otros cultivos de ornamentales como el *Rhododendron* sp. se ha encontrado a *Pestalotiopsis* sp. generando pudriciones radicales (Hopkins y McQuilken, 2000).

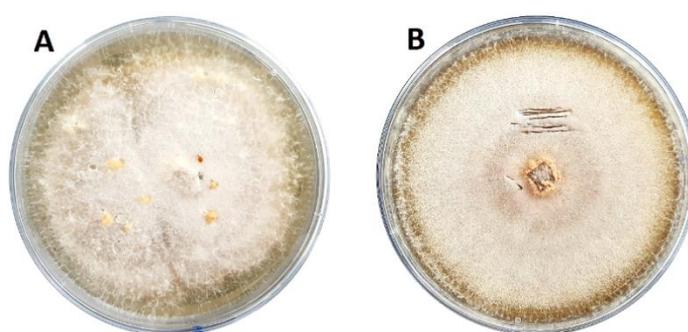


**FIGURA 5.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3384 de *C. humilis*. (A) *Chaetomium globosum*, (B) *Fusarium oxysporum*, (C) *Ilyonectria capensis*, (D) *I. liligena*, (E) *I. liriodendri*, (F) *Pestalotiopsis* sp. y (G) *Xenoacromonium* sp.

Con respecto a la presencia de *F. oxysporum*, no se puede afirmar que corresponda a un aislado patógeno, considerando que no se hicieron pruebas de patogenicidad y los síntomas presentes no se asocian a infecciones causadas por este hongo. Junto con lo anterior, Garcés y col. (2001) indican que este hongo es un habitante común del suelo y que su aislamiento desde raíces es frecuente. A pesar de lo anterior, existen formas especiales (f. sp.) de este hongo que son patógenas de algunos cultivos, como por ejemplo *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* en *Phoenix dactylifera* (Benzohra y col. 2015) y *F. oxysporum* f. sp. *palmarum* en *Phoenix canariensis* (Elliott y col. 2010).

Con respecto a *Chaetomium globosum*, se descartó como integrante del complejo infeccioso, al ser considerado saprofito (Piontelli, 2011). Con respecto a *Xenoacremonium* sp., la literatura no describe relación de patogenicidad con cultivos.

En el caso de la muestra **3385**, se aislaron e identificaron los hongos *F. oxysporum* y *F. solani* (Figura 6 y Anexo 1). Desde las lesiones foliares no fue posible aislar microorganismos, al no haber crecimiento fúngico en dichas placas con medio PDA, lo que indica la inactividad del posible agente causal de las manchas necróticas o una posible fitotoxicidad por exceso de fungicidas.

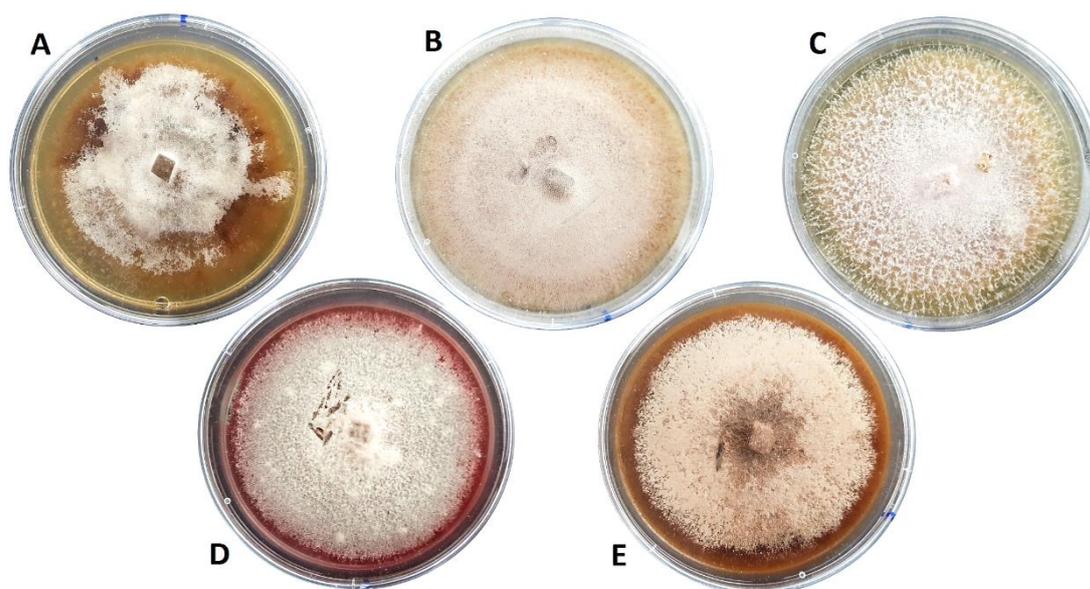


**FIGURA 6.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3385 de *C. humilis*. (A) *Fusarium oxysporum* y (B) *F. solani*.

Según lo anterior, no es posible establecer el agente causal de dicha sintomatología, debido a no saber si estas especies son patogénicas o no. Sumado a esto, los síntomas observados en la muestra, no coinciden con los producidos por las especies patogénicas de *F. oxysporum* y *F. solani*, además, como se dijo anteriormente, Garcés y col. (2001) indican que al ser organismos comunes del suelo son aislados frecuentemente, pero no necesariamente generando infecciones.

Al culminar este análisis, la posible causalidad del problema podría ser una alternación fisiológica, ocasionada por un exceso de fertilización nitrogenada en la zona del cuello de la planta, la cual ha provocado un despoblamiento de las raíces adyacentes a esta zona, generando una menor adherencia de la planta al sustrato. La Sociedad Química y Minera de Chile (2001) indica que un exceso en la dosis de fertilización nitrogenada en forma de urea, puede producir quemadura de raíces, sobre todo si ésta es aplicada muy cercana al cuello de la planta. Por esta razón, la planta produce abundantes raíces finas en la zona periférica, para que estas suplan la falta de arraigamiento al sustrato.

En el caso de la muestra **3386**, al presentar sintomatología foliar y radical, se aislaron e identificaron hongos de ambas zonas con problemas. Desde la zona foliar, se identificó *Colletotrichum siamense* y *Colletotrichum* sp. Desde la zona radical se identificó a *F. oxysporum* y *Zopfiella latipes*. Por otro lado existe un individuo aislado el cual no fue posible identificarlo con amplificación de la región ITS, por lo que se le denominó Ascomiceto no identificado (Figura 7 y Anexo 1).



**FIGURA 7.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3386 de *C. humilis*. (A) *Colletotrichum siamense*, (B) *Colletotrichum* sp., (C) *Fusarium oxysporum*, (D) Ascomiceto no identificado y (E) *Zopfiella latipes*.

Al relacionar la sintomatología foliar presente con los organismos identificados, se determinó que los posibles agentes causales de dicha infección son *C. siamense* y *Colletotrichum* sp., causando la enfermedad llamada Antracnosis. Si bien en el caso de estos hongos, ocurre lo mismo que con las especies de *Fusarium*, es decir, existen especies que son saprofitas y otras parasíticas, puntualmente la especie *C. siamense* ha sido descrita como patogénica en el cultivo de la cebolla junto con *C. truncatum* (Chowdappa y col. 2015) y en *Coffea arabiga* (Prihastuti y col. 2009), por lo que se podría pensar que podría tener más hospederos, al afectar a plantas de familias distintas, dándole un carácter polífago. Esta hipótesis habría que confirmarla con pruebas de patogenicidad.

