

# Associated pathogens to the regressive death of Canary palm (*Phoenix canariensis*) at urban areas of Queretaro, Mexico

## Patógenos asociados a la muerte regresiva de la palma canariense (*Phoenix canariensis*) en áreas urbanas de Querétaro, México

Santiago Vergara-Pineda\*, Fidel Landeros-Jaime, Guadalupe Malda-Barrera, Hilda Huerta-Cantera, Ulises Esquivel-Naranjo, Kruskaia Caltzonzin-Fernández, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Queretaro, Av. de las Ciencias S/N Juriquilla, Santa Rosa Jáuregui, Qro. CP.76230; Juan Ramiro Pacheco-Aguilar, Facultad de Química, Centro Universitario, Cerro de las Campanas S/N, C. P. 76010.

\*Corresponding author: santiago.vergara@uaq.mx.

Received: July 10, 2022.

Accepted: December 15, 2022.

Vergara-Pineda S, Landeros-Jaime F, Malda-Barrera G, Huerta-Cantera H, Esquivel-Naranjo U, Caltzonzin-Fernández K and Pacheco-Aguilar JR. 2023. Associated pathogens to the regressive death of Canary palm (*Phoenix canariensis*) at urban areas of Queretaro, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 112-125.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-4>

First DOI publication: December 27, 2022.

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2022.

**Abstract.** The Canarian palm *Phoenix canariensis* palm has been severely affected during the past decade with high mortality of specimens of all ages in the metropolitan area of Queretaro, Mexico. The aim of this work was to determine the causal agent associated with the regressive death of *P. canariensis* in Santiago de Queretaro City. Therefore, inspections were made in order to find specimens with disease symptoms, and from the

**Resumen.** La palma canariense (*Phoenix canariensis*) se ha visto severamente afectada durante la década pasada con alta mortalidad de ejemplares de todas las edades en la ciudad de Querétaro, México. El objetivo de este trabajo fue determinar los agentes causales asociados a la muerte regresiva de *P. canariensis* en la ciudad de Santiago de Querétaro. Se realizaron recorridos en la zona conurbada para identificar palmas con síntomas, y de las muestras de meristemo apical y raquis de hojas, trozos de tejido fueron colocados en cámaras húmedas para promover el desarrollo de hongos y bacterias. A partir de un aislamiento se realizó las pruebas de patogenicidad. En total 262 palmas fueron muestreadas: 95 asintomáticas (36.3%), 122 plantas muertas (46.6%) y 45 plantas con síntomas (17.2%) asociados a hojas basales muertas y hoja bandera muerta. De 12 palmas, se identificaron molecularmente *Fusarium* spp. (del complejo *F. incarnatum* y *F. verticillioides*). En el caso de *F. solani*, la patogenicidad fue confirmada en palmas de dos años. De acuerdo con las características

samples of rachis and apical meristem, pieces of tissue were left in wet chambers in order to promote of fungi and bacteria. A pathogenicity test from one isolate was done. A total of 262 palm trees were sampled: 95 without symptoms (36.3%), 122 death palms (46.6%) and 45 diseased (17.2%) with basal leaves death and flag leaf death. From 12 palms, *Fusarium* spp. (from the complex *F. incarnatum* and *F. verticillioides*) was molecularly identified. According to the morphological characteristics *Erwinia* sp. and *F. solani* were identified and with the last one pathogenicity test performed on two-year-old palms. Also, the lethal yellowing disease was identified since an apical meristem sample was sent to the National Phytosanitary Reference Center. The results showed the presence of a complex of pathogens associated with the regressive death of *P. canariensis*.

**Keywords:** canary palm, pathogenic complex, syndrome, *Fusarium* spp.

The Phoenix palm or Canarian palm (*Phoenix canariensis*) is native to the Canary Islands (archipelago of Spain) and can reach 12 to 15 m in height (Broschat, 2013). It was widely introduced in several countries and is one of the most cultivated and appreciated ornamental species in the world (CABI, 2016). One of the main sanitary problems that affects this species is wilt, which has been documented in several countries around the world. In France (1973), the causal agent was identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*; Likewise, it was reported in Italy, Japan (1977) (Arai and Yamamoto, 1977; Feather *et al.*, 1979), the Canary Islands and California. In this last place it has been reported in palms planted in fields and in nurseries in Florida (Garofalo and McMillan, 2003). In the case of Italy, the presence of *Phytophthora*

morfológicas se identificó a *Erwinia* sp. También se identificó al amarillamiento letal del cocotero en una muestra enviada al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Los resultados mostraron la presencia de un complejo de patógenos asociados a la muerte regresiva de *P. canariensis*.

**Palabras clave:** palma canariense, complejo de patógenos, síndrome, *Fusarium* spp.

La palma fénix o palma canariense (*Phoenix canariensis*) es nativa de las Islas Canarias (archipiélago de España) y puede alcanzar de 12 a 15 m de altura (Broschat, 2013). Se introdujo ampliamente a varios países y es una de las especies ornamentales comúnmente cultivadas y apreciadas en el mundo (CABI, 2016). Uno de los problemas sanitarios que principalmente afecta a esta especie es la marchitez, la cual se ha documentado en varios países alrededor del mundo, en Francia (1973), el agente causal fue identificado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*; así mismo, se reportó en Italia, Japón (1977) (Arai y Yamamoto, 1977; Feather *et al.*, 1979), Islas Canarias y California. En este último lugar se ha reportado en palmas sembradas en campos y en viveros de Florida (Garofalo y McMillan, 2003). En el caso de Italia se ha documentado la presencia de *Phytophthora palmivora* como agente causal de la pudrición de cogollo de la palma canariense (Pane *et al.*, 2007).

