MANUAL TÉCNICO



LA FUSARIOSIS DE LA PALMERA CANARIA

Federico Laich y Lidia Jubera Hernández

8/2023

ICIA Instituto Canario de Investigaciones Agrarias
Gobierno de Canarias
Gobierno de Canarias Consejería de Economía, Conocimiento y Empleo Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información
Canarias avanza con Euro
Unión Europea

Se autoriza la reproducción, sin fines comerciales, de este trabajo, citándolo como:
Laich, F. y Jubera Hernández, L. 2023. La Fusariosis de la Palmera Canaria. Manual Técnico Nº 8. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 25 p.

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a la financiación proveniente del proyecto "Selección e inoculación de microorganismos lignocelulolíticos para el compostaje de residuos de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) y la obtención de un compost con alta funcionalidad" (ProID2020010127), correspondiente a la convocatoria de subvenciones 2020-2022 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), para la realización de proyectos de investigación por organismos de investigación y empresas en las áreas prioritarias de la estrategia de especialización inteligente de Canarias RIS-3, cofinanciado con el programa operativo FEDER Canarias 2014-2020 (Apoyo a la investigación María del Carmen Betancourt y Molina).

Colección Manual Técnico Nº 8

Autores: Federico Laich y Lidia Jubera Hernández
Edita: Instituto Canario de Investigaciones Agrarias ICIA. San Cristóbal de La Laguna.
Maquetación y diseño: Fermín Correa Rodríguez (ICIA)©

LA FUSARIOSIS DE LA PALMERA CANARIA

Federico Laich y Lidia Jubera Hernández.
Unidad de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias.

RESUMEN

La fusariosis de la palmera canaria es una enfermedad fúngica producida por el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* (*Focan*). Este patógeno se describe por primera vez en Francia en 1973 por Mercier & Louvet y actualmente está distribuido por diferentes partes del mundo. Los síntomas más característicos de esta enfermedad son la seca asimétrica de los folíolos, las estrías oscuras longitudinales de la cara convexa del raquis, la necrosis xilemática y, en los casos severos, la muerte de la planta. En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica del patógeno y los resultados de los análisis filogéneticos de los aislados fúngicos obtenidos a partir de palmeras de Tenerife. Asimismo, se analiza el efecto de la temperatura sobre el desarrollo y la viabilidad *in vitro* de *Focan*, y la capacidad de la fase termófila del compostaje para higienizar restos de palmera contaminados con el patógeno. Estas actividades forman parte del proyecto ProID2020010127 correspondiente a la convocatoria de subvenciones 2020-2022 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI).

Palabras claves: *Phoenix canariensis, Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, compost, compostaje, fase termófila, higienización.

ÍNDICE

1. Introducción 6

2. Distribución y síntomas de la enfermedad 7

3. El patógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*) 9

3.1 Taxonomía 10

3.2 Características morfológicas 11

3.3 Características filogenéticas 10

4. Eliminación de fitopatógenos durante el proceso de compostaje 16

5. Efecto de la temperatura sobre *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* 17

5.1 Desarrollo de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* a diferentes temperaturas 17

5.2 Viabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* a diferentes temperaturas 19

5.3 Viabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* en restos de palmera compostados 19

21

1. INTRODUCCIÓN

El género *Phoenix* cuenta con 15 especies distribuidas por la mayoría de los climas cálidos, desde Canarias hasta Hong Kong (China), pasando por África y el Mediterráneo, la Península Arábiga, la India e Indochina (Fernández Palacio, 2008). Ocupa además habitats de amplia diversidad ecológica, desde pantanos costeros en manglares al sotobosque de pinares a 2000 m.s.n.m. (Morici, 1998).
De todas las especies del género *Phoenix, Phoenix canariensis* es la única endémica de las Islas Canarias y se distribuye por todo el archipiélago (barrancos, laderas, barranqueras en pendiente y laderas escarpadas, bosques termófilos, etc.) (Fernández Palacio, 2008).
La palmera canaria tiene mucho interés en el archipiélago, tanto por ser una de las especies más representativas de la biodiversidad y del paisaje canario, como por su interés económico en algunos sectores productivos, principalmente el ornamental. Probablemente es la palmera más utilizada en jardinería; especialmente en parques y jardines públicos de todo el archipiélago. Ocupa aproximadamente 3200 ha y la mayor parte de los palmerales se encuentran en Gran Canaria y La Gomera. En esta última isla, persiste la explotación de la savia de la palmera (guarapo) para la producción de miel de palma. Se trata de una explotación sostenible debido a que los ejemplares no mueren y pasados unos cinco años, están en condiciones para ser aprovechados nuevamente.
Todas estas características y otras no menos relevantes, como su belleza y valor cultural, han sido las razones fundamentales para considerar a esta palmera el símbolo vegetal de la Comunidad Autónoma de Canarias (Ley 7/1991, de 30 de abril, de símbolos de la naturaleza para las Islas Canarias) y, por otra parte, incluirla en el listado de especies estrictamente protegidas (O20/2/1991, sobre protección de especies de la flora vascular silvestre). Asimismo, el RD. 1997/1995 especifica que los palmerales de *Phoenix* constituyen un hábitat prioritario de interés comunitario, y el Decreto 62/2006 dicta un régimen específico de protección de los palmerales canarios de *P. canariensis* (en el ámbito de la Comunidad Autónoma de Canarias) estableciendo medidas que garanticen su conservación e identidad genética y la promoción de su plantación y cultivo.
La palmera canaria es un árbol dioico (órganos reproductores masculinos y femeninos en ejemplares distintos) de tronco esbelto no ramificado que puede alcanzar los 30 m de altura. Posee hojas pinnadas compuestas (pinnaticompuestas) de 3 a 6 m de largo y puede llegar a tener hasta 200 por individuo. Están formadas por numerosos foliolos (flexibles y de diferentes tamaños) dispuestos a ambos lados del raquis (entre 150 y 200 por cada hoja compuesta). En la parte central de la hoja encontramos los foliolos más largos (hasta 50 cm), mientras que en la parte basal aparecen transformados en espinas fuertes y agudas, de coloración amarillenta y de hasta 20 cm de largo (Fernández Palacios, 2008). Las flores son unisexuales, pequeñas y numerosas, agrupadas en manojos densos, colgantes y largos, formando una inflorescencia panicular. Los ejemplares femeninos poseen las inflorescencias más grandes (hasta 2 m de longitud) y más ramificadas que los masculinos, y sus flores son amarillentas y dispuestas de forma espaciada. Los ejemplares masculinos producen inflorescencias más densas y pequeñas (60-70 cm) y sus flores son blanquecinas. Las flores femeninas producen frutos pequeños y ovoides (dátiles o támaras), de 2 a 3 cm. de largo, de color verde al principio y amarillento-anaranjado en la madurez. En su interior encontramos una semilla ovalada con un profundo surco longitudinal, situado en la parte central de la misma (https://www3.gobiernodecanarias.org).
Desde un punto de vista fitosanitario, la palmera canaria puede verse afectada por plagas y enfermedades fúngicas. Entre las más importantes cabe citar el picudo de las cuatro manchas del cocotero (*Diocalandra frumenti*), la fusariosis vascular típica (*Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*), el exudado del tallo o podredumbre del corazón o podredumbre negra (*Ceratocystis paradoxa*), la pudrición de la raíz del tronco basal por quemadura negra o muerte súbita (*Thielaviopsis radicicola*), la podredumbre rosada (*Nalanthamala vermoesenii*) y la roya foliar (*Graphiola phoenicis*), entre otras.
El picudo de las cuatro manchas del cocotero es sin lugar a dudas la plaga más dañina de las palmeras en Canarias. Se lo conoce localmente como el "picudín de la palmera" y es un pequeño coleóptero de cuerpo alargado generalmente de color pardo-rojizo a negro (Singh y Barrikkad, 2017). Desde su primera detección en Maspalomas (San Bartolomé de Tirajana, Gran Canaria) en 1998 (Salomone *et al*., 2000), *D. frumenti* se propagó rápidamente a otras islas del archipiélago, causando un aumento drástico en la infestación de las palmeras. Como consecuencia de los daños que provoca esta plaga, la Orden de 29 de octubre de 2007 de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de

Canarias, declaró a *D. frumenti* como agente nocivo y estableció las medidas fitosanitarias para su control (BOC Nº 222, de 6 de noviembre de 2007). En el Anexo I de dicha Orden se describen las medidas de control para la destrucción de los restos de palmeras afectadas, indicando que debe procederse al enterramiento de los restos de palmera, tratándolos previamente con un insecticida autorizado y cal viva (Ramos *et al*., 2018).

Fusarium oxysporum f. sp. *canariensis* (*Focan*) es el principal agente causal de la fusariosis vascular típica de la palmera canaria, aunque también se ha citado en *P. dactylifera* y *Washingtonia* (Summerell *et al*., 2001). Si bien esta enfermedad convive con nuestras palmeras desde hace mucho tiempo, en los últimos años se ha observado un incremento importante de la incidencia, principalmente en zonas urbanas de Tenerife y Gran Canaria.

En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica del patógeno y los resultados de las investigaciones realizadas con respecto a la diversidad de *Focan* en Tenerife y la viabilidad durante la exposición a diferentes temperaturas.

Todo ello en el marco del proyecto "Selección e inoculación de microorganismos lignocelulolíticos para el compostaje de residuos de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) y la obtención de un compost con alta funcionalidad" (ProID2020010127), correspondiente a la convocatoria de subvenciones 2020-2022 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), para la realización de proyectos de investigación por organismos de investigación y empresas en las áreas prioritarias de la estrategia de especialización inteligente de Canarias RIS-3, cofinanciado con el programa operativo FEDER Canarias 2014-2020 (Apoyo a la investigación María del Carmen Betancourt y Molina).

2. DISTRIBUCIÓN Y SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD

La fusariosis de las palmeras provocada por *Focan* es una enfermedad fúngica transmitida por el suelo. Se describe por primera vez en Francia en 1973 (Mercier & Louvet, 1973), y posteriormente en Italia (Corte, 1973), Japón (Arai & Yamamoto, 1977), EE.UU. (Feather *et al*., 1979), Australia (Priest & Letham, 1996), Marruecos (Fernández *et al*., 1997), Canarias (Plyler *et al*., 2000), Grecia (Elena, 2004), Argentina (Palmucci, 2005) y China (Lan *et al*., 2020) (Fig. 1).