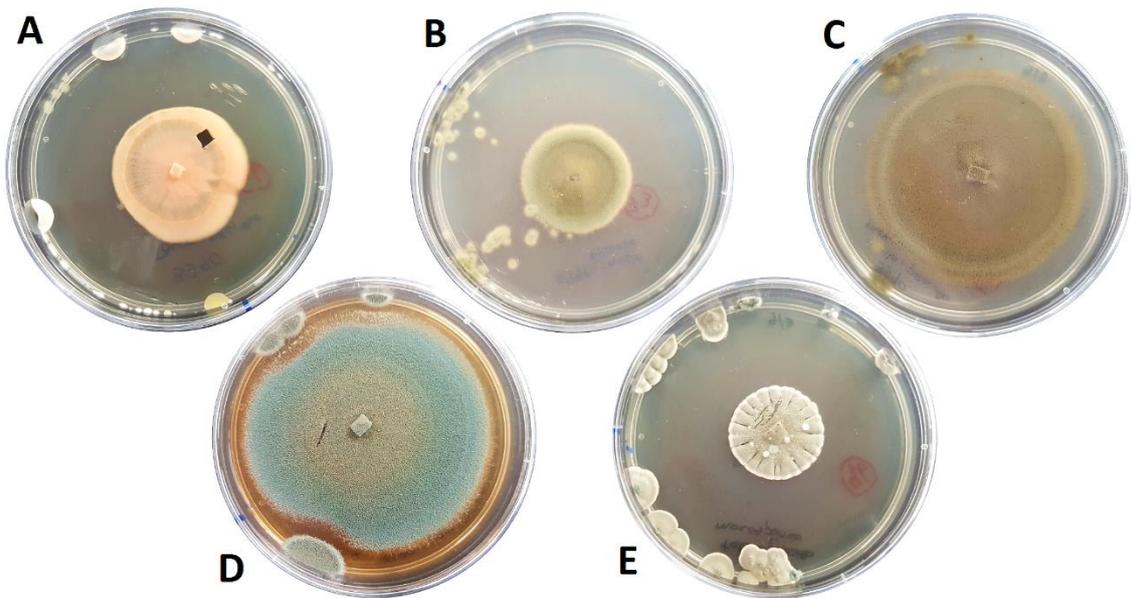
Un resultado similar es el que reporta Elmhirst (2017), indicando casos de antracnosis en *C. humilis*, causados por la especie *C. gloeosporioides* en Canadá. Actualmente en la región mediterránea no existen reportes de *C. siamense* ocasionando antracnosis en la palmera mediterránea, por lo que éste podría ser el primer reporte de esta especie en este hospedero.

Con respecto al diagnóstico del área radical, no existe coincidencia entre la sintomatología presentada y los organismos aislados, ya que *F. oxysporum* corresponde a un patógeno vascular, generando otro tipo de sintomatología. Sumado a lo anterior y como se ha mencionado en varias ocasiones en este texto, la macroespecie *F. oxysporum* posee individuos saprofitos y formas especiales patogénicas, por lo que para identificarlas es necesario realizar pruebas de patogenicidad.

Finalmente, el hongo *Zopfiella latipes* aislado de esta muestra, Guarro y col. (1997) indican que especies de dicho género se encuentran en material vegetal en descomposición, por lo que es considerado un hongo saprófito presente en el suelo. Abdel-Aziz (2016) y Manimohan y col. (2011) indican que *Z. latipes* corresponde a un hongo acuático y comúnmente es aislado desde cauces de río.

En el caso de la muestra **3390**, se aislaron e identificaron los hongos *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium macrocarpum*, *Cladosporium* sp., *Penicillium polonicum* y *Penicillium* sp. (Figura 8, Anexo 1 y 2-A). Al relacionar la sintomatología presente con los organismos identificados, no es posible establecer un agente causal. La muestra recepcionada venía con sintomatología muy avanzada, por lo que la posibilidad de aislar un posible patógeno causante de la infección primaria era remota, incluso si se siembra en medio PDA tejido vegetal de la zona de avance de la infección (que en este caso correspondió a segmentos de peciolo de la hoja).

Las especies aisladas de *Penicillium* y *Cladosporium*, corresponden a hongos del orden Eurotiales, caracterizados por producir gran cantidad de conidias sobre fiálides, capacidad que les da la posibilidad de colonizar variados sitios actuando como hongos saprofitos (Piontelli, 2011). Con respecto a *Aureobasidium pullulans*, es un hongo que se puede encontrar en diferentes ambientes, de forma epífita o endófito en plantas, en el suelo o en el agua. Cuando se desarrolla en plantas no genera síntomas de enfermedades (Andrews y col., 2002), incluso tiene un papel beneficioso al usarse como agente de control biológico de variadas enfermedades de postcosecha, como los reportados por Ferreira-Pinto y col. (2006) y Zhang y col. (2012).



**FIGURA 8.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3390 de *C. humilis*. (A) *Aureobasidium pullulans*, (B) *Cladosporium macrocarpum*, (C) *Cladosporium* sp., (D) *Penicillium polonicum* y (E) *Penicillium* sp.

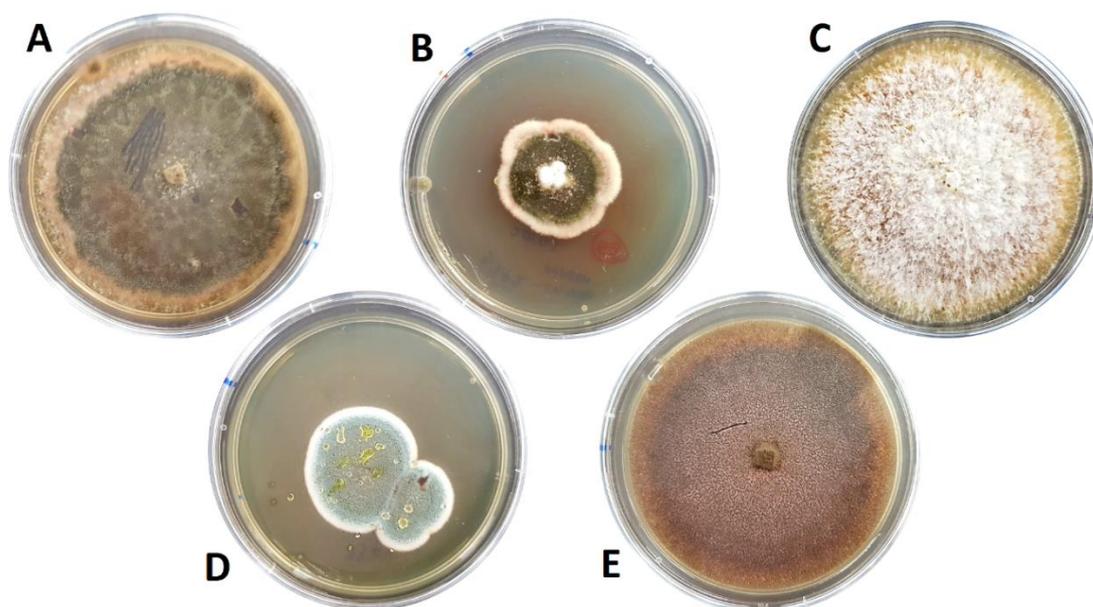
Para el caso de la muestra **3391**, se identificó el hongo *Alternaria infectoria* (Figura 9, Anexo 1). Este hongo produce un micelio blanco, contrastante con el verde oscuro de *A. alternata* (Andersen y Thrane, 1996). Al relacionar la sintomatología con el organismo identificado, se determinó que puede existir una relación patogénica. Si bien *A. infectoria* no es la especie comúnmente asociada a *C. humilis* causando alternariosis (De Corato y col., 2003), Perello y col. (2008) describen a *A. infectoria* como patogénica para trigo y considerando que Agrios (2005) describe al género como polífago, es una posibilidad pensar que esta especie sea patogénica para *C. humilis*.