Garofalo y McMillan (1999) indicaron, que la pudrición del cogollo es causada por *Phytophthora* sp., uno de los patógenos más comunes de las palmas que se encuentran en el trópico húmedo; y mencionan que entre las especies susceptibles se encuentra *P. canariensis*. Otras especies de hongos que se han registrado como causantes de la pudrición del brote en las palmas, a menudo como infecciones secundarias en las últimas etapas de desarrollo

*palmivora* has been documented as the causal agent of bud rot of the Canarian palm (Pane *et al.*, 2007).

Garofalo and McMillan (1999) indicated that bud rot is caused by *Phytophthora* sp., one of the most common pathogens of palms found in the humid tropics; and mention that among the susceptible species is *P. canariensis*. Other fungal species that have been reported to cause bud rot in palms, often as secondary infections late in disease development or just before palm death, include the genera *Botryodiplodia*, *Chalara* (*Thielaviopsis*) and *Colletotrichum*.

In America, this disease has spread to Panama, Costa Rica, Nicaragua, Ecuador, Brazil, Suriname, Peru and Venezuela (Franqueville, 2001). In the case of Mexico, according to information provided by Romero-Valencia (Personal comm. 2019), in the city of Santiago de Queretaro, the regressive death of the palm began to be observed since 2009, with precedents in Guanajuato; however, the causative agent has not been studied. The dieback of the Canarian palm has spread rapidly in the city of Santiago de Queretaro, killing dozens of palms in avenues, public parks, institutions, and private gardens, affecting specimens aged from four to more than 80 years according to records from the owners, regardless of the type of management. Due to the variation of the pathogens that have been found in different studies and places around the world, the objective of this work was to determine the causal agent(s) associated with the dieback of the Canariense palm (*P. canariensis*) in the metropolitan area of Santiago de Queretaro, Queretaro.

The study area was the city of Queretaro and surroundings, which includes the municipalities of Queretaro, El Marques and Corregidora. It was divided into four quadrants, taking the central zone as the midpoint and magnetic north as the reference. During the investigation, tours were carried out (September 2014 to August 2015) in the

de la enfermedad o justo antes de la muerte de la palma, son los géneros *Botryodiplodia*, *Chalara* (*Thielaviopsis*) y *Colletotrichum*.

En América, la enfermedad se ha extendido en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Ecuador, Brasil, Surinam, Perú y Venezuela (Franqueville, 2001). En el caso particular de México, de acuerdo con información proporcionada por Romero-Valencia (com. Personal 2019), en la ciudad de Santiago de Querétaro, la muerte regresiva de la palma se empezó a observar desde 2009, con antecedentes en Guanajuato; sin embargo, no se ha estudiado al agente causal. La muerte regresiva de la palma canariense se ha dispersado rápidamente en la ciudad de Santiago de Querétaro, matando decenas de palmas en avenidas, parques públicos, instituciones, jardines privados, afectando ejemplares con edades desde los cuatro hasta más de 80 años según registros de los propietarios, independientemente del tipo de manejo. Debido a la variación de los patógenos que se han encontrado en diferentes estudios y lugares del mundo, el objetivo de este trabajo fue determinar el agente(es) causal(es) asociados a la muerte regresiva de la palma canariense (*P. canariensis*) en la zona conurbada de Santiago de Querétaro, Querétaro.

El área de estudio fue la ciudad de Querétaro y áreas circunvecinas, que comprende los municipios de Querétaro, El Marqués y Corregidora. Se dividió en cuatro cuadrantes, tomando como punto medio la zona centro y como referencia el norte magnético. Durante la investigación se realizaron recorridos (septiembre de 2014 a agosto de 2015) en las avenidas, bulevares principales, parques públicos, así como sitios de propiedad privada cuando se observaron palmas canarienses. Los recorridos iniciaron en el cuadrante I y terminaron en el IV, de esta forma se tomaron en cuenta palmas sanas, muertas y con síntomas iniciales clasificándose en: a) palmas con hojas basales muertas, b) hoja

avenues, main boulevards, public parks, as well as privately owned sites when Canarian palms were observed. The tours began in quadrant I and ended in IV, thus considering healthy, dead palms and those with initial symptoms, classifying them as: a) palms with dead basal leaves, b) dead flag leaf (apical meristem) and c) the combination of both symptoms.

To carry out the sampling, diseased palms were felled in the four quadrants, so that at least two palms per quadrant were sectioned. The selected palms were felled with a Still MS660® chainsaw and with Felco® scissors, the leaves that presented the symptoms of color change in the rachis were cut (Figure 1 A and D). To obtain the apical meristem of the felled palms, they were sectioned to get the top (Figure 1 B and C). All samples were preserved in paper bags and in turn inside plastic bags in a cooler with frozen gel for microbiological analysis.

The samples were analyzed in the Microbiology laboratory of Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Tissues from the leaf rachis and meristem (<0.8 cm) that presented the transition from healthy to diseased tissue were cut, which were disinfected with 2% sodium hypochlorite for 2 min and washed in sterile distilled water (three washes), subsequently, they were allowed to dry on sterile paper towels. Fragments were placed in humid chambers in Petri dishes with sterile filter paper and moistened with sterile distilled water. Of the total palms sampled, six humid chambers were prepared with five pieces of rachis per plant and three chambers with five pieces of apical meristem per plant. As control, two Petri dishes were prepared in a humid chamber with asymptomatic tissue, one of rachis tissue and the other of meristem. The humid chambers were incubated at room temperature for three days.