A pesar de que los síntomas de la enfermedad en Canarias se conocen desde hace muchos años, la primera cita bibliografía internacional donde se describe el aislamiento y la identificación del patógeno data del año 2000 (Plyler *et al*., 2000). En este artículo se describe la identificación de tres aislados del hongo obtenidos de palmeras de Tenerife. Posteriormente, Hernández *et al*. (2010), en un estudio más amplio y con un número de muestras más representativas, identifican un total de 54 aislados de *Focan* provenientes de *P. canariensis* de Tenerife, Gran Canaria, La Palma y Fuerteventura,

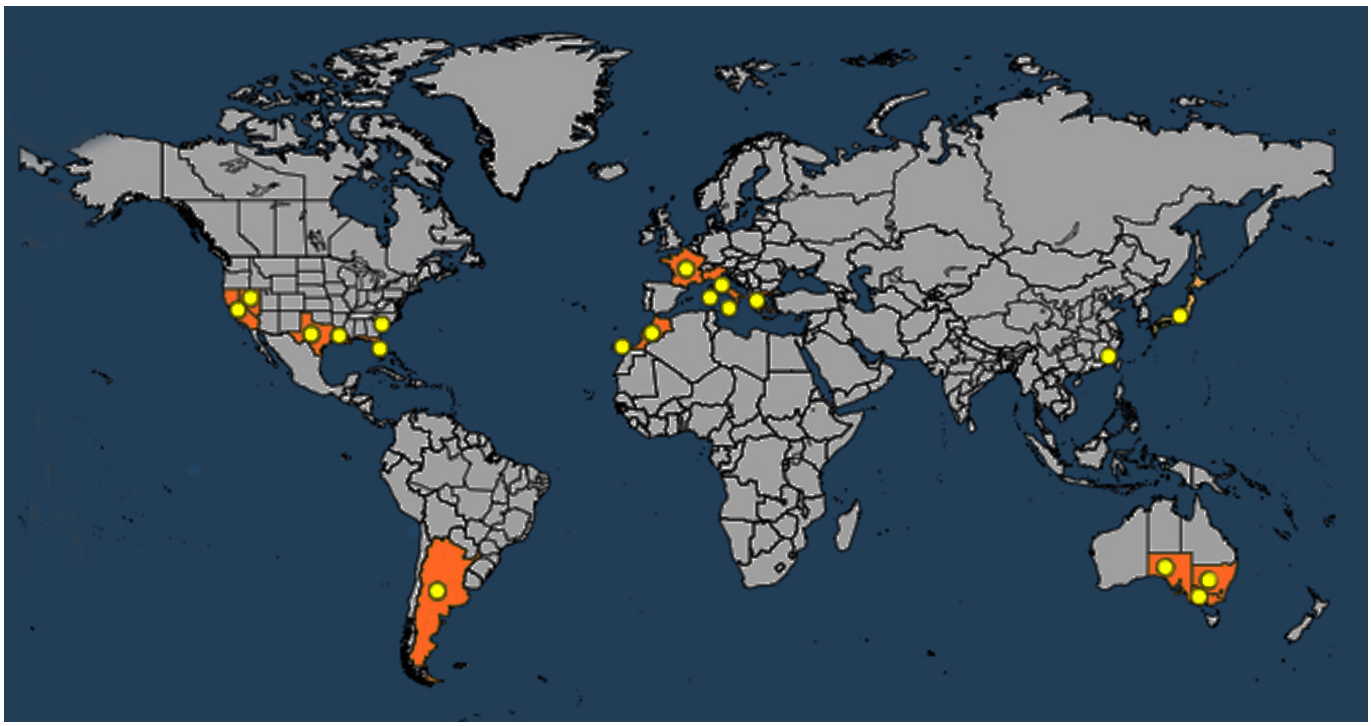


Figura 1. Distribución mundial de *Focan* (EPPO, 2020).

y 15 aislados de *F. proliferatum* provenientes de palmeras de Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura. Teniendo en cuenta que el hábitat natural de *Focan* es el suelo, la infección de la planta con el patógeno se suele producir por la raíz, aunque también puede penetrar por la parte aérea a través de heridas e instrumentos de poda (Plyler *et al.* 1999, Hernández, 2014). La germinación de las esporas en el suelo la desencadena la secreción de los exudados de las raíces de la planta hospedante (rizósfera), principalmente en los sitios de mayor actividad radical o en las partes lesionadas. Una vez que la espora germina se desarrolla una hifa de infección que penetra la epidermis de la raíz (Bishop y Cooper, 1983). Posteriormente, la hifa progresa intercelularmente a través de las células corticales de la raíz hasta que ingresa al tejido xilemático. Al llegar al tejido vascular, el hongo se ramifica profusamente y produce microconidios y macroconidios que son transportados en sentido acrópeto (ascendente) por la fuerza transpiratoria del sistema vegetal (Bishop y Cooper, 1983). Los microconidios germinan y las hifas se diseminan sistémicamente por todo el hospedante. Es habitual que para prevenir la

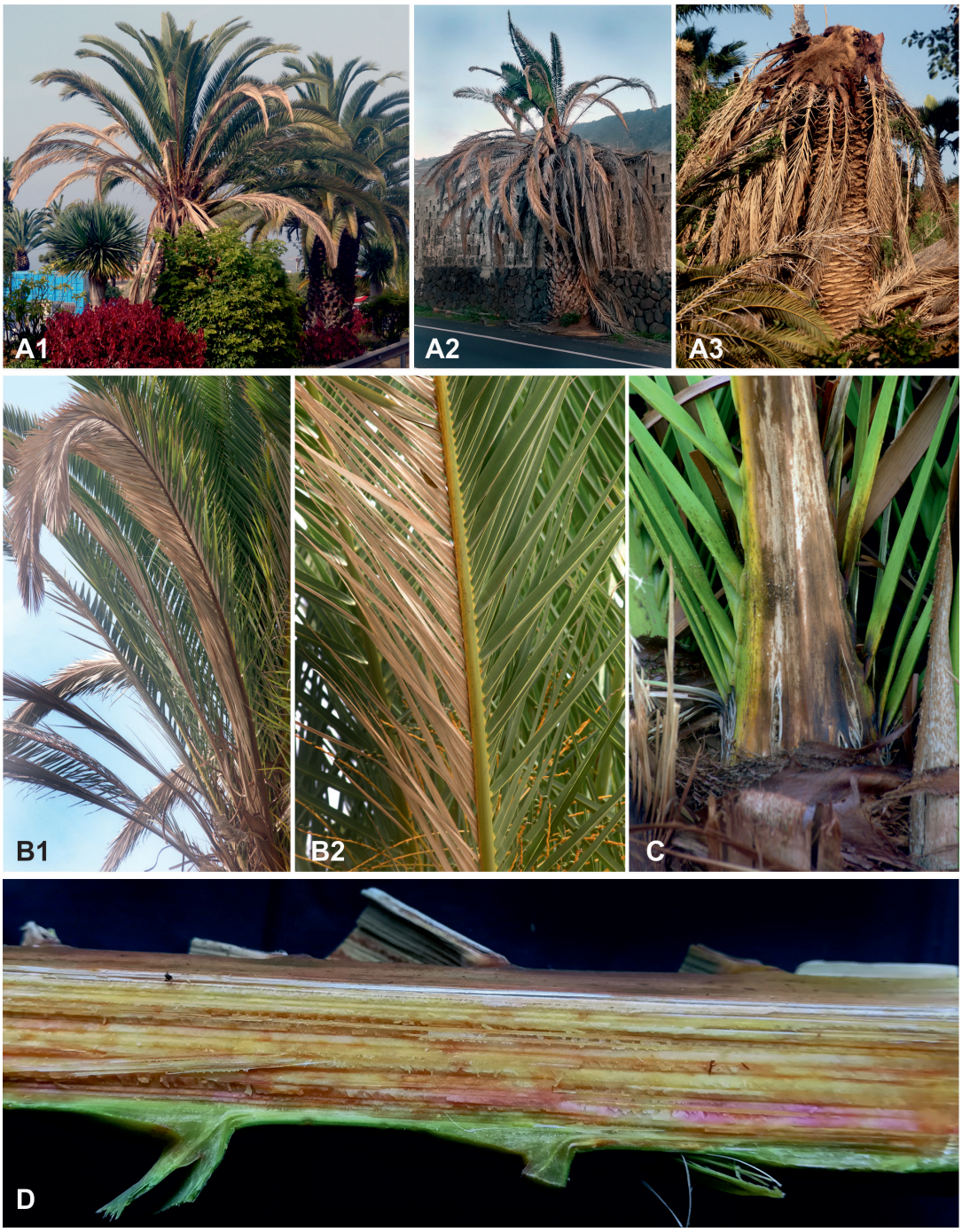


Figura 2. Síntomas de la fusariosis en palmera canaria (*P. canariensis*). A1: síntoma en las hojas adultas inferiores (Santa Úrsula). A2: palmera afectada por *Focan* y picudo (Buenavista). A3: muerte de la planta (Santa Cruz). B1y2: Hoja compuesta con los foliolos del lado izquierdo secos debido a la obstrucción xilemática provocada por *Focan*. C: base del raquis. D: corte longitudinal del raquis de *P. canariensis*: coloración rojiza típica del hongo provocada por el bloqueo de los vasos del xilema de la planta.

propagación de los hongos patógenos, las plantas resistentes produzcan compuestos antifúngicos y ocluyan la luz de los vasos del xilema mediante tílides (Vander Molen *et al*., 1987; Zhang *et al*., 1993; Walter *et al.,* 2010; Kashyap *et al*., 2021). Sin embargo, en los hospedantes susceptibles esta respuesta es más lenta y el patógeno coloniza a la planta con mayor rapidez. El bloqueo de los vasos del xilema finalmente da como resultado el enrojecimiento del tejido vascular, un síntoma característico del marchitamiento por *Fusarium* (Fig. 2D). Con el tiempo el patógeno progresa y provoca los síntomas característicos de la enfermedad (ver más adelante). Posteriormente, sobre todo en casos muy severos, el hongo produce esporas en la superficie de los tejidos vegetales muertos y la enfermedad se propaga a otros hospedantes por el suelo y tambien por el ambiente, el transporte, y la manipulación de los restos vegetales (Bishop y Cooper, 1983; Michielse y Rep, 2009; Gordon, 2017; Joshi, 2018; Jangir *et al*., 2021)
Los síntomas más característicos de la enfermedad son: i) marchitez o seca asimétrica de los folíolos de uno de los lados del raquis, ii) estrías o bandas oscuras longitudinales a lo largo de la cara convexa del raquis, y iii) oscurecimiento de los haces vasculares xilemáticos del raquis (Hernández, 2014) (Fig. 2). El marchitamiento suele progresar desde la base del raquis hacia el ápice afectando los foliolos de un solo lado, y solo después de haber progresado, se marchita el lado opuesto del raquis en sentido contrario; desde el ápice hasta la base. Las primeras hojas afectadas son habitualmente las más viejas, situadas en la base de la copa, aunque también se observan otros patrones. La enfermedad suele ser letal, pero el tiempo transcurrido desde la aparición de los primeros síntomas hasta el colapso final y la muerte de la palmera es muy variable (Feather *et al*., 1989; Priest y Letham, 1996; Plyler *et al*., 1999). En los últimos años, se ha observado en las Islas Canarias un número creciente de palmeras (*P. canariensis*) afectadas por la enfermedad, así como también de otras especies de palmeras.

3. EL PATÓGENO (*Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*)

3.1 Taxonomía

Fusarium es uno de los géneros más complejos y diversos de hongos filamentosos. Pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, familia Nectriaceae. Lo podemos encontrar en casi todo el mundo, debido a su capacidad para crecer en una amplia gama de sustratos y para dispersar de forma eficiente sus esporas (Nelson *et al*., 1994). Dentro de este género se han descrito más de 300 especies o complejos de especies filogenéticamente diferentes (O'Donnell *et al*., 2015). Actualmente la base de datos del *index fungorum* (www.indexfungorum.org) contiene 1742 entradas que incluyen todas las variantes del hongo a nivel de subespecie.
Muchas especies son patógenas de plantas, animales y humanos (oportunistas), y otras son inocuas o no patógenas (Mandeel y Baker, 1991; Gordon y Martyn, 1997). Por otro lado, determinadas especies de este género pueden producir metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas). Se estima que puede producir alrededor de 680 metabolitos diferentes, lo que significa un número mucho menor que los más de 3000 metabolitos descritos en *Aspergillus* o los 2700 de *Penicillium*. Entre los metabolitos más estudiados y característicos del género *Fusarium* podemos mencionar a los tricotecenos, las zearalenonas y las fumonisinas, que representan una amenaza importante para la seguridad alimentaria y la salud humana (Crous *et al*., 2021).
Entre las especies patógenas de plantas cabe destacar a *Fusarium oxysporum*, debido a los daños económicos y productivos que provoca en la agricultura. Su capacidad patogénica es muy agresiva y dañina, y es capaz de afectar a más de 150 especies vegetales (entre las cuales encontramos al tomate, el plátano, las cucurbitáceas, etc.) (O'Donnell and Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al*., 1998; Pietro *et al*., 2003; Rana *et al*., 2017; Edel-Hermann y Lecomte, 2019). Debido a su importancia en la agricultura, se considera que ocupa el quinto lugar entre los diez hongos fitopatógenos económicamente más importantes (Dean *et al*., 2012).
De la misma forma que ocurre con otras especies del género *Fusarium, Fusarium oxysporum* se divide a nivel de subespecie en diferentes variantes que denominamos formas especiales (*formae speciales* - f. sp.) de acuerdo al hospedante que afectan. Es decir que una *forma specialis* está compuesta por un grupo de aislados del hongo capaces de infectar a un único hospedante. Por ejemplo, los aislados de *F. oxysporum* patógenos de la palmera canaria los denominamos *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*, haciendo referencia al nombre científico de la palmera (*Phoenix canariensis*). Del mismo modo, *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* le corresponde a aquellos aislados que afectan al tomate (*Lycopersicon esculentum*). Sin embargo, esta regla no siempre se cumple. En el caso de la platanera, la denominación

de la forma especial que afecta a esta especie vegetal es *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, haciendo referencia a los aislados causantes de los síntomas del mal de Panamá obtenidos por primera vez a partir de muestras provenientes de Cuba.
En relación con las formas especiales de *F. oxysporum* que afectan a diferentes especies de palmeras, actualmente se describen cuatro (tabla 1). A su vez, dentro de cada taxón de forma especial se pueden definir razas y/o grupos de compatibilidad vegetativa (VCG - *Vegetative compatibility groups*).