**FIGURA 9.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3391 de *C. humilis*. *Alternaria infectoria*.

A pesar que los síntomas expuestos por la planta, se corresponden con los asociados a una típica alternariosis, la literatura consultada es ambigua en cuanto a la especie causante de esta enfermedad en palmeras, indicando en la mayoría de los casos solamente el género *Alternaria*, sin indicar especie, donde sólo en un caso se menciona concretamente *A. alternata* en *C. humilis* (De Corato y col., 2003), por lo que habría que comprobar el planteamiento de la infectividad de *A. infectoria* a *C. humilis*, con una prueba de patogenicidad.

En el caso de la muestra **3392**, se aislaron e identificaron los hongos *A. alternata*, *Alternaria* sp., *Diaporthe foeniculina*, *Penicillium* sp. y *Phoma* sp. (Figura 10, Anexo 1, 2-A y 2-C). Al relacionar la sintomatología presente con los organismos aislados e identificados, se determinó que el posible agente causal de dicha infección es *A. alternata*, debido a que los síntomas como las manchas necróticas presentes en la base de los foliolos se correlacionan con los causados por dicho patógeno. Estos resultados coinciden con los establecidos por De Corato y col. (2003) para el mismo hospedero. A su vez, este autor indica que la infección se inicia con una clorosis generalizada de las hojas en las que posteriormente aparecen pequeñas manchas necróticas que crecen con el tiempo, síntoma que se observó en la muestra analizada.

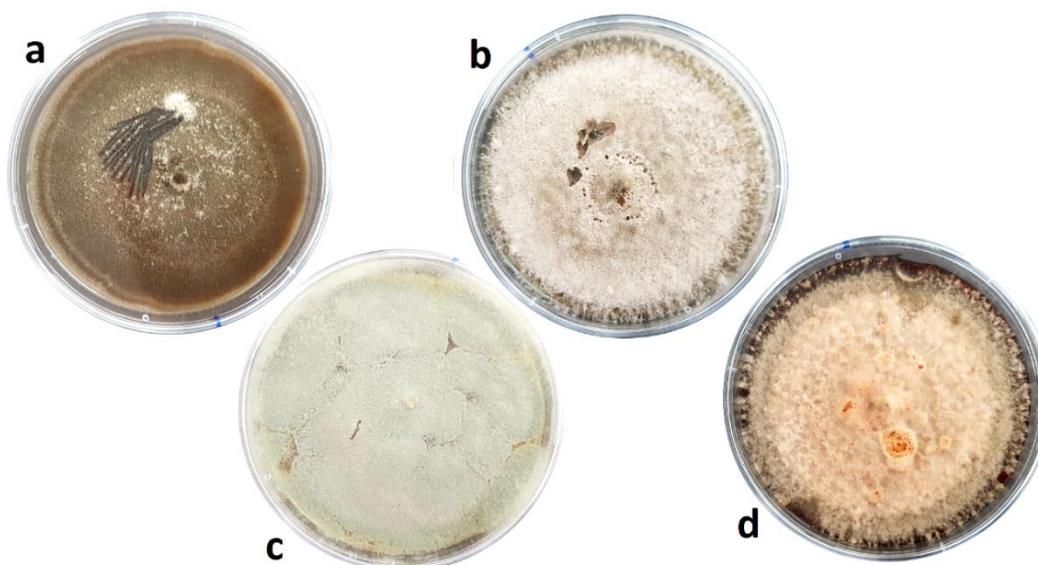


**FIGURA 10.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3392 de *C. humilis*. (A) *A. alternata*, (B) *Alternaria* sp., (C) *Diaporthe foeniculina*, (D) *Penicillium* sp. y (E) *Phoma* sp.

Con respecto a *D. foeniculina*, Gomes y col. (2013), indican que especies de este género son a menudo reportadas como patógenos, no patógenos, endófitos y saprófitos, por lo que no se puede establecer una relación infectiva con la información disponible. Sumado a lo anterior, si bien, existen especies del género *Diaporthe*, como *D. phoenicola* que han sido reportadas causando daño en palmeras (Abbas y col., 1991), los síntomas ocasionados en esta muestra no se relacionan con los reportados en los demás hospederos de la familia Arecaceae, los cuales son muerte de raíces y brote terminal. En el caso de *Phoma* sp., si bien la sintomatología podría ser asociada con infecciones causadas por este hongo, no se aisló de manera consistente (de todos los fragmentos de tejido vegetal sembrado, solo en uno creció), estos resultados coinciden con los reportados por El-Deeb y col. (2007) que indican que existe una baja frecuencia de aparición de este hongo en otra especie de palmera. En el caso de *Penicillium* sp. éste aparece como saprofito (Piontelli, 2011).

#### 4.2 DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE *Yucca rostrata*.

La muestra analizada de *Y. rostrata* corresponde al código **3394**. De dicha muestra se aislaron e identificaron los hongos *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Penicillium* sp. y *Stemphyllium* sp. (Figura 11, Anexo 1 y 2-A).



**FIGURA 11.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3394 de *Y. rostrata*. (A) *Alternaria alternata*, (B) *A. infectoria*, (C) *Penicillium* sp. y (D) *Stemphyllium* sp.

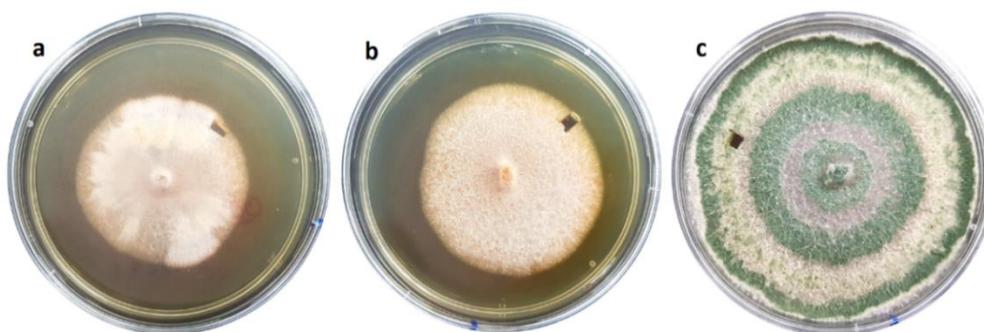
De los organismos aislados, *A. alternata*, *A. infectoria* y *Stemphyllium* sp., son capaces de generar infecciones en plantas, existiendo de igual forma poblaciones de *Alternaria* y de *Stemphyllium* que son saprofitas. En el caso de *Stemphyllium* sp., al no poder llegar a identificar la especie con la secuenciación de la región ITS (Anexo 1), no se puede afirmar con seguridad si corresponde a una especie patogénica o saprofita, teniendo que hacer pruebas de patogenicidad, escapándose del tiempo que abarca este estudio para su realización, por lo que en el diagnóstico de esta muestra no lo consideraremos.