Once the presence of fungal growth was detected, slides were prepared using a Leica® Zoom 2000 dissection microscope and morphological

bandera muerta (meristemo apical) y c) la combinación de ambos síntomas.

Para realizar el muestreo se derribaron palmas enfermas en los cuatro cuadrantes, de manera que al menos dos palmas por cuadrante fueron seccionadas. Las palmas seleccionadas, se derribaron con motosierra Still MS660® y con tijeras Felco® se cortaron las hojas que presentaron los síntomas de cambio de color en el raquis (Figura 1 A y D). Para obtener el meristemo apical de las palmas derribadas, se seccionaron para conseguir el cogollo (Figura 1 B y C). Todas las muestras se preservaron en bolsas de papel y a su vez dentro de bolsas de plástico en hielera con gel congelado para el análisis microbiológico.

Las muestras se analizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se cortaron tejidos de raquis de la hoja y meristemo (<0.8 cm) que presentaron la transición de tejido sano-enfermo, los cuales, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y lavados en agua destilada estéril (tres lavados), posteriormente, se dejaron secar en sanitas estériles. Los fragmentos se colocaron en cámaras húmedas en cajas Petri preparadas con papel filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril. Del total de palmas muestreadas, se prepararon seis cámaras húmedas con cinco trozos de raquis por planta y tres cámaras con cinco piezas de meristemo apical por planta. Como testigo se prepararon dos cajas Petri en cámara húmeda con tejido asintomático, una de tejido de raquis y otra de meristemo. Las cámaras húmedas se incubaron a temperatura ambiente durante tres días.

Una vez detectada la presencia de crecimiento de hongos, se prepararon laminillas utilizando microscopio de disección Leica® Zoom 2000 y se realizó la determinación morfológica con las claves de Barnett y Hunter (2003) y Booth (1971). Las colonias de hongos se transfirieron por punta de hifa



**Figure 1.** Canary palm (*Phoenix canariensis*) associated with dieback collected in the metropolitan area of the city of Querétaro, Querétaro. A) Rachis with brown color change along the central part. B) Section of the apical meristem with soft rot. C) The longitudinal section of the apical meristem and dead flag leaf is observed. D) Cross section of the same rachis, showing a color with a pink tendency in the upper section.

**Figura 1.** Palma canariense (*Phoenix canariensis*) asociada a la muerte regresiva colectada en la zona conurbada de la ciudad de Querétaro, Querétaro. A) Raquis con cambio de color café a lo largo de la parte central. B) Sección del meristemo apical con pudrición blanda. C) Se observa el corte longitudinal del meristemo apical y hoja bandera muerta. D) Corte transversal del mismo raquis, se aprecia un color con tendencia rosa en la sección superior.

determination was performed using the Barnett and Hunter (2003) and Booth (1971) keys. The fungal colonies were transferred by hyphal tip to Petri dishes with PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium (Bioxon®), while the bacterial colonies obtained from the apical meristems with soft rot were cultured in Petri dishes with nutrient agar medium (Bioxon®).

a cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) (Bioxon®), mientras que las colonias bacterianas obtenidas de los meristemos apicales con pudrición blanda, se sembraron en cajas Petri con medio agar nutritivo (Bioxon®).

Para la identificación molecular de los hongos, se realizó la extracción del ADN usando el método por Mirhendi *et al.* (2010). Se utilizaron

For the fungi molecular identification, DNA extraction was performed using the method by Mirhendi *et al.* (2010). The following primers were used: ITS1-TCCGTAGGTGAACCTGCGG and ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC; which amplifies a size of 500 bp of the ITS region of rDNA. PCR conditions were initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 25 cycles at 58 °C for 30 seconds (alignment), 72 °C for 2 min (extension), 95 °C for 30 s (denaturation). and a final extension at 72 °C for 10 minutes (White *et al.*, 1990). The amplified PCR products were sent for sequencing to the Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), of Centro de Investigacion y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Irapuato, Guanajuato, Mexico for identification. The fungal sequences were compared with the database deposited in GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). With the generated sequences in this work and those from the gene bank (NCBI), a matrix was built using the McClade 4.0 program (Maddison and Maddison, 2000). Dendrograms were constructed using the principles of parsimony, maximum likelihood, and Bayesian inference. For the construction of the parsimony tree, the PAUP 4.0b10 program (Swofford, 2002) was used, with a heuristic search of 1000 replicates, as well as bootstraps. The maximum likelihood tree was built with the RaxML program (Stamatakis, 2006), using the GTRGAMMA model, with 1000 replicates and a bootstrap of 1000 replicates. Finally, the Bayes tree was built using the MrBayes 3.1.2 program (Ronquist and Helsenbeck, 2003), with the GTR invgamma model, with four simultaneous runs and a sampling frequency of 100.