Tabla 1. Diferentes *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* asociadas a palmeras (EPPO, 2020).

Patógeno	Hospedante
F. oxysporum f. sp. *canariensis*	*Phoenix canariensis* *Phoenix reclinata*
F. oxysporum f. sp. *albedinis*	*Phoenix dactylifera*
F. oxysporum f. sp. *elaeidis*	*Elaeis guineensis*
F. oxysporum f. sp. *palmarum*	*Washingtonia robusta* *Syagrus romanzoffiana* *Phoenix canariensis*

Las razas se definen por medio de la habilidad o la especialización del hongo para asociarse a un hospedante específico a nivel del cultivar de la planta o, en algunos casos, por genes de resistencia en estos cultivares (Gordon y Martyn 1997). Un ejemplo conocido en Canarias es el de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (agente causal del mal de Panamá en platanera). En este caso la raza presente en todo el archipiélago es la subtropical 4 (RST4), y hasta la actualidad la raza tropical 4, mucho más agresiva, por fortuna, no se ha detectado en la región. En el caso de *Focan,* hasta el momento no se ha descrito ninguna raza pero, sin embargo, se han definido diferentes VCG mediante la técnica desarrollada por Puhalla (1985) basada en la obtención de mutantes (*nit*) espontáneos. El principio de esta técnica se basa en la formación de heterocariontes que complementan la auxotrofía de una mutación *nit*. La formación de heterocariontes se puede observar fácilmente cuando se enfrentan dos colonias fúngicas compatibles en un medio de cultivo. Cuando esto ocurre se produce una anastomosis entre las hifas de ambas colonias y se forma un "cordón" de micelio denso fácilmente visible. En caso contrario, cuando las colonias son incompatibles, el heterocarionte no se forma y no se observa la formación del cordón de micelio.

Los estudios realizados en *Focan* por Plyler *et al*. (2000) demostraron que el 71% de los aislados analizados (provenientes de diferentes lugares de mundo) correspondieron al VCG 0240, mientras que el 29% restante no formaron heterocariontes con ninguno de los mutantes de prueba utilizados, entre los que se incluye un aislado de Canarias.
En un estudio más amplio del complejo *Fusarium oxysporum*, O'Donell *et al*. (2009) utilizan tres aislados procedentes de Canarias y observan una baja variabilidad genética entre ellos mediante el análisis filogenético y evolutivo de la región del espaciador ribosomal intergénico (IGS) y del factor de elongación de la traducción (TEF-1α).
Los análisis realizados en la Unidad de Protección Vegetal por el Dr. Julio Hernández Hernández (2011), permitieron avanzar más en el conocimiento de la diversidad de *Focan* en Canarias. En este trabajo se analizó un número mayor de aislados y se describieron cuatro VCG. Esto indica una diversidad genética moderada, si tenemos en cuenta que en el patosistema palmera datilera (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) sólo se ha determinado un VCG, mientras que en el patosistema platanera (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) se han descrito 24 VCGs. Resulta interesante destacar de este trabajo el hallazgo de un solo VCG en las muestras de palmera de cada jardín de Santa Cruz de Tenerife o, en ocasiones, dos VCG en jardines muy próximos. Teniendo en cuenta estos datos, el autor sugiere que este hecho puede deberse a la introducción masiva del patógeno por medio de plantas infectadas o a la introducción de alguna planta infectada y su posterior propagación (posiblemente a través de la poda). En este sentido, se destaca la importancia de las medidas preventivas para el manejo y el control de la enfermedad, sobre todo en relación con la utilización de material vegetal libre de enfermedades y con la realización adecuada de las labores de poda.

3.2 Características morfológicas

El desarrollo de las colonias del hongo en agar papa D-glucosa (PDA) a 25 ºC durante 7 días posee una tasa de crecimiento promedio de 4.1mm/d. La superficie es seca, algodonosa, blanca en los bordes y rojiza pálida a púrpura en la zona central (aunque variable entre aislados), en algunos casos el borde de la colonia está bien definido y en otros es filamentoso. Los exudados pueden estar ausentes o ser escasos y pequeños. El micelio aéreo en muchos casos es abundante, algodonoso, con moderada esporulación. El reverso de la colonia

posee coloraciones variables, desde amarillo pálido a púrpura. No se observa pigmentación del medio (Fig. 3).

La reproducción se lleva a cabo asexualmente mediante la extensión de sus hifas y la producción de diferentes tipos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los microconidios se desarrollan a partir de estructuras especializadas denominadas fialides y estas a su vez se desarrollan sobre una hifa de corta longitud denominada conidióforo. Están formados por una única célula hialina y son en la mayoría de las ocaciones de forma circular o elíptica. Se disponen en estructuras mucoides llamadas "falsas cabezas" (Fig. 3). Por el contrario, los macroconidios poseen forma curvada, son fusiformes y con septos transversales (multicelulares), y por lo general se forman a partir de un esporodoquio (Fig. 3). Las clamidosporas (escasas o nulas en algunos de los aislados obtenidos de palmeras de Tenerife) se forman a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidios, son circulares y poseen una doble pared gruesa (Fig. 3). Esto le confiere una alta resistencia a condiciones ambientales adversas, por lo tanto, pueden soportar largos periodos de tiempo en el suelo, en el sistema radical de las palmeras muertas o en los restos vegetales deshidratados sin descomponer. Debemos tener en cuenta que las estructuras del hongo pueden estar en las diferentes partes de la planta, y cada una de ellas puede actuar de reservorio y de dispersión del patógeno.

3.3 Características filogenéticas

Como se mencionó anteriormente la primera cita de *Focan* se realiza en Francia en el año 1973 (Mercier y Louvet, 1973). Sin embargo, a pesar de que esta forma especial está citada en una gran cantidad de artículos científicos, la misma no está registrada en las dos bases de datos de microorganismos fúngicos más importantes: *index fungorum* (http://www.indexfungorum.org/) y Mycobank (https://www.mycobank.org/). Asimismo, sorprende la inexistencia de una cepa de referencia internacional y la baja o nula cantidad de depósitos de cepas en las principales colecciones de cultivo tipo (ATCC, CBS, NRRL, CECT, etc)., donde solamente se registran las cepas NRRL 38356, NRRL 26035 (=CBS 130183) y NRRL 38338 provenientes de California y Tenerife (O'Donnell *et al.*, 2009).

Los análisis de diversidad genética de *Focan* realizados por *Plyler et al.* (2000) mediante VCGs, secuencias de ADN mitocondrial y el polimorfismo

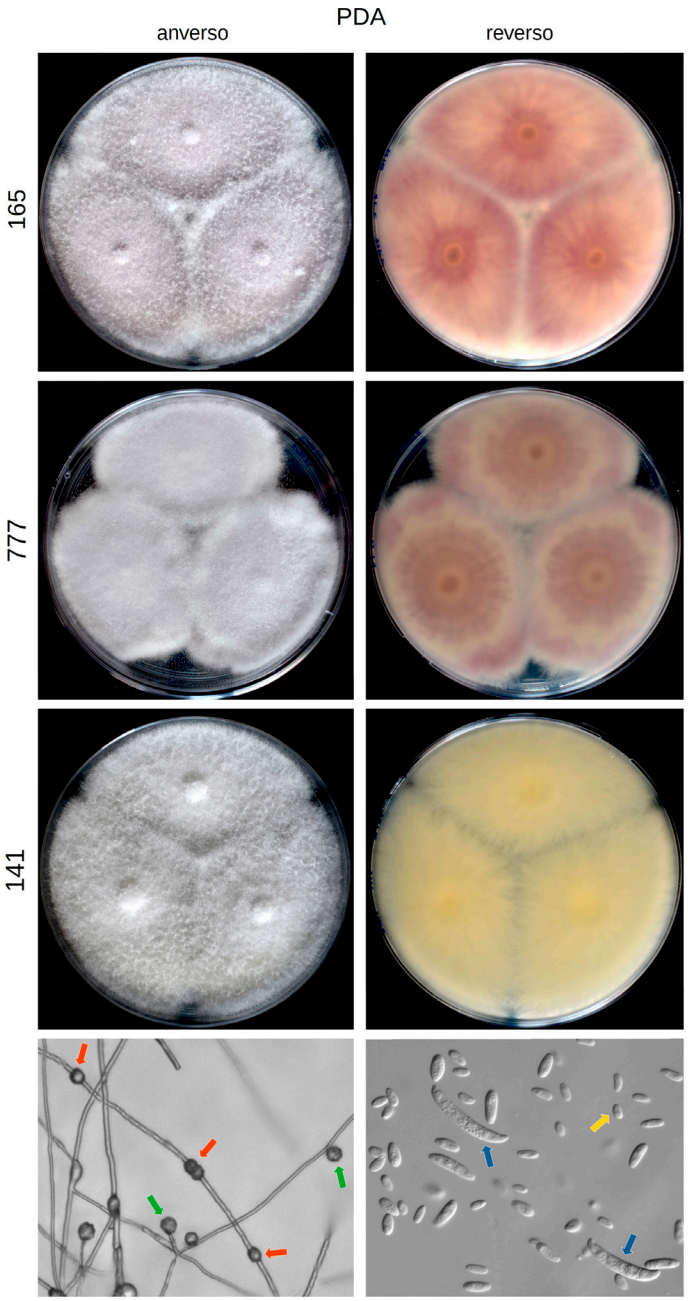


Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de diferentes aislados de *Focan* provenientes de palmeras de Tenerife con síntomas de fusariosis. Las colonias fueron desarrolladas en el medio de cultivo agar papa glucosa (PDA) a 25 ºC durante 7 días en oscuridad (fotografías superiores). Las observaciones microcópicas se realizaron por contraste de interferencia diferencial (DIC) a 200X (fotografía inferior izquierda) y 400X (inferior derecha). En la imagen inferior izquierda se observan los cuerpos de fructificación asexuales o falsas cabezas (flechas verdes) y las clamidosporas (flechas rojas) del hongo, mientras que en la imagen derecha se observan los microconidios (flecha amarilla) y los macroconidios (flechas azules).

en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), demuestran una baja diversidad sobre una colección de aislados de diferentes lugares del mundo (Canarias, Francia, Italia, Japón y USA). A pesar de la amplia representación geográfica de los aislados (aunque con un número escaso), este trabajo concluye que el 70 % de aislados corresponden a un solo VCG y a cuatro haplotipos RFLP (*Restriction*

