



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

## IDENTIFICACIÓN, DISPERSIÓN, HISTOPATOLOGÍA E IMPACTO ECONÓMICO DE *Armillaria* EN AGUACATE EN CHARAPAN, MICHOACÁN

JENY MICHUA CEDILLO

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

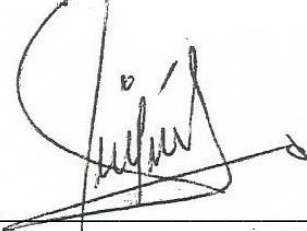
2014

La presente tesis titulada: **Identificación, Dispersión, Histopatología e Impacto Económico de *Armillaria* en Aguacate en Charapan, Michoacán**, realizada por la alumna: **Jeny Michua Cedillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
POSGRADO EN FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR



Dr. Cristian Nava Díaz

ASESOR

Dr. Salvador Ochoa Ascencio

ASESOR



Dr. Dionicio Alvarado Rosales

ASESOR



Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero de 2014.

# IDENTIFICACIÓN, DISPERSIÓN, HISTOPATOLOGÍA E IMPACTO ECONÓMICO DE *Armillaria* EN AGUACATE EN CHARAPAN, MICHOACÁN

Jeny Michua Cedillo<sup>1</sup>, Daniel Téliz Ortíz<sup>1</sup>, Cristian Nava Díaz<sup>1</sup>, Salvador Ochoa Asencio<sup>2</sup>, Guadalupe Valdovinos Ponce<sup>1</sup>, Dionicio Alvarado Rosales<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, <sup>2</sup>Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

## RESUMEN GENERAL

La identificación, dispersión e impacto económico de *Armillaria* sp. en aguacate Hass se estudió en el municipio de Charapan, Michoacán. *Armillaria* se aisló de raíces de árboles sintomáticos y muertos y se cultivó en BDS. La identificación de la especie se realizó por compatibilidad somática y amplificación de la región IGS-I del ADN ribosomal de 19 aislamientos. Los apareamientos dieron como resultado un solo grupo de compatibilidad; los confrontamientos se realizaron con *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana*, donde se observó la separación de las colonias. Las pruebas de patogenicidad se realizaron inoculando 35 plántulas de aguacate en condiciones de invernadero. Las raíces de las plántulas infectadas y de los árboles infectados naturalmente en campo se caracterizaron anatómicamente. La sintomatología en invernadero se manifestó a los 141 días después de la inoculación (ddi) donde se observó amarillamiento, enrollamiento de la lámina foliar, flacidez y en la raíz principal se observaron rizomorfos y micelio. *Armillaria* invade la peridermis de la raíz, una vez establecido en este tejido se va al floema y periciclo, entre estos dos tejidos se establece el rizomorfo. El micelio se dirige al tejido vascular, donde los elementos de vaso del xilema son taponeados dando por consiguiente la deformación de estas estructuras, en el caso de floema, los elementos cribosos se llenan de compuestos fenólicos y el almidón se degrada totalmente tras la invasión de *Armillaria*. La

dispersión de árboles enfermos se determinó marcando en un croquis árboles sintomáticos y aplicando una escala de severidad. Se realizaron dos muestreos en temporada de lluvias (julio y septiembre 2012) y dos en temporada de sequía (enero y mayo 2013). Con esta información se estableció la velocidad de dispersión y severidad de la enfermedad. La severidad de la enfermedad fue variable; árboles con síntomas avanzados murieron en dos meses; árboles con síntomas iniciales se mantuvieron en esa categoría durante los 10 meses de muestreo, mientras que otros murieron en dos o cuatro meses. Con estos resultados, se calcularon las pérdidas en productividad para mercado nacional y para exportación, y la vida útil del árbol dando como resultado pérdidas de \$5220.00 por árbol. Dichos resultados complementados con el estudio epidemiológico, indican que estas pérdidas aumentarán en los próximos años.

**Palabras Clave:** compatibilidad somática, dispersión, fenoles, IGS, incidencia, inoculación, rizomorfos.

# IDENTIFICATION, DISPERSION, HISTOPATHOLOGY AND ECONOMIC IMPACT OF *Armillaria* IN AVOCADO IN Charapan, MICHOACÁN

Jeny Michua Cedillo<sup>1</sup>, Daniel Téliz Ortíz<sup>1</sup>, Cristian Nava Díaz<sup>1</sup>, Salvador Ochoa Asencio<sup>2</sup>, Guadalupe Valdovinos Ponce<sup>1</sup>, Dionicio Alvarado Rosales<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, <sup>2</sup> Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