On the other hand, Koch's postulates were carried out with one of the fungi strains obtained. For this, two-year-old *P. canariensis* seedlings were used, which were disinfected by immersion of the

los siguientes cebadores: ITS1-TCCGTAGGTGA-ACCTGCGG y ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC; el cual amplifica un tamaño de 500 pb de la región ITS de ADNr. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguidos de 25 ciclos a 58 °C por 30 segundos (alineamiento), 72 °C por 2 min (extensión), 95 °C por 30 s (desnaturalización) y una extensión final a 72 °C por 10 minutos (White *et al.*, 1990). Los productos amplificados de PCR se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Irapuato, Guanajuato, México para su identificación. Las secuencias de los hongos se compararon con la base de datos depositadas en GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con las secuencias generadas en este trabajo y las del banco de genes (NCBI) se construyó una matriz en el programa McClade 4.0 (Maddison y Maddison, 2000). Se construyeron dendogramas usando los principios de parsimonia, máxima verosimilitud y bayesiano. Para la construcción del árbol de parsimonia se usó el programa de PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), con una búsqueda heurística de 1000 réplicas, así como de un bootstrap. El árbol de máxima verosimilitud se construyó con el programa RaxML (Stamatakis, 2006), usando el modelo GTRGAMMA, con 1000 réplicas y un bootstrap de 1000 réplicas. Finalmente, el árbol de Bayes se construyó usando el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Helsenbeck, 2003), con el modelo GTR invgamma, con cuatro corridas simultáneas y una frecuencia de muestreo de 100.

Por otro lado, se realizó los postulados de Koch con una de las cepas de los hongos obtenidos. Para ello, se utilizaron plántulas de *P. canariensis* de dos años de edad, mismas que fueron desinfectadas por inmersión a raíz desnuda con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 min; posteriormente, se

bare root in a 1% sodium hypochlorite solution for 2 min; subsequently, they were washed by immersion in sterile water and transplanted in sterile substrate. Irrigations were carried out with sterile water. 30 seedlings were inoculated by spraying with a solution of  $1 \times 10^6$  conidia in the roots, additionally a puncture was made in the rachis of the leaves to facilitate fungi infection, that is, the test specimens were double inoculated. Five seedlings were used as a control and were kept at room temperature in the laboratory. The seedlings were checked every third day until visible and characteristic symptoms of the disease were observed. Subsequently, samples were taken from the plants with symptoms to re-isolate the fungus.

For bacteria identification, basic identification tests were done using the manual of Schaad *et al.* (2001). Isolations were made in selective media such as King B medium and oxidation and fermentation tests (Huge and Leifson). Subsequently, Biolog® plates were used, with sugar acidification tests (salicin, melibiose, lactose, raffinose, sorbitol, maltose, and inositol). Additionally, complementary tests were performed: gas production from glucose, gelatin liquefaction, indole production, Simmons citrate agar, tolerance to 5% NaCl, growth at temperatures of 30 and 37 °C, and triple sugar iron agar. indicated by Schaad *et al.* (2001).

In addition, a meristem sample (dead flag leaf) and petiole were sent to the Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) for analysis in the mycology, bacteriology, and virology laboratories. Finally, to determinant the correspondence of the three types of symptoms that the plants presented during the sampling, a Chi square test ( $X^2$ ) was carried out to determine which symptom was the most frequent in the urban area.

During the rounds, 262 palms were sampled, of which 95 were asymptomatic (36.3%), 122 dead (46.6%) and 45 were observed to be sick

lavaron por inmersión en agua estéril y trasplantaron en sustrato estéril. Se realizaron los riegos solo con agua estéril. Se inocularon 30 plántulas por aspersión con una solución de  $1 \times 10^6$  conidios en las raíces, adicionalmente se les hizo una punción en el raquis de las hojas para facilitar la infección por el hongo, es decir a los ejemplares de prueba se les realizó doble inoculación. Como testigo se usaron cinco plántulas y se mantuvieron a temperatura ambiente en laboratorio. Las plántulas se revisaron cada tercer día hasta observar síntomas visibles y característicos de la enfermedad, posteriormente, se tomaron muestras de las plantas con síntomas para volver a aislar el hongo.

Para el caso de la identificación de bacterias se usaron las pruebas básicas de identificación con el manual de Schaad *et al.* (2001). Se hicieron aislamientos en medios selectivos como en B de King y prueba de oxidación y fermentación (Huge y Leifson). Posteriormente, se utilizaron placas Biolog, con las pruebas de acidificación de azúcares (salicina, melibiosa, lactosa, raffinosa, sorbitol, maltosa e inositol). Adicionalmente, se hicieron pruebas complementarias: producción de gas a partir de glucosa, licuefacción de la gelatina, producción de indol, agar citrato de Simmons, tolerancia a NaCl al 5%, crecimiento a temperaturas de 30 y 37 °C y agar hierro triple azúcar indicadas por Schaad *et al.* (2001).

Además, una muestra de meristemo (hoja bandera muerta) y de peciolo se envió al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para su análisis en los laboratorios de micología, bacteriología y virología. Finalmente, para determinar la correspondencia de los tres tipos de síntomas que presentaron las plantas durante el muestreo, se realizó una prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ) para determinar cuál síntoma es el que se presentó con mayor frecuencia en la zona urbana.

En los recorridos se muestrearon 262 palmas, de las cuales 95 fueron asintomáticas (36.3%),

(17.2%), only 42 presented combined symptoms of dead basal leaves and dead flag leaf, two of them presented only the dead basal leaves, and one presented the dead flag leaf. The Chi square test indicated that the combination of basal leaf death and flag leaf death are the symptoms of diseased plants with 95% confidence ( $0.03 \leq 0.04$ ). Of the 12 palms analyzed, 72 humid chambers were prepared for the search for fungi in the rachis and 36 for the search for bacteria in the apical meristem.