Fragment Length Polymorphism).
Los estudios realizados por Gunn y Summerell (2002) incluyen un número más alto de aislados provenientes de Australia, y utiliza VCG y ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) para su análisis. El análisis demostró que los aislados australianos y de las otras regiones del mundo son incompatibles (diferentes VCG). Del mismo modo, los aislados australianos fueron muy diversos en el análisis con ERIC, en contraposición con un único haplotipo en el resto de los aislados de las otras zonas. Estos resultados sugirieron que los aislamientos australianos podían tener un origen evolutivo independiente, tal vez a partir de una población autóctona de *F. oxysporum*.
Posteriormente, Laurence *et al*. (2015) realiza un estudio similar por medio del análisis de las secuencias de ADN del factor de elongación de la traducción (*tef1-α*) de los aislados australianos y del resto del mundo. El trabajo demuestra que *Focan* no es un hongo monofilético y describe dos clados filogenéticos: por un lado, los aislados australianos y, por el otro, los aislados del resto del mundo. Sin embargo, en este mismo trabajo, también analizan las secuencias de los genes SIX (*Secreted In Xylem*) asociados a la patogenicidad del hongo, y no observan esta misma separación. Incluso, encuentran una alta homología entre las secuencias de los diferentes aislados. Con estos resultados concluyen que esta incongruencia se puede deber a la transferencia horizontal de genes SIX.
Durante el desarrollo del proyecto ProID2020010127 se realizó la secuenciación parcial del gen *tef1-α* de una serie de aislados obtenidos a partir de diferentes palmeras afectadas por *Focan* en Tenerife. Se realizó un análisis filogenético y evolutivo utilizando diferentes grupos de datos, teniendo en cuenta: i) los análisis descritos anteriormente por Laurence *et al*. (2015), ii) la base de datos utilizada por Haq *et al*. (2022) para el análisis filogenético de aislados de *F. oxysporum* obtenidos a partir de palmera dactilifera (*Phoenix dactylifera*), y iii) la clasificación actual del complejo de especies de *F. oxysporum* (FOSC - *Fusarium oxysporum* species complex) propuesto por Maryani *et al*. (2019).
En el primer análisis las secuencias de los aislados provenientes de las palmeras de Tenerife se agrupan en el clado de los aislados de diferentes partes del mundo (Italia, USA y Japón) y se diferencian claramente de aquellos provenientes de Australia (Fig.4). La única excepción es el aislado RBG2978 de Australia, que también forma parte del grupo constituido por los aislados internacionales. Este resultado es congruente con lo descrito por Laurence *et al*. (2015). Cabe destacar que en este análisis se incluyen tres aislados de Canarias provenientes de otros autores: i) NRRL 26035 depositado en la base GenBank por Cigelnik y O'Donnell (1998) y ii) RBG2242 y 2243 depositados por Laurence *et al*. (2015).
El segundo análisis incluye las secuencias de la mayoría de las formas especiales de *F. oxysporum*. Por lo tanto, nos permite realizar una correcta identificación de los aislados obtenidos en Tenerife. En la Figura 5 se observa que las secuencias de los aislados de Tenerife se agrupan con el resto de los aislados provenientes de diferentes partes del mundo, incluida la secuencia del aislado RBG2678 de Australia. Este grupo de secuencias forman un subclado (68% de bootstrap) dentro de un clado mayor (91% bootstrap) que incluye dos secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (DQ837693/4). Por otro lado, las secuencias de los aislados de Australia, descritos por Laurence *et al*. (2015), se agrupan en un clado de mayor tamaño y separado de *Focan*. Este clado incluye casi todas las formas especiales y en él, las secuencias australianas forman un subclado independiente junto con *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.
El tercer análisis (Fig. 6) incluye las secuencias de todas las especies descritas actualmente en el complejo FOSC (*Fusarium oxysporum species complex*). En esta base de datos las formas especiales no están incluidas, debido a que en el análisis realizado por Maryani *et al*. (2019), y posteriormente por otras publicaciones del grupo del *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (Utrecht, The Netherlands), se reclasifican la mayoría de las categorías subespecíficas en especies nuevas. Un caso "conflictivo" de estos cambios es la reclasificación taxonómica de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 (el agente causal del mal de Panamá más agresivo) en una especie nueva denominada *F. odoratissimum*. Aunque desde el punto de vista taxonómico estricto pueda estar debidamente justificado, esta modificaciones en la nomenclatura produce alteraciones complejas o "peligrosas" con respecto a la lista de microorganismos de cuarentena. Es por ello que la EPPO no incluye o "acepta" esta nueva nomenclatura en la lista de los patógenos de plantas. En el caso de *Focan*, Maryani *et al*. (2019) incluye la secuencia de ADN de la cepa NRRL 26035 en el análisis filogenético del gen *tef-1α*. En el dendrograma de dicha publicación (Fig. 5, pág. 173) se puede observar que esta secuencia se agrupa en el clado 1 con la especie nueva *F. purpurascens*. Sin

embargo, en la descripción de esta especie nueva, no realiza ninguna mención respecto a la relación de esta especie con *Focan*. En el análisis realizado durante el proyecto ProID2020010127 los resultados obtenidos con las secuencias de los aislados de Tenerife de *Focan* son similares al trabajo de Maryani *et al*. (2019). Como se puede observar en la Figura 6, las secuencias de los aislados de Tenerife y del resto de los aislados de *Focan* provenientes de otros lugares del mundo, se agrupan con *F. purpurascens* dentro de un clado mayor del complejo FOSC que incluye a *F. phialophorum* y *F. odoratissimum*. Con respecto a las secuencias australianas del trabajo de Laurence *et al*. (2015), se observa que el grupo que incluye la mayor parte de estas secuencias se agrupa con la nueva especie *F. cugenangense* (Maryani *et al*., 2019), mientras que la secuencia del aislado RBG4215 se agrupa con *F. nirenbergiae* (Lombard *et al*., 2019). Este resultado es coherente con el análisis anterior (donde se incluyen las secuencias de ADN relacionadas con las formas especiales), debido a que en la descripción de *F. cugenangense* se menciona que esta especie nueva está estrechamente relacionada con *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Maryani et al., 2019). Por lo tanto, aparentemente los aislados australianos del trabajo de Laurence *et al*. (2015) no

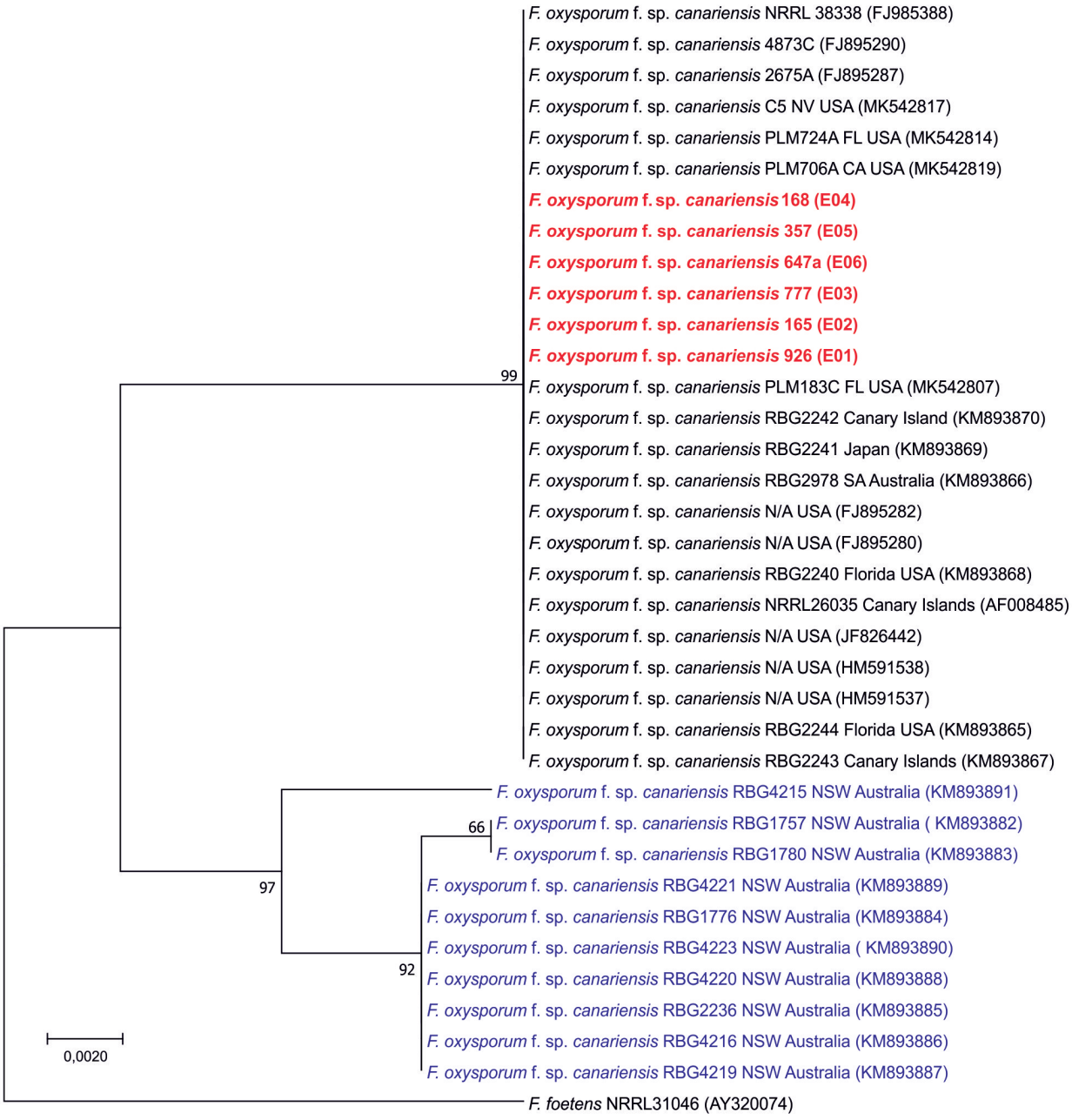


Figura 4. Relaciones filogenéticas inferidas a partir de las secuencias parciales del gen *tef1-α*, de los aislados de *Focan* obtenidos de palmeras de Tenerife y de otras zonas del mundo. El análisis se efectuó con el método de máxima verosimilitud (basado en 1000 bootstrap). Los códigos de acceso al GenBank se indican entre paréntesis. Los aislados obtenidos y secuenciados durante este trabajo se identifican con letra de color rojo, mientras que aquellos provenientes de Australia (Laurence *et al*., 2015) con letra azul.

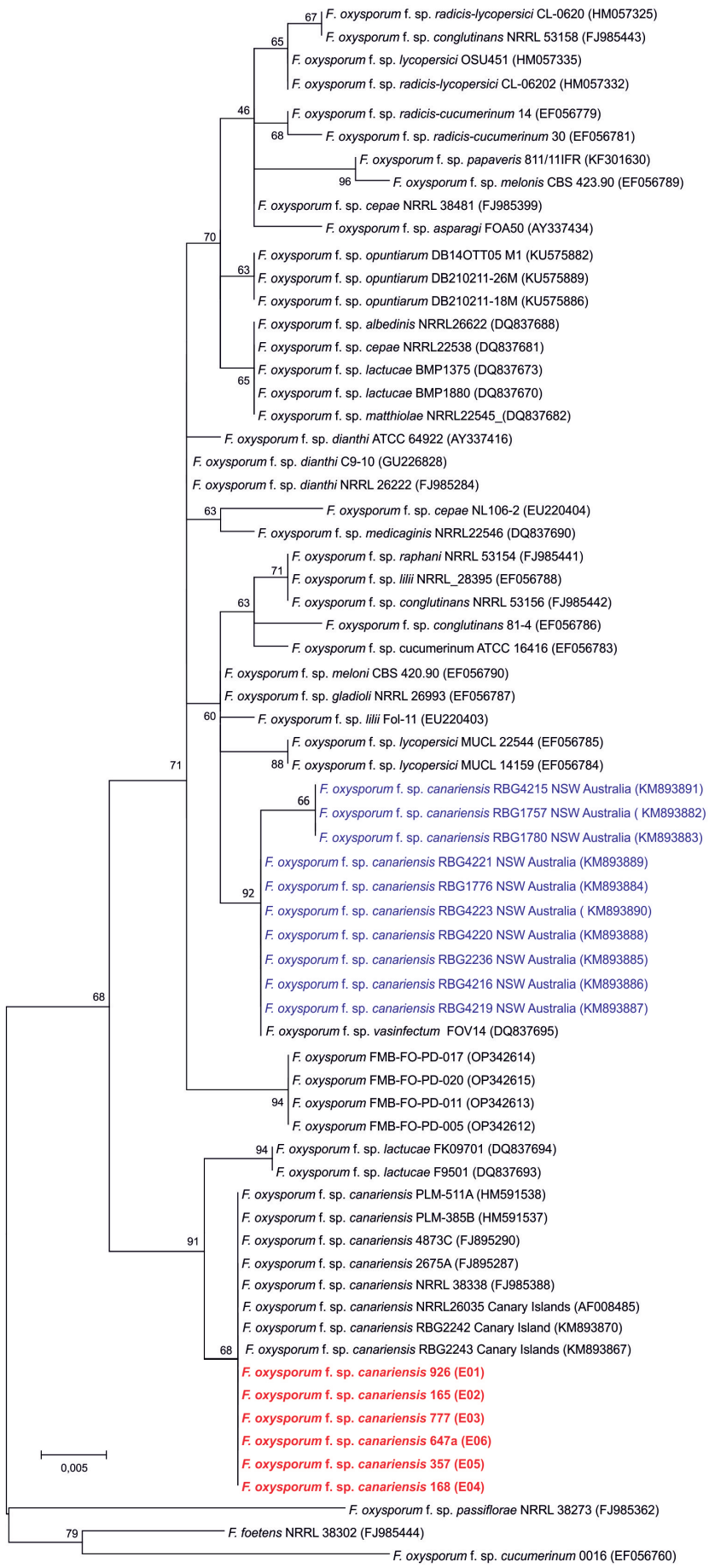


Figura 5. Relaciones filogenéticas inferidas a partir de las secuencias parciales del gen *tef1- α* de diferentes *formae speciales* del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC). El análisis se efectuó con el método de máxima verosimilitud (basado en 1000 bootstrap). Los códigos de acceso al GenBank se indican entre paréntesis. Los aislados obtenidos y secuenciados durante este trabajo se identifican con letra de color rojo, mientras que los aislados provenientes de Australia, con letra azul.