Al relacionar la sintomatología presente con los organismos aislados e identificados, se determinó que el posible agente causal de dicha infección es un complejo patogénico entre *A. alternata* y *A. infectoria*, debido a que los síntomas presentados como bandas o rayas necróticas longitudinales se corresponden con los síntomas de infecciones avanzadas de alternariosis en otras especies de la familia Asparagaceae, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Gautam (2013). Sumado a lo anterior, Rocha (2012), indica que especies del género *Alternaria*, son de los pocos organismos capaces de detoxificar las grandes cantidades de saponinas que produce la yucca como mecanismo de defensa, invadiendo tejidos y generando infección. Con respecto al *Penicillium* sp. aislado, éste es considerado un contaminante, al ser un hongo que se encuentra comúnmente en las superficies vegetales, con carácter cosmopolita, sin generar infecciones (Piontelli, 2011).

#### **4.3 DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE *Cycas revoluta*.**

Las muestras analizadas de *C. revoluta* corresponden a los códigos 3396, 3397 y 3398. En las muestras 3396 y 3397 no se logró aislar microorganismos debido posiblemente a que el viverista realizó una aplicación con fungicidas antes de enviar las muestras al laboratorio. De la muestra **3398**, se aisló *F. oxysporum* y *F. solani* y *Trichoderma* sp. (Figura 12 Anexo 1 y Anexo 2-D). De los organismos aislados, Agrios (2005) describió actividad patogénica de las especies *F. oxysporum* y *F. solani*, afectando a distintos hospederos de variadas familias botánicas, siempre asociados a infecciones vasculares y pudriciones de cuello y raíces, respectivamente. Al relacionar la sintomatología presente con los organismos aislados e identificados, no es posible establecer un agente causal ya que tanto *F. oxysporum* como *F. solani*, son

macroespecies con formas especiales patogénicas y otras que no lo son. Para establecer una presunta responsabilidad de alguno de estos hongos en dicha lesión sería necesario hacer una prueba de patogenicidad y cumplir los postulados de Koch-Pasteur.



**FIGURA 12.** Hongos aislados en medio PDA, de la muestra 3398 de *C. revoluta*. (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *F. solani* y (C) *Trichoderma* sp.

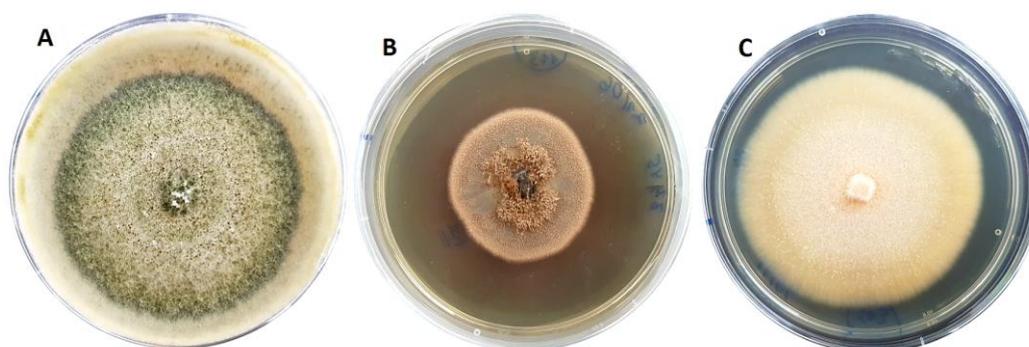
Si bien, con la información que se dispone no se puede establecer la causalidad de la enfermedad, en esta muestra, la pudrición necrótica parte en la zona media del tronco, desde la corteza hacia el interior, por lo que se puede pensar que el inicio de la infección se ocasionó por una herida causada en el trasplante o en la poda, generando una vía de acceso a microorganismos presentes en el sustrato. Teniendo en cuenta lo anterior, *F. solani*, es un patógeno ampliamente descrito en la literatura como un agente de pudrición de raíces y cuello de plántulas, necesitando de la presencia de heridas para su ingreso a los tejidos vegetales, pudiendo generar una infección, por lo que cabe la posibilidad que el aislado de *F. solani* obtenido, sea patogénica para *C. revoluta*. Una idea opuesta tiene Xin-rong (2005), el cual indica que existen varias especies de *Cycas* que son susceptibles a este hongo, pero la especie *C. revoluta* se encuentra dentro de las altamente resistentes a *F. solani*. En el caso de *Trichoderma* sp., llama la atención su aislamiento desde tejido vegetal interno, debido a que generalmente es un hongo presente en la superficie vegetal, pero Hosseyni-Moghaddam y Soltani (2014), han aislado *T. atroviride* y *T. koningii* desde tejido interno en plantas de la familia Cupressaceae, considerándolos como endófitas. Las especies de este género no son consideradas patogénicas para las plantas, son, por el contrario, especies benéficas, concepto avalado por la extensa literatura científica referente a la relación antagónica de *Trichoderma* spp. con hongos fitopatógenos.

#### 4.4 DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN MUESTRAS DE *Syagrus romanzoffiana*.

En el caso de la muestra **3445**, se aislaron e identificaron los hongos *Trichoderma* sp., *Phaeoacremonium venezuelense* y *Xenoacremonium falcatus* (Figura 13, Anexo 1 y 2-D).

Al relacionar la sintomatología presente con los organismos identificados, se determinó que el posible agente causal de dicha infección es *P. venezuelense*. Según Gramaje y col. (2015), actualmente esta especie se encuentra descrita en España afectando a albaricoquero (*Prunus armeniaca*) y en Argelia y Sudáfrica afectando a vides (*Vitis vinifera*). Según Olmo y col. (2014), este patógeno genera un colapso de ramas, clorosis de las hojas y muerte regresiva de los brotes. En el interior del tronco, los autores observaron manchas negras y vetas oscuras en los vasos xilemáticos, en secciones transversales y longitudinales.

Según lo anterior, estos resultados coinciden con la sintomatología descrita por Olmo y col. (2014) en albaricoquero y por Berraf-Tebbal y col. (2011) en vides, por lo que se puede pensar que este hongo es patogénico para *S. romanzoffiana*. Al igual que en los casos anteriores, estos resultados deben comprobarse con una prueba de patogenicidad y cumplir los postulados de Koch-Pasteur para poder establecer una relación clara de causalidad de la infección. Según lo planteado, estos resultados podrían corresponder al primer reporte de este patógeno causando muerte vascular en *S. romanzoffiana* en España.



**FIGURA 13.** Hongos aislados de la muestra 3445 de *S. romanzoffiana*. (A) *Trichoderma* sp., (B) *Phaeoacremonium venezuelense* y (C) *Xenoacremonium falcatus*.

Con respecto al aislado de *Trichoderma* sp. y como se dijo anteriormente, este es un hongo que puede vivir tanto dentro como fuera de la planta, sin causar daño y es usado en formulados biológicos como antagonista de variados patógenos. Con respecto a *Xenoacremonium falcatus*, es muy poca la información que se posee de él, no existiendo registro de características patogénicas en cultivos.