From the humid chambers, only 24 fungal growths were observed, and the isolation done by hyphal tip, the genus *Fusarium* was consistently obtained, corresponding to two isolates for each felled palm (12 isolates). Of the 12 isolates, only four were molecularly identified, which corresponded to *Fusarium* sp. in the *F. incarnatum* complex (F1) with a beige mycelial coloration, of conidia with pedicelled cells; while three of them corresponded to *Fusarium* sp. in the *F. verticillioides* complex violet mycelial color and microconidia formed in chains (F2, F3 and F4) (Figure 2). Likewise, an isolate was determined morphologically, identified also as *F. solani* with a pale purple mycelial color and abundant oval microconidia. Colony and morphological characteristics were correspondent as proposed by Booth (1971). Part of the plant material from which *F. solani* was obtained was isolated and confirmed by the Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), who isolated and identified the same species of fungus.

This phytosanitary problem is distributed throughout the urban area of the city of Queretaro, since diseased and dead plants were found in the four quadrants. It is important to highlight that when the symptoms appear on the flag leaf, the damage is irreversible, that is, the death of the plant is imminent, as mentioned by Tomlinson (2012) who points out that within the crown itself, it is made up of tissues meristematic and differentiating, the

122 muertas (46.6%) y 45 se observaron enfermas (17.2%), solo 42 presentaron síntomas combinados de hojas basales muertas y hoja bandera muerta, dos presentaron solo las hojas basales muertas y una presentó la hoja bandera muerta. La prueba de Chi cuadrada indicó que la combinación de la muerte de hojas basales y de la hoja bandera son los síntomas de las plantas enfermas con un 95% de confianza ( $0.03 \leq 0.04$ ). De las 12 palmas analizadas, se prepararon 72 cámaras húmedas para la búsqueda de hongos en el raquis y 36 para la búsqueda de bacterias en el meristemo apical. De las cámaras húmedas, solo 24 se observó crecimiento de hongos, y a partir del aislamiento por punta de hifa, se obtuvo consistentemente al género *Fusarium* correspondiendo a dos aislamientos por cada palma derribada (12 aislamientos). De los 12 aislamientos, solo cuatro se identificaron molecularmente, que correspondió a *Fusarium* sp. en el complejo *F. incarnatum* (F1) con una coloración beige micelial, de conidios con célula pedicelada; mientras que tres de ellas correspondieron a *Fusarium* sp. en el complejo *F. verticillioides* de color violeta micelial y de microconidios formados en cadenas (F2, F3 y F4) (Figura 2). Así mismo, un aislamiento se determinó morfológicamente identificándose como *F. solani* con color micelial morado pálido y abundantes microconidios ovalados. Las características morfológicas y de colonias se respaldaron por Booth (1971). Parte del material vegetal del que se obtuvo *F. solani*, fue aislado y confirmado por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), quienes aislaron e identificaron a la misma especie de hongo.

Este problema fitosanitario se encuentra distribuido en toda la mancha urbana de la ciudad de Querétaro ya que en los cuatro cuadrantes se encontraron plantas enfermas y muertas. Es importante resaltar que cuando los síntomas se presentan en la hoja bandera el daño es irreversible, es decir,