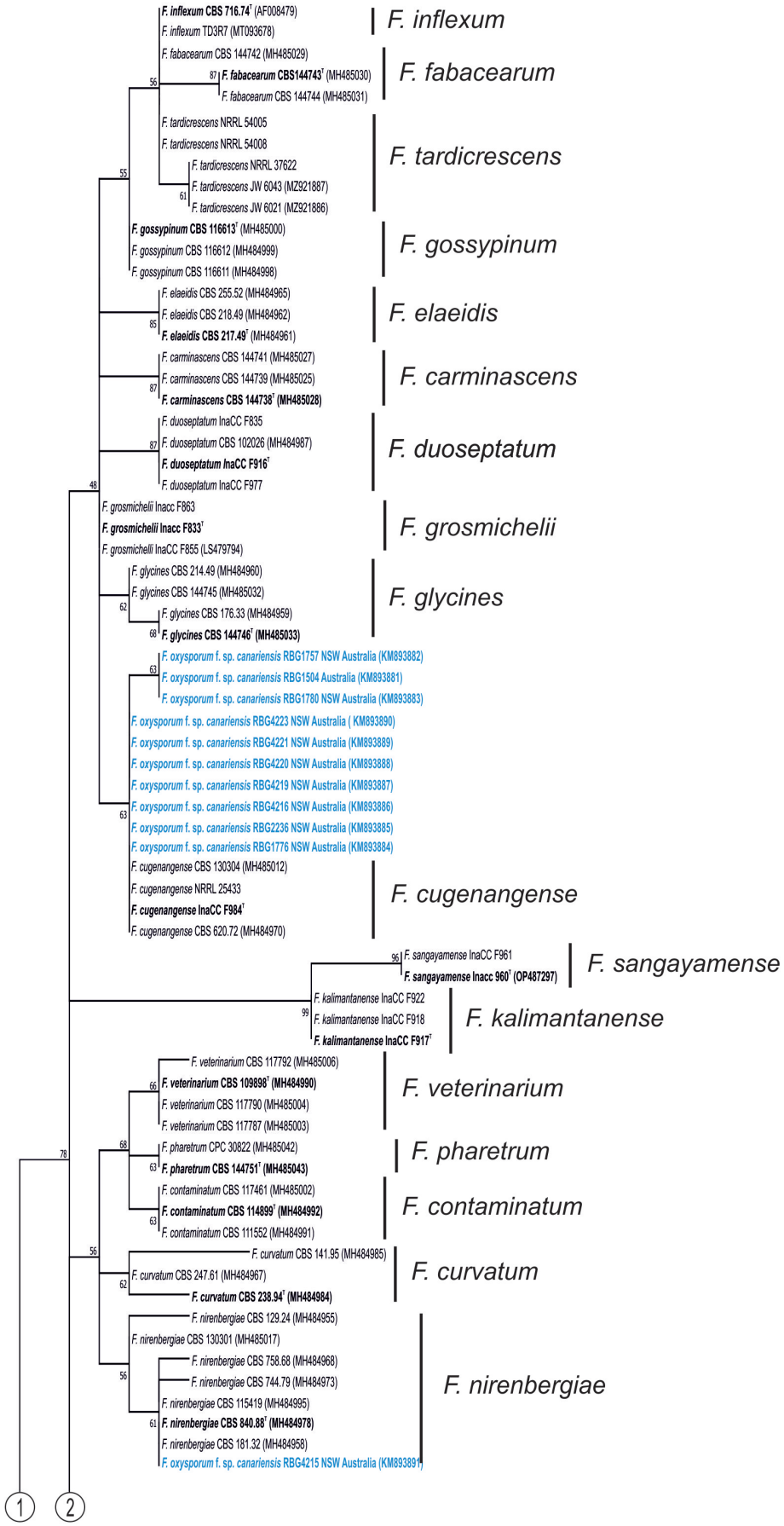


Figura 6. Relaciones filogenéticas inferidas a partir de las secuencias parciales del gen *tef1- α* de diferentes aislados de *Focan* obtenidos a partir de palmeras de Tenerife y del complejo de especies FOSC definido por Maryani *et al.* (2019). El análisis se efectuó con el método de máxima verosimilitud (basado en 1000 bootstrap). Los códigos de acceso al GenBank se indican entre paréntesis. Los aislados obtenidos y secuenciadosdurante este trabajo se identifican con letra de color rojo, mientras que los aislados provenientes de Australia, con letra azul.

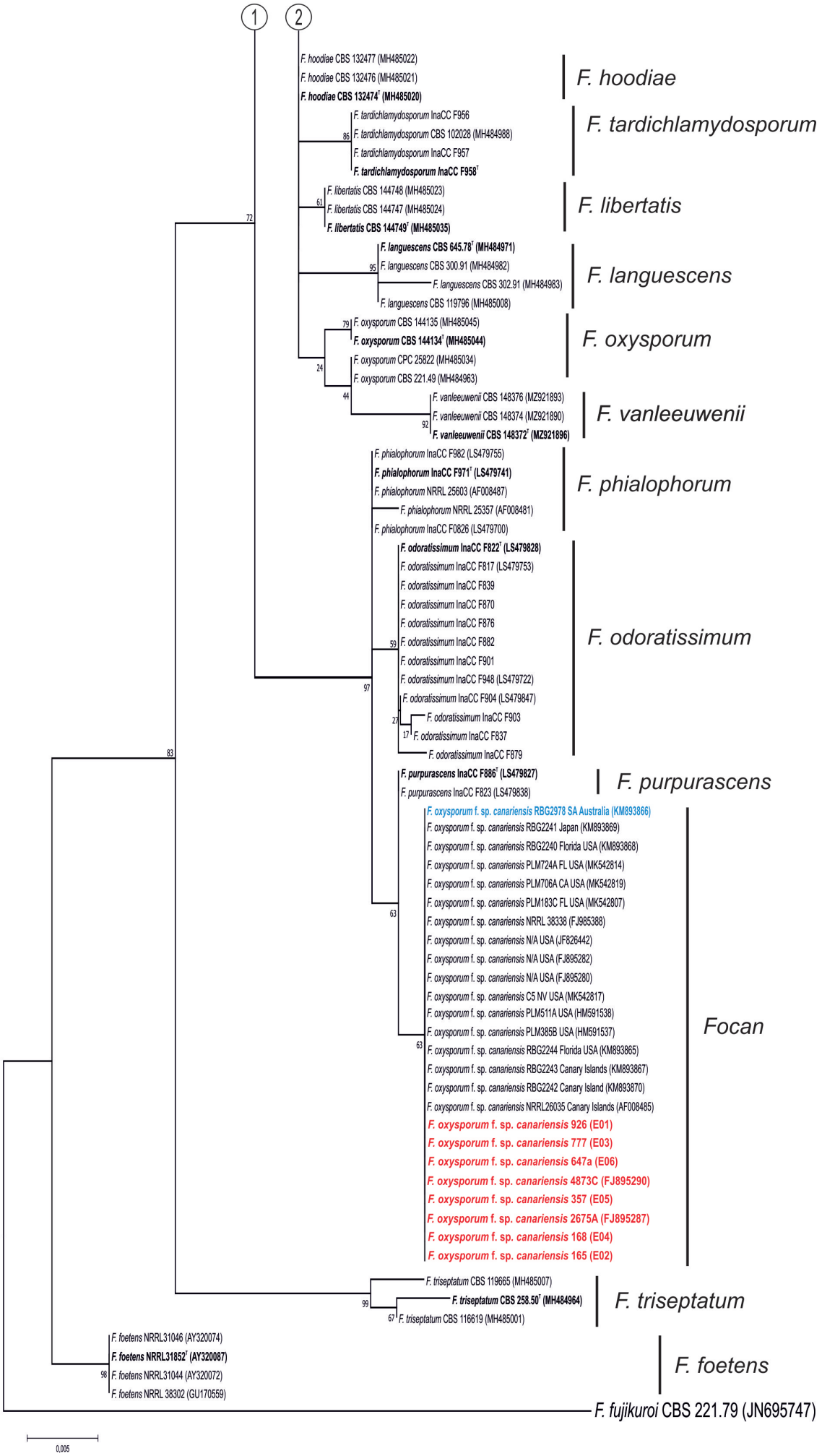


Figura 6. Continuación

estarían correctamente identificados como *Focan*, ya que como se puede observar en la Figura 6, nuestros análisis nos indican que la identificación de la mayoría de estos aislados corresponde a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (=*F. cugenangense*), mientras que el aislado RBG4215 corresponde a *F. nirenbergiae*. Teniendo en cuenta los análisis realizados y la nomenclatura actual del complejo FOSC, las preguntas que nos podemos hacer ahora son: ¿cómo se debería clasificar actualmente a *Focan*? ¿es una variante de *F. purpurascens*? La revisión más actual del genero *Fusarium* la realizan Crous *et al*. (2021) y consideran que *F. purpurascens* es una sinonimia de *F. odoratissimum*. Por lo tanto, ¿*Focan* debería describirse como una especie nueva? Debemos tener en cuenta que la *forma specialis* no es un rango taxonómico y no está codificada por el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Art. 4 Nota 4). En otras palabras, la definición de una nueva *forma specialis* no sigue las reglas de nomenclatura establecidas por este código. Edel-Hermann y Lecomte (2019) proponen una serie de requisitos mínimos para la descripción de una forma especial, entre los cuales se hace referencia a una correcta evaluación de la especificidad entre la cepa patógena y la planta hospedante, el depósito de los aislados en una colección de cultivos internacional, la publicación en una revista indexada, y la identificación morfológica y molecular. Sin embargo, si consideramos que los genes implicados en los procesos de patogenicidad pueden ser transferidos entre individuos relacionados genéticamente, la descripción de una forma especial puede llegar a ser muy variable.

4. ELIMINACIÓN DE FITOPATÓGENOS DURANTE EL PROCESO DE COMPOSTAJE

La producción de compost, así como su aplicación en el sector agrícola, la jardinería o la regeneración de áreas degradadas en sustitución de otras enmiendas orgánicas y como contribución al ahorro de fertilizantes minerales, es promovido por la Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular (BOE núm. 85, de 9 de abril de 2022). El agregado de compost al suelo aporta materia orgánica e introduce una alta variedad de microorganismos implicados en el ciclo de diferentes nutrientes y en procesos de biocontrol de fitopatógenos. Cabe destacar el rol que cumple el compost de alta calidad en la recuperación de los suelos, cuya microbiota ha sido afectada por un excesivo laboreo o por la acumulación de compuestos fitosanitarios.