#### **4.5 RECOMENDACIONES DE MANEJO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PLANTAS DE PALMERAS Y TIPO PALMERA.**

En las muestras analizadas y diagnosticadas, la prevalencia de infecciones presentadas posee una etiología fúngica, pudiéndose manejar agrónomicamente con medidas preventivas y curativas en casos en los que la enfermedad se encuentra establecida en el cultivo.

En el caso de las infecciones foliares diagnosticadas en esta investigación, como las causadas por *Colletotrichum* sp., *C. siamense*, *Alternaria alternata*, *A. infectoria* y *Phaeoacremonium venezuelense*, enmarcándonos en un manejo sustentable de las enfermedades en los cultivos de palmeras, se recomienda:

- evitar riegos por aspersión, ya que éstos dejan agua libre sobre el follaje de las plantas, aumentando la humedad relativa del ambiente y permitiendo germinar esporas de hongos que requieren de agua libre (Chase y Broschat, 1993).
- Aislar del cultivo o eliminar aquellas plantas que se encuentren sintomáticas para los hongos patógenos descritos en esta investigación, ya que éstas representan un foco de dispersión de esporas y por ende una fuente de inóculo para futuras infecciones.
- Realizar podas fitosanitarias, es decir, eliminar hojas, tallos, etc., que presenten infecciones y que su recuperación sea improbable (Mota, 2006).
- Realizar deshojado de órganos secos, pero no a ras de peciolo (cercano al estípote), debido a que en la base de las hojas se producen químicos que inhiben la proliferación de hongos en el estípote (Mota, 2006). Al realizar esta labor, eliminar los restos vegetales del suelo y del vivero, ya que estos representan una fuente de inóculo de infecciones.
- Realizar fertilizaciones con nitrógeno de forma mesurada, debido a que un exceso, fomenta el crecimiento vegetativo y la expansión celular, generando células turgentes y sencillas de atravesar por los tubos germinativos de las

conidias de los hongos. Continuando con el nitrógeno, preferir fuentes amoniacales en vez de nítricas, ya que éstas son de entrega lenta y ayudan a disminuir el problema planteado anteriormente (Marschner's, 2012).

- Mantener ventilación de forma persistente en el lugar donde se encuentran las plantas. Esta ayudará a bajar la humedad relativa y cambiar masas de aire que puedan contener esporas de hongos patógenos. Este punto se relaciona con el anterior, ya que elevadas dosis de nitrógeno, aumentan materia seca foliar en las plantas, disminuyendo la circulación del aire en el cultivo.
- Realizar control biológico con hongos beneficiosos como *Trichoderma* spp. o con formulados de bacterias, *Bacillus* spp. Los microorganismos de estos formulados pueden actuar por antibiosis, micoparasitismo y/o competencia por espacio, nutrientes, etc.
- Implementación de sistemas de alerta de condiciones predisponentes para patógenos, como el control del Déficit de Presión de Vapor (DPV), si se produce en invernaderos (Beluzan, 2013).
- Como última opción, realizar manejos preventivos con productos de protección como el Mancozeb (Puig y Ramoneda, 2000) o cúpricos.

En el caso de las infecciones de estípite, tronco y raíces diagnosticadas en esta investigación, como las causadas por *Ilyonectria liligena*, *I. liriodendri*, *I. capensis* y *Fusarium solani*, se recomienda:

- Biofumigar el suelo con abonos verdes de plantas que produzcan sustancias antifúngicas como los glucosinolatos en coles o la avenacina en avena.
- Eliminar las zonas dañadas del tronco/estípite por patógenos, con la aplicación de un sellante en la herida. Esta medida es cuestionada por algunos autores, señalando que variadas investigaciones han probado que no disminuye la incidencia de enfermedades de madera (Mota, 2006).
- Evitar manejos bruscos que puedan dañar el tronco/estípite de las plantas en maceta. Especies del género *Fusarium*, requieren la presencia de heridas para comenzar a infectar, por lo que evitarlas puede ayudar a disminuir incidencia de las enfermedades ocasionadas por estos patógenos (Agrios, 2005).

- Favorecer el drenaje del suelo/sustrato y evitar el encharcamiento. Considerar en la preparación del sustrato, una fracción de arena que favorezca el drenaje activo del exceso de agua (Argimón de Vilardaga, 2001).
- No instalar goteros en zonas cercanas al tronco/estípite, debido a que el exceso de agua ablanda los tejidos vegetales y los deja propensos a la colonización por bacterias y hongos. Se recomienda ubicarlos en zonas periféricas de la maceta (Argimón de Vilardaga, 2001).
- Realizar la aplicación de urea en zonas periféricas de la maceta, ya que este fertilizante es capaz de quemar el tejido vegetal que se encuentre cercano a él, dañando raíces y cuello de la planta, si es aplicado cercano al estípite. Este daño significaría una vía de acceso a patógenos que se encuentran comúnmente en el suelo.

## 5. CONCLUSIONES

Se diagnosticaron doce muestras vegetales, en nueve de ellas se logró aislar microorganismos fúngicos. De estas plantas, a seis se les pudo relacionar la sintomatología presentada con el organismo aislado e identificado, estableciéndolos como posibles agentes causales de las infecciones presentadas.

En *Chamaerops humilis*, se diagnosticaron siete muestras, de las cuales a cuatro se logró asociar causalidad de infección en dicho hospedero. Los organismos diagnosticados como causantes de infecciones en el área foliar fueron *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria infectoria* y *A. alternata*. Sumado a lo anterior, los organismos diagnosticados causando daño en el área radical fueron *Ilyonectria liligena*, *I. lirioidendri*, e *I. capensis*.

En *Yucca rostrata*, se diagnosticó una muestra, de la cual se logró asociar causalidad de infección en dicho hospedero. Los organismos diagnosticados como causantes de infecciones en el área foliar fueron *A. infectoria* y *A. alternata*.

En *Cycas revoluta*, se diagnosticaron tres muestras, de las cuales no se logró asociar causalidad de infección en dicho hospedero.

En *Syagrus romanzoffiana*, se diagnosticó una muestra, de la cual se logró asociar causalidad de infección en dicho hospedero. El organismo diagnosticado como causante de infección en el estípite de la planta fue *Phaeoacremonium venezuelense*.

Cabe destacar que en dos muestras de *C. humilis* y una de *S. romanzoffiana*, se aislaron e identificaron hongos que actualmente no se encuentran descritos para estos hospederos, correspondientes a *I. liligena* y *C. siamense* para el primero y *P. venezuelense* para el segundo hospedero, lo que podría representar los primeros reportes de dichos hongos en los hospederos señalados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, I., MOUHI, M., AL-ROUBAIE, J., HAMA, N. y EL-BAHADLI, A. (1991). *Phomopsis phoenicola* and *Fusarium equiseti*, new pathogens on date palm in Iraq. *Mycological Research*, 95(4): 509.
- ABDEL-AZIZ, F. (2016). Freshwater fungi from the River Nile, Egypt. *Mycosphere*, 7(5): 741–756.
- AGRIOS, G. (2005). *Plant pathology*. Estados Unidos. 5a. ed. 922 p.
- AIELLO, D., GUARNACCIA, V., VITALE, A., CIRVILLERI, G., GRANATA, G., EPIFANI, F. y CROUS, P. (2014). *Ilyonectria palmarum* sp. nov. causing dry basal stem rot of Arecaceae. *European journal of plant pathology*, 138(2): 347-359.
- ANDERSEN, B. y THRANE, U. (1996). Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(7): 685-689.
- ANDREWS, J. SPEAR, R., y NORDHEIM, E. (2002). Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. *Canadian journal of microbiology*, 48(6): 500-513.
- ALBANO, P. (2005). *Palmeras: cultivo y utilización: Las Principales Especies Ornamentales Para Jardines Templados y Tropicales*. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. 365 p.
- ALBARDIAZ, M. (1997). Importancia del mercado de las flores y plantas ornamentales. *Revista Distribución y Consumo*, N° 36. 9 p.
- APG II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 41: 399-436.