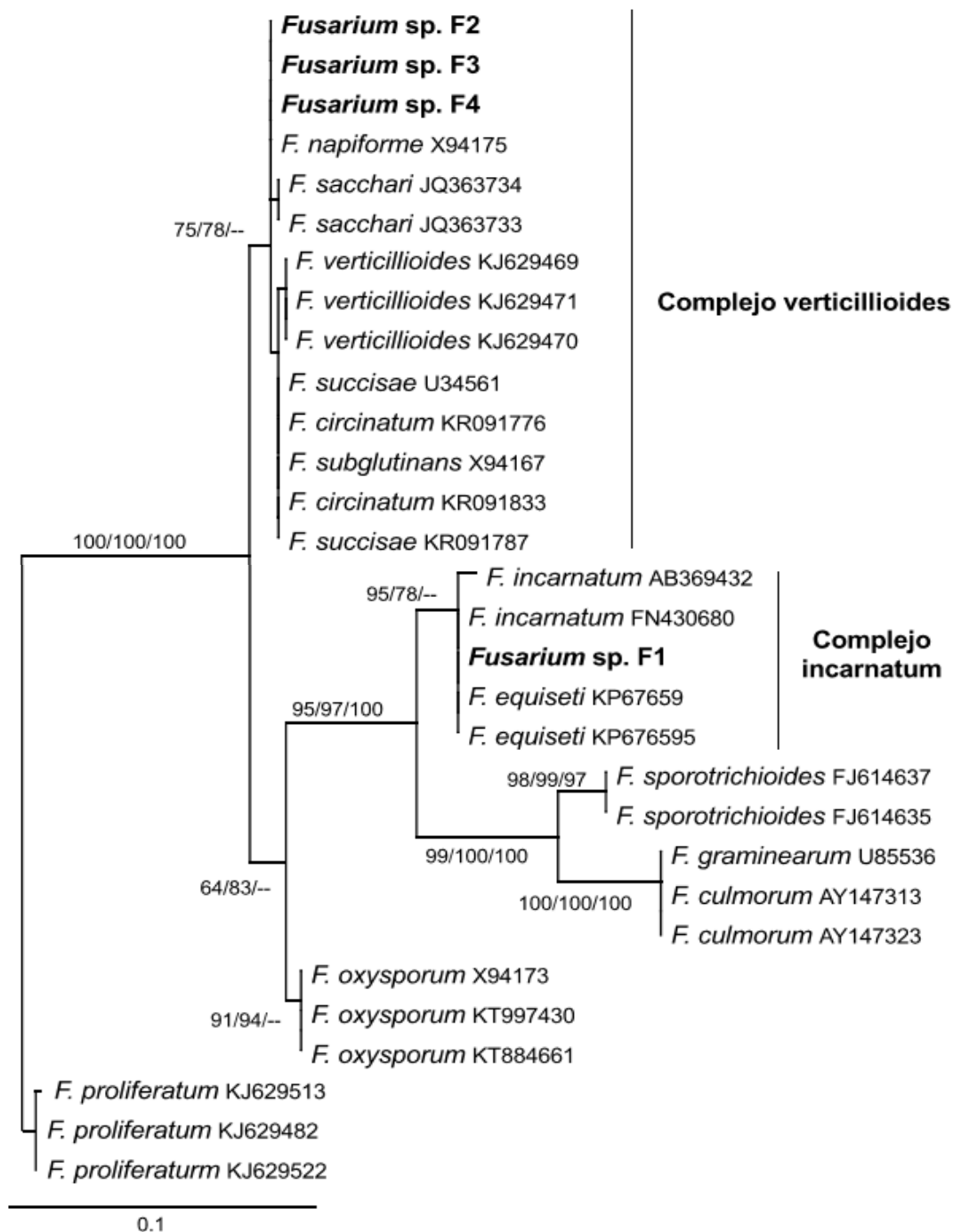


Figure 2. Maximum likelihood tree, with the phylogenetic position of the four *Fusarium* strains (in bold). The values of the branches correspond to the support of parsimony bootstrap/maximum likelihood bootstrap/posterior probabilities.

Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud, con la posición filogenética de las cuatro cepas de *Fusarium* (señalado en negritas). Los valores de las ramas corresponden al soporte de bootstrap de parsimonia/bootstrap de máxima verosimilitud/probabilidades posteriores.

latter derives from the former and consists of cells in a state of mitotic turnover and the cells that form the young tissues of the trunk; Thus, according to what was observed in this investigation, since the apical meristem is necrotic, the palm is considered dead.

On the other hand, the pathogenicity test was carried out only with *F. solani* due to the high frequency found in humid chambers. At 30 days, the inoculated seedlings showed the color change in the rachis of the leaves where the apical parts began to wither and later advanced towards the base of this; additionally, wilting was observed in the leaflets. All plants died 60 days after inoculation, while control plants remained healthy. The fungus was isolated again from the inoculated plants, confirming its presence of *F. solani* (Figure 3 A).

Although Elliott (2015) points to *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* as the causal agent of wilt in *P. canariensis*, this study broadens the range of pathogens such as *F. solani* (pathogenicity test) and the fungi *Fusarium* spp. (without pathogenicity test)

la muerte de la planta es inminente, así como menciona Tomlinson (2012) quien señala que dentro de la corona en sí, se compone de tejidos meristemáticos y diferenciadores, este último deriva del primero y consta de células en estado de recambio mitótico y las células que forman los tejidos jóvenes del tronco; así pues conforme a lo observado en esta investigación, al estar necrosado el meristemo apical, la palma se considera muerta.

Por otra parte, la prueba de patogenicidad se realizó únicamente con *F. solani* debido la alta frecuencia encontrada en las cámaras húmedas. A los 30 días, las plántulas inoculadas mostraron el cambio de color en el raquis de las hojas donde las partes apicales se empezaron a marchitar y posteriormente avanzó hacia la base del mismo; adicionalmente, se observó marchitez en los foliolos. Todas las plantas murieron a los 60 días después de la inoculación, mientras que las plantas testigo permanecieron sanas. El hongo se volvió a reaislar de las plantas inoculadas confirmandose la presencia de *F. solani* (Figura 3 A).



**Figure 3.** Symptoms of Canary palm (*P. canariensis*). A) The color change in the rachis of the inoculated leaf is observed, which indicates an infection process. B) Specimen of *P. canariensis* affected in basal leaves and flag leaf. C) Same specimen one month later. D) Young palm with dead flag leaf.

**Figura 3.** Síntomas en palma canariense (*P. canariensis*). A) Se observa el cambio de color en el raquis de la hoja inoculada lo cual indica un proceso de infección. B) Ejemplar de *P. canariensis* afectado en hojas basales y hoja bandera. C) Mismo ejemplar un mes después. D) Palma joven con la hoja bandera muerta.

associated with the dieback of *P. canariensis* in the urban area of Queretaro. In this regard, Mansoori and Kord (2006) found that *F. solani* attacks the date palm (*Phoenix dactylifera*) in Iran, causing the “yellow death”; with the symptoms of severe generalized yellowing and dry leaves adhered to the plant; However, these symptoms do not agree with what was observed in this investigation, since the observed symptoms coincide with what was described by Broschat (2013) in the United States and Elliott (2015) in Florida, where they are reported to *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* attacking this palm species.

On the other hand, during the dissection of the apical meristem of the analyzed palms, a fetid aroma was detected, as well as the arrival of flies from the families Muscidae and Calliphoridae, characteristic of soft rots of bacterial origin, as indicated by the studies by Pérez-Aragon *et al.* (2013), who determined *Erwinia* sp., which was identified in this research. This bacterium causes soft rot in the apical meristem, the palms in which it has access to the flag leaf, detach easily since its attachment to the apex of the stem becomes necrotic. In the case of planting the apical meristem to determine the presence of bacteria, 19 (19/36) colonies were obtained from the humid chambers, which corresponded to 11 of the 12 palms analyzed. Rivas and Herrera (2015) also identified *Erwinia* spp., in the oil palm (*Elaeis guineensis*) suggesting that the bacterium may contribute to the final phases of the rotting process of the plant apical meristem.