Durante el proceso de compostaje se lleva a cabo una compleja sucesión de comunidades microbianas que a través de reacciones principalmente bioxidativas, transforman la materia orgánica en formas más estables que denominamos compost maduro. La sucesión de estos microorganismos generalmente se asocia a la temperatura, donde podemos distinguir distintas fases: mesófila, termófila, termófila extrema, enfriamiento y maduración. Diferentes estudios demuestran que el compostaje es un método efectivo para eliminar microorganismos patógenos (Noble y Roberts, 2004). A través de este proceso los patógenos de las plantas pueden eliminarse por tres causas principales: 1) las altas temperaturas de la fase termófila (55–70 ºC) que provocan la higienización o "sanitización" del compost (Yuen y Raabe, 1984; Bollen, 1993); 2) la producción de compuestos fenólicos antimicrobianos, producidos durante la descomposición de la lignocelulosa; 3) la proliferación de una microbiota muy diversa capaz de competir por nutrientes y/o producir compuestos antimicrobianos específicos que reducen la supervivencia de los fitopatógenos (Hoitink y Boehm, 1999). Los tres factores son deseables para garantizar un compost de alta calidad y la eliminación de las plagas y los fitopatógenos. Por lo tanto, el reciclaje de los desechos de palmera mediante el compostaje, puede ser una alternativa viable para evitar o reducir su descarte en el vertedero y para realizar una gestión más eficiente de los recursos disponibles, siempre que se realice una correcta higienización de la materia orgánica para garantizar la inocuidad del producto final (compost maduro). En este sentido el RD 865/2010, de 2 de julio, entre sus requisitos, menciona que los sustratos de cultivo no deben ser portadores de plagas ni patógenos causantes de enfermedades de los vegetales.

La bibliografía nos ofrece mucha información con respecto al efecto del compostaje sobre el control y la supervivencia de plagas y enfermedades. La elevada temperatura y el tiempo de exposición durante la fase termófila parecen ser los factores más importantes, fáciles de monitorizar y regular durante el proceso de compostaje para conseguir su higienización (Elorrieta *et al*., 2003; Suárez Estrella *et al*., 2007). El efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los microorganismos está determinado por el tiempo de exposición (Elorrieta *et al*. 2003; Fayolle *et al*., 2006), y es característica de cada especie o población

microbiana. En términos generales, una disminución de la temperatura se puede contrarrestar con un incremento del tiempo de exposición. Aunque todo dependerá del inóculo o la concentración inicial de los microorganismos en el sustrato. La humedad es otro factor a tener en cuenta: el calor húmedo favorece la disipación y la desnaturalización de las proteínas, debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen la estructura tridimensional (Madigan *et al*., 2015). Durante el proceso de compostaje, la humedad recomendada para garantizar la transferencia de calor por todas las zonas de la pila es mayor al 45%. De lo contrario, la temperatura no tendría una distribución uniforme y determinadas zonas de la pila (especialmente la superficie), podrían quedar a una temperatura inferior a la estimada para eliminar los patógenos (Agnew y Leonard, 2003; Wichuk *et al*., 2011).
Por lo tanto, para lograr una correcta desinfección o higienización de los residuos, es importante homogeneizar adecuadamente los materiales durante el compostaje. Por ello, para optimizar el proceso, es necesario adecuar los volteos en función de la temperatura, la humedad y el oxígeno de la pila.
Determinadas organizaciones establecen las condiciones que se deben cumplir durante el proceso de compostaje para eliminar o para disminuir la población de patógenos por debajo de los límites de detección. La EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), la BioAbfV (German Ordinance on the Utilisation of Biowastes on Land used for Agricultural, Silvicultural and Horticultural Purposes) y el BSI (Bristish Standards Institute) establecen una temperatura mayor a 65 ºC durante al menos 7 días con una humedad mayor al 40-50%. Asimismo, para el caso de los residuos que contienen patógenos termotolerantes o especies plaga en cuarentena, la EPPO (2008) recomienda un tratamiento adicional de calor húmedo (90 ºC, 1h o 80 ºC, 2 h o 74 ºC, 4 horas) antes o después del compostaje.
La normativa española en materia de compostaje está regulada por la legislación de productos fertilizantes (RD 999/2017) y por la legislación sobre sustratos de cultivos (RD 1039/2012). El RD 999/2017 complementa al Reglamento Europeo (CE) 2019/1009 del Parlamento y del Consejo Europeo de 5 de junio de 2019 por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes en la UE. En este se especifican algunas de las condiciones que se deben cumplir durante el proceso de compostaje, para garantizar la correcta higiene del material de acuerdo a los siguientes perfiles de variación de la temperatura en función del tiempo: >70 ºC, 3d o >65 ºC, 5 d o >60 ºC, 7 d o >55 ºC, 14 d.

5. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*

La gestión adecuada de los residuos orgánicos es de vital importancia para el control de cualquier organismo patógeno capaz de afectar la salud animal, vegetal y ambiental. Como se expresó en el apartado anterior, la temperatura de la fase termófila del compostaje nos permite higienizar los residuos orgánicos y eliminar (total o parcialmente) los patógenos. En el caso concreto de la palmera canaria, las dos amenazas más importantes desde el punto de vista de la sanidad vegetal son: el picudo de las cuatro manchas del cocotero (*D. frumenti*) y la fusariosis (*Focan*).
En relación al control de *D. frumenti* durante el compostaje, los trabajos de Ramos Cordero *et al.* (2018; 2021) nos demuestran claramente su eficiencia. En este caso, el compostaje de restos de palmera inoculados con la plaga durante un proceso de corta duración (42 días) y una temperatura mayor a 55 ºC durante al menos 7 días, fueron suficientes para eliminar la plaga.
Con respecto a la supervivencia de *Focan* no se encontraron referencias bibliográficas específicas para esta forma especial. No obstante, existen antecedentes relacionados con otras formas especiales de la misma especie. En este sentido, Chakroune *et al*. (2008) demostraron la capacidad del compost maduro de palmera datilera (*P. dactylifera*) para limitar la propagación y disminuir la severidad de la fusariosis vascular producida por *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. Estos autores atribuyen la capacidad biocontroladora del compost a la presencia de bacterias y hongos del compost y a la producción de sustancias inhibitorias (fungistáticas).
En otro trabajo, Suárez-Estrella *et al*. (2003) demostraron el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* por medio de ensayos *in vitro* o en compostajes a pequeña escala. En el primer caso, 55-65 ºC durante 4-5 días fueron necesarios para provocar la mortalidad del patógeno, mientras que en las pequeñas composteras la eliminación ocurría en todos los casos en que se superaban picos de temperatura de 50-70 ºC durante 4 días. Por su parte, Noble *et al*. (2004) determinaron que *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* podrían ser eliminados

durante el compostaje con una temperatura de 51 ºC a lo largo de 7 días. Posteriormente, Noble *et al.* (2011) definieron temperaturas de 50-55 ºC durante 4-14 días para eliminar a *F. oxysporum* f. sp. *cepae* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en condiciones *in vitro*, y especificaron una mayor tolerancia a la temperatura de la última especie mencionada. En otro trabajo con *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Bennett (2012) analizó la viabilidad de las clamidosporas en un ambiente húmedo y determinó que después de 6 días a 40 ºC estas estructuras no eran viables.

Durante la realización del proyecto ProID2020010127 se llevaron a cabo tres ensayos diferentes con la finalidad de analizar la capacidad de desarrollo y la viabilidad de *Focan* a diferentes temperaturas. A continuación, se describe cada uno de ellos.

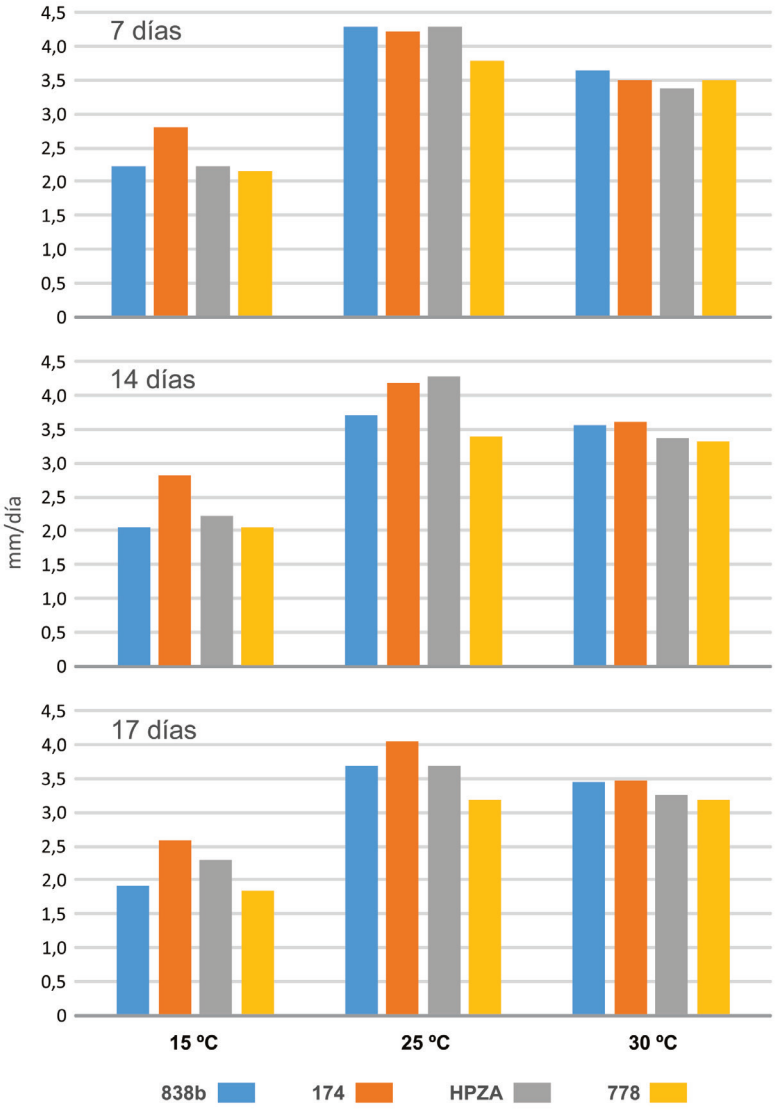


Figura 7. Tasa de crecimiento de diferentes aislados de *Focan* (Tenerife) desarrolladas en PDA a 15, 25 y 35 ºC durante 7, 14 y 17 días en oscuridad.

5.1 Desarrollo de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* a diferentes temperaturas

El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad de crecimiento de *Focan* a diferentes temperaturas en condiciones controladas. Para ello se inocularon cuatro aislados del hongo (provenientes de palmeras de diferentes sitios de Tenerife) en placas de Petri con el medio de cultivo PDA. A continuación, las placas fueron incubadas a 15, 25, 30, 35 y 40 ºC durante 17 días. El desarrollo fúngico se determinó cada 24 h a través de la medición del radio de las colonias y paralelamente se observaron las variaciones morfológicas en cada una de las temperaturas. Una vez finalizado el ensayo se determinó la tasa de crecimiento diaria (mm/día).

La mayor tasa de crecimiento para todos los aislados se observó a 25 ºC (41 mm/día). Mientras que a 30 ºC la tasa de crecimiento fue de 35 mm/día y a 15 ºC de 23 mm/día (valores promedio de los 4 aislados en los primeros 7 días de la evaluación) (Figura 7). A los 30 ºC el desarrollo de los cuatro aislados fue similar, mientras que a 25 ºC el menor desarrollo se observó en el aislado 778 y a 15 ºC el mayor desarrollo se observó en el 174-2. Esto demuestra que existen diferentes capacidades adaptativas entre los diferentes aislados. A 35 y 40 ºC no se observó crecimiento fúngico.