- ARANGO, M., PINEDA, B. y MARTÍNEZ, G. (2012). Taller para el diagnóstico fitosanitario del cultivo de la palma de aceite. Guía para el diagnóstico y manejo de la marchitez sorpresiva. Publicación de la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite Cenipalma. Colombia, 32 p.
- ARGIMÓN DE VILARDAGA, X. (2001). El Mantenimiento de las Palmeras: Manual Práctico Para Su Correcta Ejecución. Barcelona, España. 33 p.
- ARMENGOL, J., MORETTI, A., PERRONE, G., VICENT, A., BENGOCHEA, J., y GARCÍA-JIMÉNEZ, J. (2005). Identification, incidence and characterization of *Fusarium proliferatum* on ornamental palms in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 112(2): 123-131.
- BALLESTER-OLMOS, J. (1996). Viveros de Palmeras. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, 211 p.
- BALLESTER-OLMOS, J. (1999). Viveros de Palmeras, hojas divulgadoras N°2100. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación, España. 32 p.
- BELUZAN, F. 2013. Déficit de Presión de Vapor (DPV) y factores microclimáticos como herramientas de pronóstico de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., en *Lactuca sativa* L. bajo invernadero. Tesis Mag. Cs. Veg. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 101p.
- BARNETT H. y HUNTER B. (2006). Illustrated genera of imperfect fungi. 4ª ed. Minnessota, Estados Unidos. 218p.
- BENZOHRA, I., MEGATELI, M. y BERDJA, R. (2015). Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management. *African Journal of Biotechnology*, 14(7): 542-550.
- BERRAF-TEBBAL, A., BOUZNAD, Z., SANTOS, J., COELHO, M., PÉROS, J. y PHILLIPS, A. (2011). *Phaeoacremonium* species associated with Eutypa dieback and esca of grapevines in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4): 86-97.

- BRAITHWAITE, M., HILL, C., GANEV, S., PAY, J., PEARSON, H. y ALEXANDER, B. (2006). A survey of sub-tropical nursery plants for fungal diseases in northland. *New Zealand Plant Protection*, 59: 132-136.
- CHARCHAR, M., ANJOS, J. y MELO, J. (2003). Infecção natural de jatobá por *Phomopsis* sp. no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 316-318.
- CHASE, A. y BROCHAT, T. (1993). *Maladies des Palmiers*. Editions Champflour. 104 p.
- CHASE, A., BROCHAT, T., y AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. (1991). *Diseases and Disorders of Ornamental Palms*. APS Press, Estados Unidos. 56 p.
- CHAVERRI, P., SALGADO, C., HIROOKA, Y., ROSSMAN, A. y SAMUELS, G. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68: 57-78.
- CHOWDAPPA, P., CHETHANA, C. y PAVANI, K. (2015). *Colletotrichum siamense* and *C. truncatum* are responsible for severe outbreaks of anthracnose on onion in southwest India. *Journal of plant pathology*, 77-86.
- CONG, L., SUN, Y., KANG, J., LI, M., LONG, R., ZHANG, T. y YANG, Q. (2016). First report of root rot disease caused by *Fusarium proliferatum* on alfalfa in China. *Plant Disease*, 100 (12): 2526-2526.
- CROUS, P., GROENEWALD, J., RISÈDE, J., SIMONEAU, P. y HYWEL-JONES, N. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50: 415-430.
- DE CORATO, U., NARDIELLO, I. y ROSA, G. (2003). Ornamentali-Rinvenimento di maculature fogliari da *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler su palme ornamentali. *Informatore Fitopatologico*, 53(12): 54-56.

- DONALDSON, J. (2003). Cycads: status survey and conservation action plan. Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources. Ed. IUCN the World Conservation Union. 97 p.
- EL-DEEB, H., LASHIN, S. Y ARAB, Y. (2007). Distribution and pathogenesis of date palm fungi in Egypt. *Acta Horticulturae*. 736, 421-429.
- ELMHIRST, J. (2017). Inventario des maladies des plantes au Canada. The Canadian Phytopathological Society. Canadá. 237p.
- ELLIOTT, M., DES JARDIN, E., O'DONNELL, K., GEISER, D., HARRISON, N. y BROCHAT, T. (2010). *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum*, a novel forma specialis causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida. *Plant Disease*, 94(1): 31-38.
- ELLIOTT, M. y AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. (2004). Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders. APS Press. 69 p.
- ELLIOTT, M. y BROCHAT, T. (2017). Palm Problems: Field and Laboratory Diagnosis. University of Florida (On line) <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP16600.pdf>> (16 jun. 2018).
- FERREIRA-PINTO, M., MOURA-GUEDES, M., BARREIRO, M., PAIS, I., SANTOS, M. y SILVA, M (2006). *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of blue mold in "Rocha" pear. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 71: 973-978.
- GALÁN, P., GAMARRA, R., GARCÍA, J. y ALVAREZ, S. (2013). *Chamaerops humilis*. Árboles Ibéricos. (On line) <<http://www.arbolesibericos.es/especie/chamaeropshumilis>> (13 jun. 2018).
- GARCÉS, E., OROZCO, M., BAUTISTA, G. y VALENCIA, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1): 7-25.

- GARDES, M. y BRUNS, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2): 113-118.
- GAROFALO, J. y MCMILLAN, R. T. (2004). *Thielaviopsis* diseases of palms. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 117: 324-325.
- GAUTAM, A. (2013). Natural Occurrence of *Alternaria alternata* on *Agave americana*: a report from Himachal Pradesh, India. *Journal on New Biological Reports*, 2: 36-39.
- GOMES, R., GLIENKE, C., VIDEIRA, S., LOMBARD, L., GROENEWALD, J. y CROUS, P. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31: 1.
- GRAMAJE, D., MOSTERT, L., GROENEWALD, J. y CROUS, P. (2015). *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal biology*, 119(9): 759-783.
- GUARRO, J., AL-SAADON, A., GENE, J. y ABDULLAH, S. (1997). Two new cleistothecial ascomycetes from Iraq. *Mycologia*, 955-961.
- GUILLOT, D. y VAN DER MEER, P. (2009). El género *Yucca* L. en España. *Revista Bouteloua*, 2: 124 p.
- HALDHAR, S., MAHESHWARI, S. y MURALIDHARAN, C. (2017). Pest status of date palm (*Phoenix dactylifera*) in arid regions of India. *Journal of Agriculture and Ecology*, 3: 1-11.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J., ESPINO, A., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. M., PÉREZ-SIERRA, A., LEÓN, M., ABAD-CAMPOS, P., y ARMENGOL, J. (2010). Survey of diseases caused by *Fusarium* spp. on palm trees in the Canary Islands. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(1): 84-88.