However, the sample of meristem sent to the CNRF for the detection of bacteria was positive by the PCR protocol for the detection of the phytoplasm of lethal yellowish of the coconut (ALC), which corresponds to what is reported by Harrison *et al.* (2002) where they detected high mortality of *P. canariensis* with similar symptoms to those of ALC (Texas Phoenix decline) in Texas. This phytosanitary problem is also studied by Gurr *et al.*

Aunque Elliott (2015) señala a *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* como el agente causal de la marchitez en *P. canariensis*, en este estudio se amplía el rango de patógenos como *F. solani* (prueba de patogenicidad) y los hongos *Fusarium* spp. (sin prueba de patogenicidad) asociados a la muerte regresiva de *P. canariensis* en la zona urbana de Querétaro. Al respecto Mansoori y Kord (2006) encontraron que *F. solani*, ataca a la palma datilera (*Phoenix dactylifera*) en Irán ocasionando la “muerte amarilla”; con los síntomas de un severo amarillamiento generalizado y hojas secas adheridas a la planta; no obstante, estos síntomas no concuerdan a lo observado en esta investigación, ya que los síntomas observados coinciden con lo descrito por Broschat (2013) en Estados Unidos y Elliott (2015) en Florida, donde se reporta a *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* atacando a esta especie de palma.

Por otro lado, durante la disección del meristemo apical de las palmas analizadas, se detectó un aroma fétido, así como el arribo de moscas de las familias Muscidae y Calliphoridae característico en las pudriciones blandas de origen bacteriano, como lo indican los estudios por Pérez-Aragón *et al.* (2013), quienes determinaron a *Erwinia* sp., el cual, fue identificada en esta investigación. Esta bacteria ocasiona pudrición blanda en el meristemo apical, las palmas a las que se tiene acceso a la hoja bandera, se desprenden con facilidad ya que su unión al ápice del tallo se necrosa. En el caso de la siembra del meristemo apical para determinar la presencia de bacterias, se obtuvo 19 (19/36) colonias de las cámaras húmedas, las cuales correspondieron a 11 de las 12 palmas analizadas. De acuerdo con Rivas y Herrera (2015) identificaron también a *Erwinia* spp., en la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) sugiriendo que la bacteria puede contribuir en las fases finales del proceso de pudrición del cogollo de la planta.

Por otro lado, la muestra de meristemo enviada al CNRF para la detección de bacterias resultó

(2016) in Puerto Rico and Florida of the American Union, as well as in Mexico, and corresponds to group IV-D of the 16Sr gene; although in the case of Mexico the detection analyzes were mainly in palms other than *P. canariensis*, as indicated by Aviña-Padilla *et al.* (2011) who analyzed positive samples for the phytoplasma in *P. dactylifera* and *Sabal mexicana*. Mora-Aguilera *et al.* (2016) indicate that the typical symptoms of ALC consist of necrosis of the developing inflorescence, drop of small fruits, yellowing of the fronds starting from the lower ones, total defoliation, and death. Figure 3 (B and C) shows a specimen of the Canarian palm at least 30 years old, with the basal leaves and the flag leaf dead. Whereas in Figure 3 (D), a young palm (>8 years old) showing death of the flag leaf with asymptomatic basal leaves is observed.

The results of this study indicate that the dieback of *P. canariensis* in the metropolitan area of the city of Queretaro is associated with a microbial complex: phytoplasma of lethal yellowing of the coconut palm (confirmed by CNRF), *Erwinia* sp. as well as fungi, in a complex of *Fusarium* spp. and *F. solani*, the latter confirmed by Koch's postulates. However, it is important to highlight that more studies are required to determine the etiology of this syndrome; as well as carrying out tests with all the isolates obtained in this study to evaluate the pathogenicity in the palms; likewise, the evaluation in a greater number of plants to corroborate the presence of the phytoplasma, since plants of all ages have died in the entire metropolitan area of the city of Queretaro.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The collaboration of Eng. Eliseo Romero-Valencia is appreciated for coordinating with the nursery of the Municipality of Queretaro for the review of some of the felled palms. To Autonomous University of Queretaro for supporting the FNB-2014-07 project.

positiva por el protocolo de PCR para la detección del fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero (ALC), lo cual corresponde con lo reportado por Harrison *et al.* (2002) donde detectaron alta mortalidad de *P. canariensis* con síntomas similares a los del ALC (Texas Phoenix decline) en Texas. Este problema fitosanitario es estudiado también por Gurr *et al.* (2016) en Puerto Rico y Florida de la Unión Americana, así como en México, y corresponde al grupo IV-D del gen 16Sr; aunque en el caso de México los análisis de detección fueron principalmente en palmas diferentes a *P. canariensis*, como lo indica Aviña-Padilla y colaboradores (2011) que analizaron muestras positivas al fitoplasma en *P. dactylifera* y *Sabal mexicana*. Mora-Aguilera *et al.* (2016) indican que los síntomas típicos de ALC consisten en necrosis de la inflorescencia en desarrollo, caída de frutos pequeños, amarillamiento de las frondas iniciando por las inferiores, defoliación total y muerte. En la Figura 3 (B y C) se aprecia un ejemplar de la palma canaria de al menos 30 años de edad, con las hojas basales y la hoja bandera muerta. Por otro lado, en la Figura 3 (D), se observa una palma joven (>ocho años) que presenta muerte de la hoja bandera con hojas basales asintomáticas.