5.2 Viabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* a diferentes temperaturas

El objetivo de este ensayo fue evaluar la viabilidad de *Focan* a diferentes temperaturas en condiciones controladas. Para ello se realizaron una serie de ensayos. En primer lugar, se inocularon los diferentes aislados de *Focan* en el medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 ºC durante 7-10 días. Posteriormente se recolectaron los conidios y fragmentos de hifas superficiales en una solución de KCl (0,85%) estéril mediante un asa de Digralsky, y se trasvasaron a un Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 200 ml de semillas de cebada (previamente hidratadas y esterilizadas). Para ello se utilizó una relación de inóculo de una

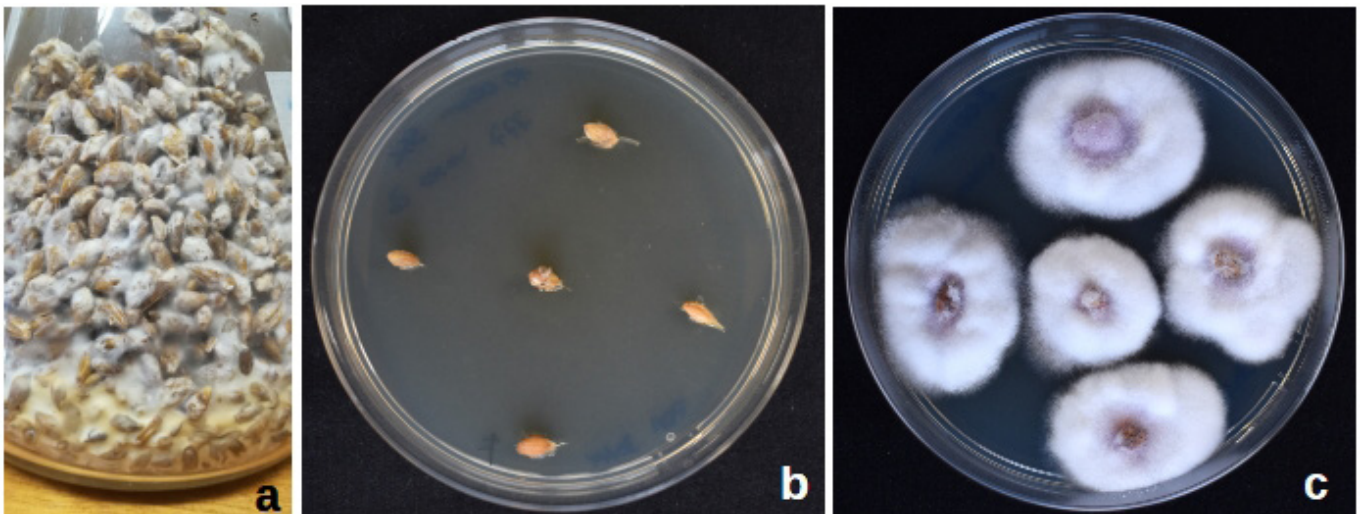


Figura 8. Semillas de cebada inoculadas con *Focan* y expuestas a diferentes temperaturas. a) Semillas colonizadas por el micelio del hongo previo al tratamiento térmico. b) Semillas de cebada sobre PDA después del tratamiento a 65 ºC durante 24 h. El hongo no sobrevive a estas condiciones. c) Semillas de cebada sobre PDA (tratamiento control a 25 ºC). Se observa el desarrollo del micelio a partir de la cebada.

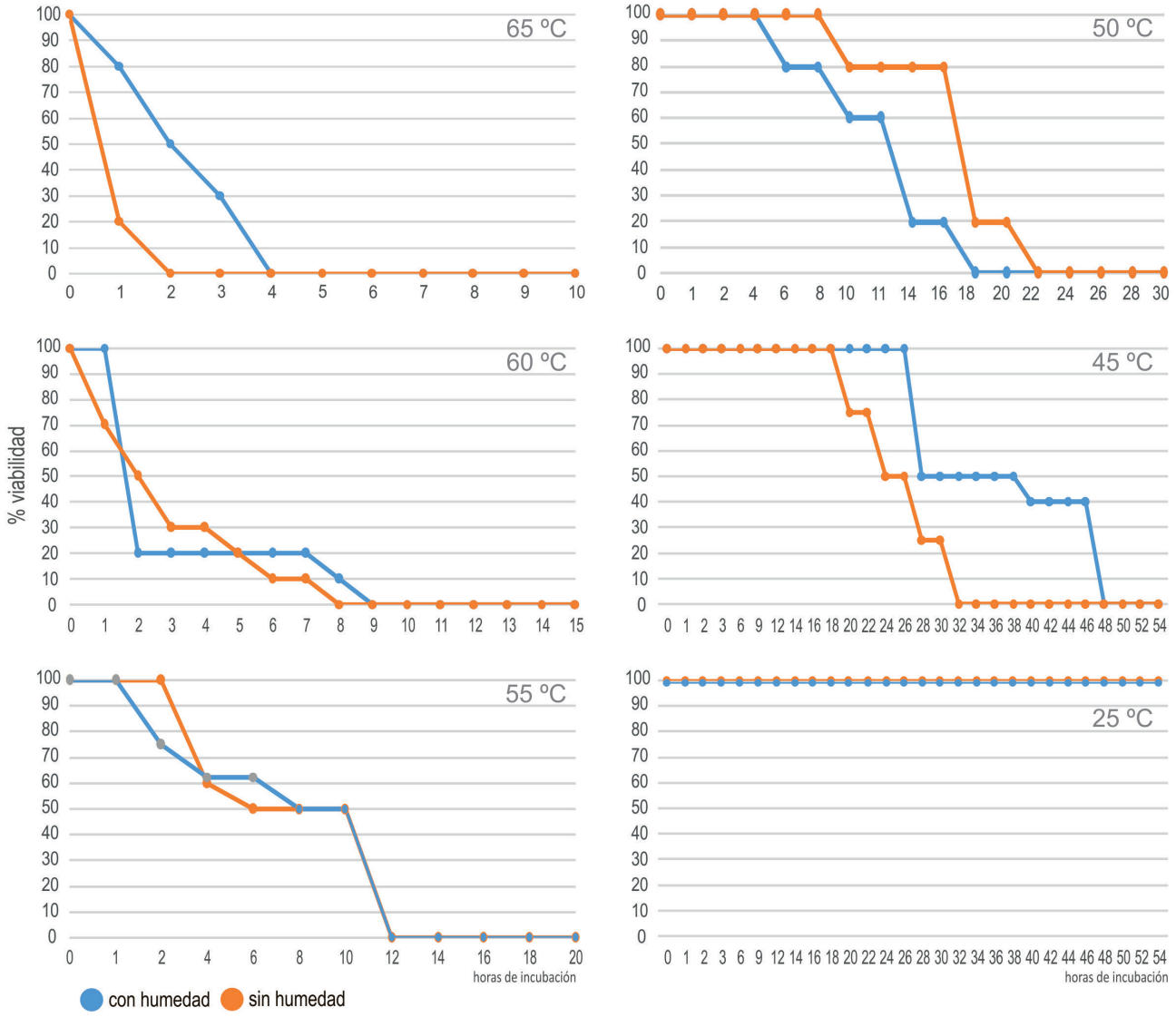


Figura 9. Porcentaje de viabilidad *in vitro* de *Focan* a diferentes temperaturas y tiempo de exposición. Los ensayos se realizaron con cuatro aislados diferentes. Los resultados de las gráficas corresponden al aislado con mayor tolerancia a la temperatura.

placa de Petri de cada aislado por cada Erlenmeyer con cebada. La incubación se realizó a 25 ºC hasta la completa colonización de las semillas (Fig. 8a). Para favorecer una correcta y homogénea distribución del micelio del hongo sobre la superficie de la semilla, los Erlenmeyers fueron rotados periódicamente.
Una vez desarrollado el micelio sobre la superficie de las semillas de cebada, las mismas fueron trasvasadas a recipientes plásticos de 250 ml de capacidad (100 semillas por recipiente) de dos formas diferentes: a) recipientes con semillas únicamente (denominado tratamiento "seco"), y b) recipientes con un trozo de algodón saturado en agua (denominado tratamiento "húmedo"). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado y con diferentes aislados, y cada uno de ellos fue incubado a: 45, 50, 55, 60 y 65 ºC. En simultáneo se realizó un tratamiento control a 25 ºC. Una vez iniciada la incubación a las diferentes temperaturas se llevaron a cabo las pruebas de viabilidad del hongo a través del tiempo. Para la evaluación de la viabilidad, se extrajeron entre 4 y 6 semillas de cebada en cada momento de evaluación y se depositaron sobre placas de Petri con medio PDA incubadas a 25 ºC. Transcurrido de 7 a 15 días se evaluó el desarrollo del micelio fúngico y se registró el número de semillas "positivas" (con desarrollo del hongo) y "negativas" (sin desarrollo del hongo) (Fig.8). La Figura 9 (b y c) resume los resultados observados en los diferentes aislados.

5.3 Viabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* en restos de palmera compostados

El objetivo de este ensayo fue evaluar la viabilidad de *Focan* en condiciones de compostaje. Para ello se prepararon composteras cilíndricas de 790 litros construidas con malla galvanizada termosoldada (Fig.10). El compost se realizó mezclando restos de palmera triturada con cama de cabra con estiércol, con una relación C:N inicial de 30:1. Dentro de esta compostera se ubicaron 5 microcomposteras de 5 litros de capacidad cada una (Fig.11) con restos de raquis de palmera con síntomas naturales de *Focan* fragmentados en dos tamaños diferentes (5 y 15 cm). Dichos restos fueron recolectados en una palmera con síntomas visibles de fusariosis, corroborando la identificación de *Focan* mediante el aislamiento del hongo y posterior identificación por secuenciación del gen *tef1-α*. Una vez elaborada la mezcla e introducidas las microcomposteras en su interior, se cubrió con una tela protectora y se dejó



Figura 10. Compostera de 790 litros de capacidad utilizada para el análisis de la sucesión de microorganismos durante el compostaje y para las pruebas de viabilidad de *Focan*. A: Inicio del proceso de compostaje. B: Fase termófila. C: Primer volteo (40 días).

compostar durante 40 días de acuerdo a la evolución de la temperatura. La medición de este parámetro se realizó cada 15 minutos con un datalogger de temperatura Serie LOG210 (LabProcess), observándose la temperatura máxima (52 ºC) a los 15 días de iniciado el proceso y 9 días con más de 45 ºC. Transcurrida esta primera etapa, una vez que la temperatura descendió y se estabilizó a 35 ºC, se realizó el primer volteo y se extrajeron muestras de raquis de las microcomposteras para su análisis. El mismo se llevó a cabo fraccionando longitudinalmente en cuatro trozos cada uno de los raquis muestreados (3 unidades de 5 cm y 3 unidades de 15 cm por cada microcompostera). Más tarde, se extrajeron (con un bisturí) fragmentos de tejido desde el interior del raquis y se depositaron sobre placas de Petri con PDA suplementado con estreptomicina (0,3 g/l). Las placas se incubaron a 25 ºC y se observaron las colonias desarrolladas.

Se observó una alta contaminación con *Aspergillus* a partir de los trozos de raquis. No obstante, se aislaron todas las colonias con aspecto microscópico similar a *Fusarium* en PDA y se incubaron a 25 ºC durante 7 días. Las colonias aisladas fueron observadas nuevamente al microscopio y ninguna de ellas fue identificadas como *Focan*. Por lo tanto, en estas condiciones, el compostaje ha sido eficiente para eliminar o disminuir el inóculo del patógeno a niveles indetectables mediante las técnicas dependientes de cultivo utilizadas.

En un trabajo previo se analizó la viabilidad del patógeno durante un proceso de compostaje de corta duración (42 días) y a gran escala (Laich y Pérez Parrado, 2021). En este caso se utilizaron microcomposteras de 700 ml de capacidad con una mezcla de raquis y semillas de cebada inoculadas artificialmente con el patógeno. Las microcomposteras se ubicaron a diferentes alturas y sitios de la pila de compost, y una vez finalizado el proceso de compostaje se evaluó la viabilidad del patógeno. El análisis realizado en este caso, permitió determinar que el proceso de compostaje no fue capaz de provocar una mortalidad homogénea del patógeno en las diferentes zonas de la pila. En una pila de compost de grandes dimensiones la elevación de la temperatura es mayor que en una compostera pequeña. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la temperatura no es igualmente uniforme en toda la pila de compost, especialmente en las capas externas donde el calor se disipa hacia la atmósfera. Por lo tanto, es importante realizar los volteos necesarios para lograr que todo el material a compostar sea sometido a temperaturas termófilas y de esta forma garantizar una correcta higienización (Guo *et al*., 2007).