- HILL, K. (2010). The Cycad Pages. *Cycas revoluta*. Royal Botanic Garden Sydney. (On line) < <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/cycadpg?taxname=Cycas+revoluta>> (13 jun. 2018).
- HOPKINS, K. y MCQUILKEN, M. (2000). Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, 106(1): 77-85.
- HOSSEYNI-MOGHADDAM, M. y SOLTANI, J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of microbiology*, 64(2): 753-761.
- INDEX FUNGORUM, (2018). Index Fungorum Partnership (On line) < <http://www.indexfungorum.org/>> (14 jun 2018).
- KHEY, A., OUABBOU, A., SELMAOUI, K., TOUHAMI, A., BENKIRANE, R. y DOUIRA, A. (2013). *Chamaerops humilis*, un nouvel hôte de *Pestalotiopsis cruenta* (kleb.) steryaert au maroc. *Lebanese Science Journal*, 14(1): 129-132.
- MANIMOHAN, P., AMRITHA, M. y SAIRABANU, N. (2011). A comparison of diversity of marine fungi on three co-habiting mangrove plants. *Mycosphere*, 2(5): 533-538.
- MARSCHNER'S, P. 2012. Mineral Nutrition of Higher Plants. 3°Ed. Academic Press. 651 pp.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE, (2018). Superficie y producción de flor cortada y planta ornamental Años 2008-2011. (On line)<[http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/tablawebpsflor\\_tcm30-135742.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/tablawebpsflor_tcm30-135742.pdf)> (11 jun. 2018).
- MONTES, T. y ROMERO, C. (2005). Flora ornamental del Campus de Reina Mercedes, Universidad de Sevilla, ficha nº 17, versión 2. (On line) < [http://asignatura.us.es/abotcam/especies/Cycas\\_revoluta.html](http://asignatura.us.es/abotcam/especies/Cycas_revoluta.html)> (13 jun. 2018).

- MORENO, M., CASTAÑEDA, E. Y BARAJAS, M. (2014). Comercialización de cícadas mexicanas (Zamiaceae) en Atlixco, Puebla: Un estudio exploratorio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(4): 633-644.
- MOTA, P. (2006). Palmeras, morfología, cultivo y reproducción. Ediciones Omega S. A. Barcelona, España. 149 p.
- NAYAB, M. y AKHTAR, N. (2016). New report of *Cycas revoluta* leaf necrosis by *Phoma herbarum* from Pakistan. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123 (4): 193-196.
- NIRENBERG, H. y O'DONNELL, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3): 434-458.
- OLMO, D., GRAMAJE, D., AGUSTÍ-BRISACH, C., LEON, M. y ARMENGOL, J. (2014). First report of *Phaeoacremonium venezuelense* associated with wood decay of apricot trees in Spain. *Plant Disease*, 98(7): 1001-1001.
- ORTIZ, D., LUMBRERAS, E., ROSSELLÓ, J. y VAN DER MEER, P. (2013). El género *Yucca* L. en la flora alóctona valenciana. *Bouteloua*, N°14: 124-149.
- PERELLO, A., MORENO, M. y SISTERNA, M. (2008). *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology*, 57(2): 379-379.
- PÉREZ, A., MORA, B., LEÓN, M., GARCÍA, J. y ABAD, P. (2012). Enfermedades causadas por en viveros de plantas ornamentales. In *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España, 38(1): 143-156.
- PÉREZ, F. y VOVIDES, A. (1997). Manual para el Cultivo y Propagación de Cícadas. Instituto Nacional de Ecología, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Instituto de Historia Natural e Instituto de Ecología. 18 p.
- PIONTELLI, E. 2011. Manual de microhongos filamentosos comunes I. Universidad de Valparaiso. Valparaiso, Chile. 181-184p.

- PLUMED, J. y COSTA, M. (2013). Monografías botánicas, Jardín Botánico de la Universidad de Valencia, Volumen 1: Las palmeras. Universidad de Valencia. 132 p.
- PRIHASTUTI, H., CAI, L., CHEN, H., MCKENZIE, E. y HYDE, K. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39(1), 89-109.
- PUIG, A. y RAMONEDA, P. (2000). Palmeras un Reino Vegetal. 2º Edición. Floraprint España S.A. España. 240 p.
- RILEY, M., WILLIAMSON, M. Y MALOY, O. (2002). Diagnóstico de enfermedades en plantas. American Phytopathological Society. (On line) < <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/DiagnosticoEnfermedadesPlantas.aspx> > (16 jun. 2018).
- ROCHA, F. (2015). Hongos frecuentes de la hoja de la *Yucca* spp. y evaluación de la incidencia y severidad de daños en el sur de Coahuila. Tesis Ing. AgroBiol. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 74p.
- RODRIGUEZ, J. y RODRIGUEZ, R. (2010). La palmera canaria, plagas y enfermedades. Cabildo de Gran Canaria. 101 p.
- ROMERO, C. (2005). Flora ornamental del Campus de Reina Mercedes, Universidad de Sevilla – Documentación, *Cycas revoluta* en Sevilla. Universidad de Sevilla. (On line) < [http://asignatura.us.es/abotcam/documentacion/Cycas\\_en\\_Sevilla.html](http://asignatura.us.es/abotcam/documentacion/Cycas_en_Sevilla.html) > (13 jun 2018).
- SÁNCHEZ DE LORENZO, J. (2003). Las plantas del género *Yucca*, cultivadas en España. (On line) < <https://www.arbolesornamentales.es/Yucca.htm> > (13 jun. 2018).
- SANTOS, J. y PHILLIPS, A. (2009). Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*, 34(11): 111-125.