Los resultados de este estudio indican que la muerte regresiva de *P. canariensis* en la zona conurbada de la ciudad de Querétaro está asociada por un complejo microbiano: fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero (confirmado por CNRF), *Erwinia* sp. así como hongos, en un complejo de especies *Fusarium* spp. y *F. solani*, este último confirmado por postulados de Koch. No obstante, es importante resaltar que se requieren más estudios para conocer la etiología de este síndrome; al igual de realizar pruebas con todos los aislamientos obtenidos en este estudio para evaluar la patogenicidad en las palmas; así mismo, la evaluación en un mayor número de plantas para corroborar la presencia

## CITED LITERATURE

- Arai K and Yamamoto A. 1977. New *Fusarium* disease of canary island date palm in Japan. Bulletin of the Faculty of Agriculture. Kagoshima University 27:31–37. <http://www.ir.kagoshima-u.ac.jp>.
- Aviña Padilla K, Rodríguez Páez LA, Nava Castrejón AI, Ochoa Sánchez JC, R Rivera Bustamante and Martínez Soriano JP. 2011. Epidemic of lethal yellowing disease affecting *Phoenix dactylifera* and *Sabal mexicana* in Central Mexico. Bulletin of Insectology 64: S221-S222. <http://www.academia.edu/1060354/>.
- CABI (Center for Agriculture and Bioscience International). 2016. *Phoenix canariensis* (Canary Island date palm). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/40697> (Consulta, enero 2019).
- Barnett HL and Hunter BB. 2003. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. Prentice Hall. St. Paul, Minnesota. ISBN 0-089054-192-2. 217 p.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Surrey, England: Commonwealth mycological institute. First edition. ISBN 85198-046-5. 237 p.
- Broschat TK. 2013. *Phoenix canariensis*: Canary Island Date Palm. Environmental Horticulture Department, University of Florida. <http://www.Fact Sheet ENH-598.edis.ifas.ufl.edu>.
- Elliott ML. 2015. *Fusarium* Wilt of Canary Island Date Palm. U. S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida. P. 215. <http://www.edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP13900.pdf>.
- Feather TV, Ohr HD and Munnecke DE. 1979. Wilt and dieback of Canary Island palm in California. California Agriculture. <http://www.calag.ucanr.edu/Archive/?article=ca.v033n07p19>.
- Franqueville HD. 2001. La pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina. Revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. CIRAD. 35 p. <http://www.bio-nica.info/Biblioteca/Franqueville 2001>.
- Garofalo J y McMillan RT Jr. 2003. Marchitez por *Fusarium* en palmas del género *Phoenix* del sur de Florida. University of Florida. Extension Service. Hoja informativa No. 91. <http://www.fshs.org>.
- Garofalo JF and McMillan RT Jr. 1999. *Phytophthora* bud-rot of palms in South Florida. Proceedings of Florida State Horticulture Society 112: P. 110. <http://www.fshs.org/proceedings-o/1999-vol-112/110-112>.
- Gurr G, Johnson MAC, Ash GJ, Wilson BAL, Ero MM, Pilotti CA, Dewhurst CF and You MS. 2016. Coconut lethal yellowing diseases: A phytoplasma threat to palms of global economic and social significance. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1521. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01521>.
- Harrison NA, Womack M and Carpio ML. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease*. 86: 676–681. <http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2002/June>.
- del fitoplasma, ya que plantas de todas las edades han muerto en toda la zona conurbada de la ciudad de Querétaro.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del Ing. Eliseo Romero-Valencia por la coordinación con el vivero del Municipio de Querétaro para la revisión de algunas de las palmas derribadas. A la Universidad Autónoma de Querétaro por apoyo al proyecto FNB-2014-07.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Maddison DR and Maddison WP. 2000. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2606395>.
- Mansoori B and Kord MH. 2006. Yellow death: A Disease of Date Palm in Iran Caused by *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology* 154: 125-127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01067.x>.
- Mirhendi H, Ghiasian A, Vismer HF, Asgary MR, Jalalizand N, Arendrup MC and Makimura K. 2010. Preliminary Identification and Typing of Pathogenic and Toxicogenic *Fusarium* Species Using Restriction Digestion of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region. *Iranian Journal of Public Health* 39: 35-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salin C, Flores-Olivas A, González-Gómez R y Robles-García P. 2014. Epidemiological Surveillance and Current Status of Coconut Lethal Yellowing, Potato Purple Top and Citrus Huanglongbing (HLB) in Mexico. *Journal Mexican Phytopathology* 32(2): 20-131.
- Pane A, Allatra C, Sammarco G and Cacciola SO. 2007. First Report of Bud Rot of Canary Island Date Palm Caused by *Phytophthora palmivora* in Italy. *American Phytopathological Society* 91(8): 1,059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1059A>.
- Pérez Aragón B, García Salazar JE, Landeros Jaime F, Caltzontzin Fernández K, Romero Valencia E y Vergara-Pineda S. 2013. Muerte regresiva en *Phoenix canariensis* y sus agentes causales en el Municipio de Querétaro. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Suplemento 31. P. S79. <http://www.rmfm.smf.org.mx/suplemento/docs/resumen/ResumenesOrales>.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

- Rivas FF y Herrera IL. 2015. Organismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) en san Lorenzo, Ecuador. Revista Protección Vegetal 30(3): 193-203. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n3/rpv05315.pdf>
- Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. 373 p.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22: 2688–2690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Swofford DL. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. <http://www.researchgate.net/publication/271205405>.
- Tomlinson PB, Huggett BA. 2012. Cell longevity and sustained primary growth in palm stems. American Journal of Botany 99(12): 1891–1902. doi.org/10.3732/ajb.1200089.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Ed). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York, 315-322 p. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990>.