En conclusión, las temperaturas recomendadas por la EPPO durante el proceso de compostaje (más de 65 ºC durante al menos 7 días, humedad >40-50%) serían suficientes para eliminar o disminuir a *Focan* a concentraciones inferiores a las detectables mediante técnicas dependientes de cultivo. Como se demuestra en este trabajo, la mortalidad de este patógeno en condiciones *in vitro* se produce después de dos o cuatro horas a 65 ºC (sin humedad y con humedad, respectivamente) y su capacidad de desarrollo es inhibida a temperaturas superiores a 35 ºC. No obstante, para lograr las condiciones recomendadas de manera homogénea en todo el material compostado, es necesario llevar a cabo un control estricto del proceso de compostaje.



Figura 11. Trozos de raquis con *Focan* (a) utilizados para compostar en las microcompostera de 5 litros de capacidad (b) situadas dentro de composteras de mayor tamaño (c, d). Trozos de raquis y restos de palmera con actinobacterias (e) y hongos filamentosos en superficie (f) después de 40 días de compostaje.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agnew JM, Leonard JJ. 2003. The physical properties of compost. Compost Science & Utilization 11(3):238-264.

Arai K, Yamamoto A. 1977. New *Fusarium* disease of Canary Island date palm in Japan. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University 27:31–7.

Bennett RS. 2012. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Chlamydospores under Solarization Temperatures. Plant Disease 96(10):1564-1568.

Bishop CD. Cooper RM. 1983. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. Physiological Plant Pathology 23: 323-343.

Bollen GJ. 1993. Factors involved in inactivation of plant pathogens during composting of crop residues. Pages 301–318. En: Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects. Harry A J Hoitink and Harold M Keener, eds. Renaissance Publications, Worthington, OH. 728 p.

Corte A. 1973. La tracheomicosi da *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* della *Phoenix canariensis*. Notiziarios ulle Malattiedelle. Piante 88/89:107–17.

Crous PW, Lombard L, Sandoval-Denis, *et al*. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. Studies in Mycology 98:100116.

Chakroune K, Bouakka M, Lahlali R, Hakkou A. 2008. Suppressive effect of mature compost of date palm by-products on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Plant Pathology Journal 7:148-154.

Dean R, Van Kan JA, Pretorius Z A, Hammond-Kosack K E, Di Pietro A, Spanu P D, *et al*. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13:414–430.

Edel-Hermann V, Lecomte C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum forma especiales* and races. Phytopathology 109:512–530.

Elena K. 2004. *Fusarium* wilt of *Phoenix canariensis*: first report in Greece. New Disease Reports 10, 31.

Elorrieta MA, Suárez Estrella F, Lopez MJ, Vargas Garcia MC, Moreno J. 2003. Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. Agric. Ecosyst. Environ. 96:141–146.

EPPO. 2020. European and Mediterranean Plant Protection Organization Global Database. *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* (FUSACS). Disponible en: https://https://gd.eppo.int/taxon/FUSACS (consultado en abril 2023).

Fayolle L, Noble R, Conventry E, Aime S, Alabouvette C. 2006. Eradication of *Plasmodiophora brassicae* during composting of wastes. Plant Pathology 55:553-558.

Feather TV, Ohr HD, Munnecke DE. 1979. Wilt and dieback of Canary Island palm in California. California Agriculture 33:19–20.

Feather TV, HD Ohr, DE Munnecke, JD Carpenter. 1989. The occurrence of *Fusarium oxysporum* on *Phoenix canariensis*, a potential danger to date production in California. Plant Disease 73:78–80.

Fernandez D, Plyler TR, Kistler HC. 1997. The *Phoenix* spp. pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* are distinct genetic entities as evidenced by molecular markers. Proceedings of the 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 1997-06-01/05, Montpellier (FR), 195-197.

Fernández Palacios JM, Delgado Bello JA (Eds). 2008. Los bosques termófilos de canarias. Proyecto LIFE04/NAT/ES/000064. Excmo. Cabildo Insular de Tenerife. Santa Cruz de Tenerife. 192 pp.

Gordon TR, Martyn RD. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol. 35:111-128.

Gordon T. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. Annu. Rev. Phytopathol. 55:23–39.

Gunn LV, Summerell BA. 2002. Differentiation of *Fusarium oxysporum* isolates from *Phoenix canariensis* (Canary Island Date Palm) by vegetative compatibility grouping and molecular analysis. Australasian Plant Pathology 31:351–358.

Guo Y, Zhu N, Zhu S, Deng C. 2007. Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. J Appl Microbiol. 103:1344–1354.

Haq IU, Ijaz S, Khan NA, Khan IA, Ali HM, Moya-Elizondo, EA. 2022. Integrative Pathogenicity Assay and Operational Taxonomy-Based Detection of New *forma specialis* of *Fusarium oxysporum* Causing Date palm Wilt. Plants 11:2643.

Hernández-Hernández J, Espino A, Rodríguez-Rodríguez JM, Pérez-Sierra A, León M, Abad-Campos P, Armengol J. 2010. Survey of diseases caused by *Fusarium* spp. on palm trees in the Canary Islands Phytopathol. Mediterr. 49:84–88

Hernández J. 2011. Fusariosis de la palmera canaria. XXXVIII Congreso Nacional de Parques y Jardines Públicos. Las Palmas de Gran Canaria.

Hernández J. 2014. Transmisión experimental de las fusariosis mediante instrumentos de poda y estudio preliminar de la susceptibilidad tolerancia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* en germoplasma de palmerales naturales de la isla de Tenerife. En: Proyecto Palmera 2011 – 2014. GMR Canarias (Ed). 9-29 pp.

Hoitink H, Boehm M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A Substrate-Dependent Phenomenon. Annu. Rev. Phytopathol. 37:427-446.

Jangir P, Mehra N, Sharma K, Singh N, Rani M, Kapoor R. 2021. Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. Front Plant Sci. 22(12):628611.

Joshi R. 2018. A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. Journal of Medicinal Plants Studies 6:112-115.

Kashyap A, Planas-Marquès M, Capellades M, Valls M, Coll NS. 2021. Blocking intruders: inducible physico-chemical barriers against plant vascular wilt pathogens. Journal of Experimental Botany 72(2):184–198.

Laich F, Pérez Parrado P. 2021. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* durante el proceso de compostaje. Phytoma, España 333:140.

Lan CZ, Dai YL, Gan L, Yao JA, Yang X (2020) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* causing *Fusarium* wilt on Canary Island date palm (*Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud) in China. Journal of Plant Pathology 102:569–570.

Laurence MH, Summerell BA, Liew ECY. 2015. *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*: evidence for horizontal gene transfer of putative pathogenicity genes. Plant Pathology 64:1068–1075.

Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht SC, Crous PW. 2019. Epitypification of *Fusarium oxysporum* - clearing the taxonomic chaos. Persoonia 43:1-47.

Madigan MT, Martinko JM, Bender K, Buckley D, Stahl D. 2015. Brock.Biología de los microorganismos. 14ª Edición. Pearson Educación SA. Prentice Hall. Madrid.

Mandeel Q, Baker R. 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81:462-469.

Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. Studies in Mycology 92:155-194.

Mercier S, Louvet J, 1973. Recherches sur les fusarioses. X. Une fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum*) du palmier des Canaries (*Phoenix canariensis*). Annales de Phytopathologie 5:203–11.

Michielse C, Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular plant pathology 10:311–324.

Morici C 1998. *Phoenix* in the wild. Principes 42:85-89.

Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical microbiology reviews. p. 479-504.

Noble R, Roberts SJ. 2004. Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review. Plant Pathology 53:548-568.

Noble R, Jones PW, Coventry E, Roberts SR, Martin M, Alabouvette C. 2004. Investigation of the effect of the composting process on particular plant, animal and human pathogens known to be of concern for high quality end-uses. Warwick HRI (Wellesbourne), BBSRC Institute for animal Health (Compton) and UMR INRA-Université de Bourgogne (France). Waste & Resources Action Programme, Banbury.

Noble R. 2011. Risks and benefits of soil amendment with composts in relation to plant pathogens. Australasian Plant Pathology 40:157–167.

O'Donnell K, Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol. Phylogenet. Evol. 7:103–116.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95:2044–2049.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Lee Tv, Moretti A, Kang S, Kim HS, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Corby Kistler H, Elliott M, Davis M, Sarver BA. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genet Biol. 46(12):936-48.

O'Donnell K, Ward TJ, Robert VAR, Crous PW, Geiser DW Kang S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. Phytoparasitica 43:583–595.

Palmucci HE. 2005. *Fusarium oxysporum* causal agent of wilt on crop fields of *Phoenix canariensis* in Buenos Aires Province, Argentina. New Disease Reports 12:5.

Pietro AD, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Mol. Plant Pathol. 4:315–325.

Plyler TR, GW Simone, D Fernández, C Kistler. 1999. Rapid detection of the *Fusarium oxysporum* lineage containing the Canary Island date palm wilt pathogen. Phytopathology 89:407–413.

Plyler TR, Simone GW, Fernandez D, Kistler HC. 2000. Genetic diversity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. Plant Pathology 49:155–164.

Priest MJ, Letham DB. 1996. Vascular wilt of *Phoenix canariensis* in New South Wales caused by Fusarium oxysporum. Australasian Plant Pathology 25:110–3.

Puhalla JE. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canad. J. Bot. 63:179–183.

Ramos Cordero C, Servicio de Residuos del Cabildo de Gran Canaria, Laich F, Hristova H, Hernández Suárez, E. 2018. Viabilidad del compostaje de los restos de poda de palmera infestada por *Diocalandra frumenti* Fabricius, para su aplicación como abono orgánico en jardinería. 35 pp.

Ramos Cordero C, Servicio de Residuos del Cabildo de Gran Canaria y Hernández Suárez E. 2021. Viabilidad del compostaje de los restos de poda de palmera, infestada por *Diocalandra frumenti* (Fabricius), para su aplicación como abono orgánico en jardinería: Experiencias realizadas. Informe Técnico N°8. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 38 p.

Rana A, Sahgal M, Johri BN. 2017. "*Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host interaction," in Developments in Fungal Biology and Applied Mycology, eds S. K. Deshmukh, T. Satyanarayana, B. N. Johri (Singapore: Springer), 159–199.

Salomone Suárez F, Carnero Hernández A, González Hernández A, Marrero Ferrer M. 2000. Presencia en la zona paleártica de *Diocalandra frumenti* Fabricius (Coleóptera, Curculionidae). Boletín de la Asociación Española de Entomología 24: 263-264.

Singh AK, Barrikkad R. 2017. Taxonomic redescription of the coconut bark weevil (*Diocalandra frumenti*). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 1049-1053.

Suárez-Estrella F, Vargas-García MC, Elorrieta MA, López MJ, Moreno J. 2003. Temperature effect on *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* survival during horticultural waste composting. Journal of Applied Microbiology 94:475–482.

Suárez Estrella F, Vargas-García MC, López MJ, Moreno J. 2007. Effect of horticulture waste composting on infected plant residues with pathogenic bacteria and fungi. Integrated and localized sanitation. Waste Manage 27:886-892.

Summerell B, Kistler HC, Gunn LV, 2001. *Fusarium* wilt of *Phoenix canariensis* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW, eds. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. St Paul, MN, USA: APS Press, 263–70.

Vander Molen GE, Beckman CH, Rodehorst E. 1987. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Physiological and Molecular Plant Pathology 31:185–200.

Walter S, Nicholson P, Doohan FM. 2010. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. New Phytologist 185:54-66.

Wichuk KM, Tewari JP, McCartney D. 2011. Plant Pathogen Eradication During Composting: A Literature Review. Compost Science & Utilization 19(3):244-266.

Yuen GY, Raabr RD. 1984. Effect of small-scale aerobic composting on survival of some fungal plant pathogens. Plant Diseases 68:134–136.

Zhang YH, Ye HZ. 1993. A study of histology of resistance of wheat tohead scab (*Fusarium graminearum*). Journal of Sichuan Agricultural University 11:444–450.

ICIA
INSTITUTO CANARIO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
Gobierno de Canarias
Gobierno de Canarias
Consejería de Economía, Conocimiento y Empleo
Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información
Canarias avanza con Euro
Unión Europea