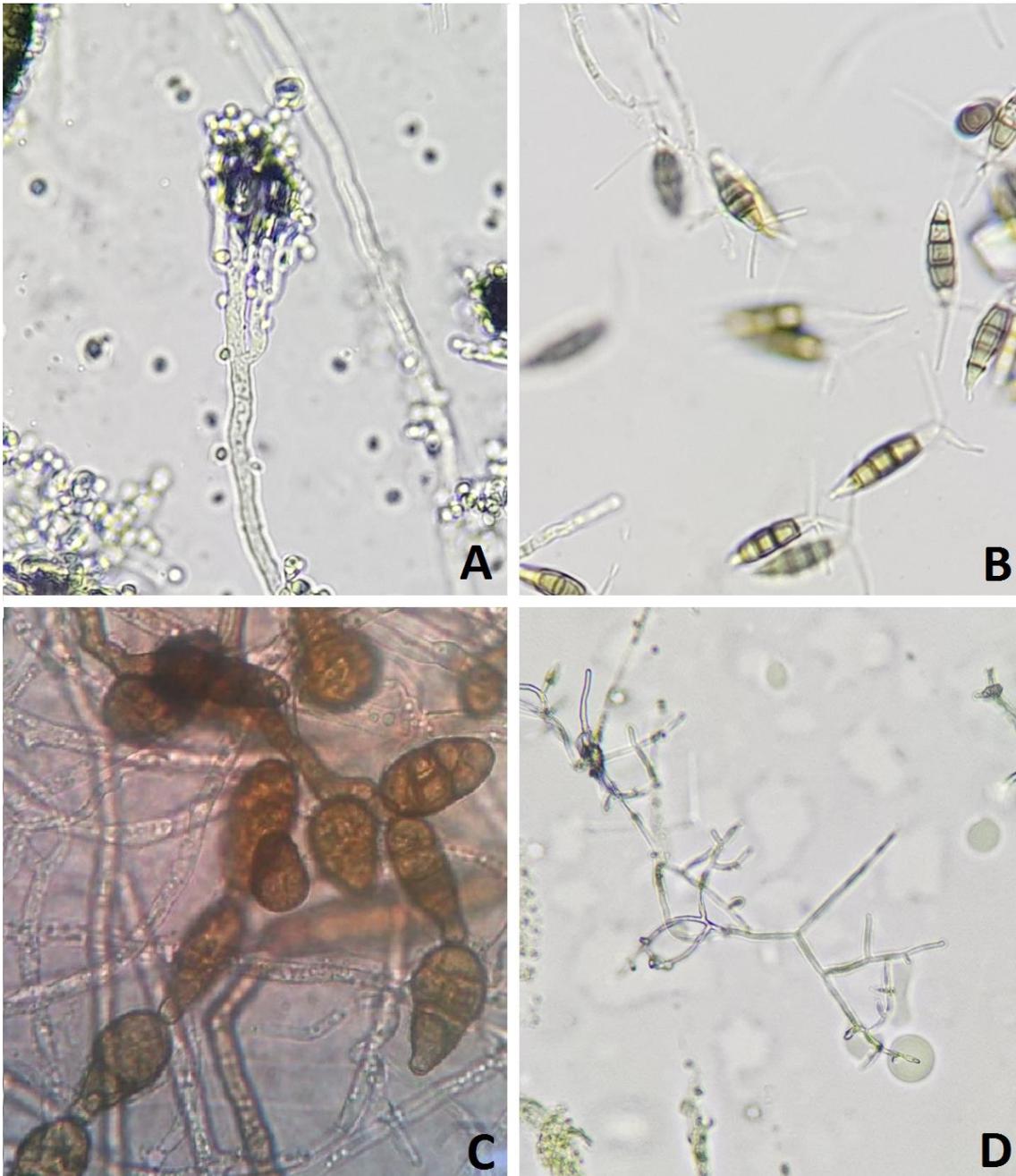
- SHTEREVA, G. y MIRKOVA, E. (2006). Anthracnose on ornamental pot palms, grown in the South coast the Black sea. *Rasteniev'dni Nauki*, 43(6): 516-518.
- SOCIEDAD QUÍMICA Y MINERA DE CHILE (2001). *Agenda del salitre*. Sociedad Química y Minera de Chile SA Santiago, Chile.
- SUWANNARACH, N., KUMLA, J. Y LUMYONG, S. (2015). First report of *Alternaria* leaf blight disease on oil palm caused by *Alternaria longipes* in Thailand. *Phytoparasitica*, 43 (1): 57-59.
- THE UNIVERSITY OF ARIZONA, (2016). Campus Arboretum, *Yucca rostrata* Salvage. (On line) <<https://arboretum.arizona.edu/yucca-rostrata-salvage>> (13 jun 2018).
- TRAVADON, R., LAWRENCE, D., ROONEY-LATHAM, S., GUBLER, W., WILCOX, W., ROLSHAUSEN, P. y BAUMGARTNER, K. (2015). *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal biology*, 119(1): 53-66.
- UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, (2018). Jardín Botánico, mapa de especies. (On line) <<http://www.jardinbotanico.uma.es/bbdd/index.php/jb-94-02/>> (13 jun 2018).
- WHITE, T., BRUNS, T., LEE, S., y TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DHSnisky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press. 315-322 p.
- XIN-RONG, W. (2005). Chemical control technique of stem-bulb rot caused by *Fusarium solani* in *Cycas* sp. *Forest Pest and Disease*, 6: 011.
- ZHANG, D., SPADARO, D., VALENTE, S., GARIBALDI, A. y GULLINO, M. (2012). Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *International journal of food microbiology*, 153(3): 453-464.

## 7. ANEXOS

**ANEXO 1.** Hongos aislados según muestra, hospedero y método de identificación. ITS: Espaciador Transcrito Interno, EF: Factor de Elongación de *Fusarium*, His: Histona,  $\beta$ -Tub 2: Gen de la  $\beta$ -Tubulina y MIC: identificación microscópica.

| Muestra | Hospedero                    | Hongo                               | Identificación | Región         |
|---------|------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|
| 3384    | <i>Chamaerops humilis</i>    | <i>Chaetomium globosum</i>          | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Xenoacremonium</i> sp            | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Ilyonectria liliigena</i>        | PCR            | HIS            |
|         |                              | <i>Ilyonectria liriodendri</i>      | PCR            | HIS            |
|         |                              | <i>Ilyonectria capensis</i>         | PCR            | HIS            |
|         |                              | <i>Pestalotiopsis</i> sp.           | MIC            | -              |
|         |                              | <i>Fusarium oxysporum</i>           | PCR            | EF             |
| 3385    | <i>C. humilis</i>            | <i>Fusarium solani</i>              | PCR            | EF             |
|         |                              | <i>Fusarium oxysporum</i>           | PCR            | EF             |
| 3386    | <i>C. humilis</i>            | <i>Colletotrichum</i> sp            | PCR            | ITS            |
|         |                              | Ascomycete no identificado          | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Zopfiella latipes</i>            | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Colletotrichum siamense</i>      | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Fusarium oxysporum</i>           | PCR            | EF             |
| 3390    | <i>C. humilis</i>            | <i>Penicillium</i> sp.              | MIC            | -              |
|         |                              | <i>Penicillium polonicum</i>        | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Cladosporium</i> sp              | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Cladosporium macrocarpum</i>     | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | PCR            | ITS            |
| 3391    | <i>C. humilis</i>            | <i>Alternaria infectoria</i>        | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Diaporthe foeniculina</i>        | PCR            | ITS            |
| 3392    | <i>C. humilis</i>            | <i>Alternaria alternata</i>         | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Phoma</i> sp.                    | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Alternaria</i> sp.               | MIC            | -              |
|         |                              | <i>Penicillium</i> sp.              | MIC            | -              |
|         |                              | <i>Alternaria infectoria</i>        | PCR            | ITS            |
| 3394    | <i>Yucca rostrata</i>        | <i>Stemphylium</i> sp               | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Alternaria alternata</i>         | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Penicillium</i> sp.              | MIC            | -              |
|         |                              | <i>Fusarium oxysporum</i>           | PCR            | EF             |
| 3398    | <i>Cycas revoluta</i>        | <i>Trichoderma</i> sp.              | MIC            | -              |
|         |                              | <i>Fusarium solani</i>              | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Trichoderma</i> sp.              | MIC            | -              |
| 3445    | <i>Syagrus romanzoffiana</i> | <i>Xenoacremonium falcatus</i>      | PCR            | ITS            |
|         |                              | <i>Phaeoacremonium venezuelense</i> | PCR            | $\beta$ -Tub 2 |

**ANEXO 2.** Observación e identificación microscópica de algunos hongos aislados. (A) conidióforo de *Penicillium* sp., aislado de las muestras 3390, 3392 y 3394; (B) conidias flageladas de *Pestalotiopsis* sp., aislado de la muestra 3384; (C) conidias coloreadas de *Alternaria* sp., aislada de la muestra 3392 y (D) conidióforos de *Trichoderma* sp., aislado de las muestras 3398 y 3445.



**ANEXO 3.** Geles de Agarosa visto por el transiluminador de luz UV. Bandas claras indican una muestra positiva y ausencia de ella, una negativa. Números indican código de aislado (códigos no publicados).