## GENERAL ABSTRACT

The identification, spread and economic impact of *Armillaria* sp. in avocado was studied in the municipality of Charapan, Michoacán. *Armillaria* was isolated from roots of symptomatic and dead trees and was cultivated in BDS. The identification of the species was by somatic compatibility and amplification the region IGS-I of DNAr from 19 isolates. The matings resulted in a single support group; the matings were conducted with *A. mellea*, *A. gallica* and *A. mexicana*, where the separation of the colonies was observed. The pathogenicity tests were performed by inoculating 35 seedlings of avocado in greenhouse conditions. The symptoms in greenhouse manifested to 141 days after inoculation (dai) where was observed amarillamiento, curl of foliar and mycelium and rhizomorphs were observed in the main root. *Armillaria* invades the root peridermis, once established in this tissue directed to the phloem and pericycle, the rhizomorph is established between these two tissues. The mycelium is directed to vascular tissue where xylem vessel elements are occluded there by giving deformation of these structures in the case of the phloem the elements are filled phenolic and the starch is completely degraded after the invasion of *Armillaria*. The dispersion of diseased trees marking on map symptomatic trees and applying a severity scale. Two samples were made during rainy season (July and September 2012) and two dry

(january to may 2013) season. With this information, speed of dispersion and severity of disease was established; trees with advanced symptoms died in two months; trees with early symptoms were kept in that category during the 10 months of sampling, while others died in two to four months. With these results, we calculated the losses in productivity for national market and for export, and life of the tree, resulting in losses of \$ 5,220.00 per tree. These results complemented the epidemiological study coming years.

**Keywords:** somatic compatibility, dispersion, phenols, IGS, incidence, inoculation, rhizomorphs

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los mexicanos, que a través de sus impuestos y del CONACYT, contribuyeron con el financiamiento para mi formación.

Al Colegio de Postgraduados, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología por aceptarme y abrirme las puertas para mi preparación como fitopatóloga.

A los miembros de mi consejo particular, quienes fueron parte fundamental para mi desarrollo profesional y personal; Dr. Daniel Téliz, Dr. Cristian Nava, Dr. Salvador Ochoa, Dra. Guadalupe Valdovinos, Dr. Dionicio Alvarado.

Al Dr. Daniel Ochoa, a quién siempre estaré agradecida por todo el apoyo que me brindo, muchas gracias por su dedicación, paciencia y sugerencias.

A Josué Everardo Reyes Galván, por las facilidades para realizar la presente investigación en su huerta.

A la Asociación de Productores y Exportadores Empacadores de Aguacate de México (APEAM), por el financiamiento otorgado para el desarrollo de la presente tesis.

A la M. en C. Judith Alfonsina y a la Ing. Elena Sosa por el apoyo para desarrollar la parte de biología molecular.

Al M. en C. Jorge Valdéz por el apoyo con el análisis fotográfico.

A mis compañeros Hugo, Luz, Gil, Silvia quienes se involucraron y me apoyaron en algún momento de mi estancia en esta institución.

A los que en este momento se escapan de mi mente pero que contribuyeron en algún momento para que alcanzara este objetivo.

## DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar hasta este punto a pesar de todas las pruebas que hubo durante el camino.

A mis padres Jorge y Teresa, los pilares de mi vida, por apoyarme siempre y estar conmigo en todo momento, pero sobre todo por darme el mejor regalo del mundo, la vida.

A mis hermanos Norma, Jorge, Miriam, Fer quienes siempre han estado junto a mí por más difícil y duro que sea el camino.

A mi tío Salo†, mi tía Salvadora†, mi hermana Paty† y mi primo Beto†, que se fueron y no tuvieron la oportunidad de compartir físicamente este momento conmigo, pero sé dónde están se sienten orgullosos por la meta que acabo de cumplir.

A mis amigas Cynthia, quien a pesar de estar lejos de mí, siempre me ha brindado su apoyo y a Myrna y Ale por compartir estos dos años conmigo, a las dos, por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A aquella persona que en poco tiempo se volvió representativa y que hizo amenos los últimos días de esta etapa, Leo gracias por estar conmigo y dejarme compartir algunos momentos de mi vida contigo, pero sobre todo gracias a la vida por ponerte en mi camino.

A Misael, amigo de mi vida, iniciamos esto juntos y siempre estuviste conmigo, nunca me dejaste sola aun en los momentos difíciles, mollicute gracias por apoyarme y acompañarme en este sueño, lo logramos.



## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.2.1. Importancia económica del aguacate.....	4
1.2.2. Enfermedades de raíz del aguacate.....	5
1.2.3. La Armillariosis.....	6
1.3.LITERATURA CITADA.....	10
<b>CAPÍTULO II. UNA NUEVA ESPECIE DE <i>Armillaria</i> ASOCIADA A LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE.....</b>	<b>16</b>
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
2.1. INTRODUCCIÓN.....	18
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.2.1. Identificación molecular y compatibilidad Somática.....	21
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
2.3.1. Análisis molecular.....	25
2.3.2. Compatibilidad somática.....	33
2.4. CONCLUSIONES.....	38
2.5. LITERATURA CITADA.....	39
<b>CAPÍTULO III. LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE EN CHARAPAN, MICHOACÁN: INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PÉRDIDAS ECONÓMICAS.....</b>	<b>45</b>
RESUMEN.....	45
ABSTRACT.....	47
3.1. INTRODUCCIÓN.....	49
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.2.1. Incidencia, severidad y evaluación de la enfermedad.....	52
3.2.2. Pérdidas económicas.....	56

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
3.3.1. Dispersión del patógeno en tiempo y espacio.....	57
3.3.2. Pérdidas económicas.....	63
3.4. CONCLUSIONES.....	70
3.5. LITERATURA CITADA.....	71
<b>CAPÍTULO IV. HISTOPATOLOGÍA DE RAÍCES DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill) INFECTADAS CON <i>Armillaria</i>.....</b>	<b>75</b>
RESUMEN.....	75
ABSTRACT.....	76
4.1. INTRODUCCIÓN.....	77
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
4.2.1. Análisis Histológico e histoquímico.....	79
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
4.3.1. Síntomas en árboles infectados naturalmente.....	81
4.3.2. Síntomas en plántulas inoculadas en invernadero.....	81
4.3.3. Histología.....	84
4.4. CONCLUSIONES.....	90
4.5. LITERATURA CITADA.....	91
<b>CAPÍTULO V. LOS RIZOMORFOS DE <i>ARMILLARIA</i>: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA.....</b>	<b>94</b>
RESUMEN.....	94
ABSTRACT.....	95
5.1. INTRODUCCIÓN.....	96
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
5.2.1. Colecta de rizomorfos del campo.....	98
5.2.2. Análisis histológico.....	98
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
5.3.1. Rizomorfos de Campo.....	100
5.3.2. Rizomorfos <i>in vitro</i> .....	102
5.4. CONCLUSIONES.....	106
5.5. LITERATURA CITADA.....	107

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO II. UNA NUEVA ESPECIE DE *Armillaria* ASOCIADA A LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE

Cuadro 2.1. Resultados del análisis de las secuencias de <i>Armillaria</i> del GenBank con la enzima <i>Alu I</i> .....	29
Cuadro 2.2. Resultados del análisis de las secuencias de <i>A. tabescens</i> , <i>A. cepistipes</i> , <i>A. ectypa</i> , <i>A. borealis</i> y del GenBank con la enzima <i>Alu I</i> , <i>Hind III</i> , <i>Tha I</i> y <i>Bsm I</i> .....	30
Cuadro 2.3. Apareamientos entre cepas de <i>Armillaria</i> aisladas de aguacate. Aislamiento 6, 14 y 16 corresponden a aguacate del municipio de Salvador Escalante, cepa 18 corresponde a Pino (Charapan) y las restantes a aguacate en Charapan.....	34

### CAPÍTULO III. LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE EN CHARAPAN, MICHOACÁN: INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Cuadro 3.1. Producción anual de aguacate por hectárea.....	64
Cuadro 3.2. Precio por año por kg de aguacate para mercado nacional y exportación.....	64
Cuadro 3.3. Pérdidas en producción provocadas por la Armillariosis.....	64
Cuadro 3.4. Costos de inversión de la huerta Xhanamba.....	65
Cuadro 3.5. Costos de operación de la huerta Xhanamba a los 7 años.....	67
Cuadro 3.6. Ingresos por ventas de acuerdo a la producción de aguacate por año.....	67
Cuadro 3.7. Flujo de efectivo de la huerta Xhanamba a los 7 años del establecimiento.....	68
Cuadro 3.8. Indicadores financieros de las pérdidas provocadas por Armillariosis en aguacate.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO II. UNA NUEVA ESPECIE DE *Armillaria* ASOCIADA A LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE

Figura 2.1. ADN de <i>Armillaria</i> en gel de agarosa.....	25
Figura 2.2. Amplificación de la región IGS-1 con extracción directa de ADN de rizomorfos y micelio de la raíz. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril dos control negativo, carril 3 control positivo y del carril 4 al 7 producto de PCR.....	26
Figura 2.3. Producto de PCR con extracción de ADN de 19 aislamientos. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo y del carril 4 al 12 son las muestras de ADN de <i>Armillaria</i> amplificando una banda de aproximadamente 800 pb.....	27
Figura 2.4. Análisis filogenético generado con secuencias de IGS-I con las especies reportadas en el GenBank.....	31
Figura 2.5. Vista anterior (A) y posterior (B) de las pruebas de compatibilidad somática con aislados de <i>Armillaria</i> de aguacate. ....	35
Figura 2.6. Mapa de la distribución del grupo de compatibilidad de <i>Armillaria</i> en aguacate en la huerta Xhanamba.....	35
Figura 2.7. Patrón de crecimiento de <i>Armillaria mellea</i> , <i>A. gallica</i> , <i>A. mexicana</i> y <i>Armillaria</i> sp (aguacate) a los 20 días del aislamiento. ....	36
Figura 2.8. Apareamientos de <i>Armillaria</i> sp. (Aguacate) con <i>A. mellea</i> , <i>A. gallica</i> y <i>A. mexicana</i> .....	37

### **CAPÍTULO III. LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE EN CHARAPAN, MICHOACÁN: INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PÉRDIDAS ECONÓMICAS.**

Figura 3.1. Imagen aérea del huerto Xhanamba, Charapan, Michoacán 2013 (2352 msnm, 19° 37' 92.4" de latitud norte y 102° 18' 01.7" de longitud oeste).....	<b>53</b>
Figura 2.2. Escala de severidad de síntomas de <i>Armillaria</i> en aguacate.....	<b>55</b>
Figura 3.3. Gráfica de severidad y distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis en julio 2012.....	<b>57</b>
Figura 3.4. Gráfica de severidad y distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis en septiembre 2012. ....	<b>58</b>
Figura 3.5. Gráfica de severidad y distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis en enero 2013.....	<b>59</b>
Figura 3.6. Gráfica de severidad y distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis en mayo 2013. ....	<b>60</b>
Figura 3.7 Evolución de la severidad en árboles de aguacate con Armillariosis ciclo 2012-2013. ....	<b>61</b>

### **CAPÍTULO IV. HISTOPATOLOGÍA DE RAÍCES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill) INFECTADAS CON *Armillaria***

Figura 4.1. Síntomas en árboles de aguacate infectados con <i>Armillaria</i> en campo.....	<b>82</b>
Figura 4.2. Síntomas inducidos por <i>Armillaria</i> en plántulas de aguacate Hass mantenidas bajo invernadero.....	<b>83</b>
Figura 4.3. Sección transversal de raíz sana de aguacate. ....	<b>85</b>
Figura 4.4. Sección transversal y longitudinal de raíces de aguacate infectadas natural y artificialmente con <i>Armillaria</i> . ....	<b>86</b>
Figura 4.5. Cortes transversales de raíces de aguacate infectadas natural y artificialmente.....	<b>87</b>

## **CAPÍTULO V. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE LOS RIZOMORFOS DE *ARMILLARIA***

Figura 5.1. Rizomorfos de <i>Armillaria</i> en un huerto de aguacate y rizomorfos desarrollados en el suelo .....	<b>101</b>
Figura 5.2. Cortes histológicos de rizomorfos de <i>Armillaria</i> de campo.....	<b>101</b>
Figura 5.3. Rizomorfo de <i>Armillaria</i> aislado de raíces de aguacate, después de tres semanas de crecimiento en medio de cultivo BDS. ....	<b>103</b>
Figura 5.4. Cortes histológicos de rizomorfos de <i>Armillaria</i> en medio de cultivo BDS. ....	<b>104</b>

# CAPÍTULO I

## 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es líder mundial en el mercado de aguacate Hass, los principales estados productores de aguacate son Michoacán, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Guerrero y Puebla. En Michoacán, el volumen de la producción en 2010 fue de 951,000 t con un rendimiento medio de 9.2 t ha<sup>-1</sup> (Fierro, 2011), en 2012 fue de 1,117, 338.49 t con un rendimiento por hectárea de 10.59 t ha<sup>-1</sup>, y hasta julio de 2013 el rendimiento fue de 818,989 t y 7.7 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2013). Actualmente 22 municipios productores de aguacate en Michoacán suman 104,778 ha y el 81% de la superficie se ubica en los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Tacámbaro, Salvador Escalante, Ario de Rosales y Nuevo Parangaricutiro (Vallejo, 2011). Como muchas otras especies frutales, el aguacate durante sus diferentes etapas de desarrollo sufre el ataque de fitopatógenos que le causan diversas enfermedades, algunas de las cuales son endémicas. De estos problemas fitosanitarios destacan las enfermedades causadas por los hongos debido a su amplia distribución y diseminación (Téliz y Mora, 2007; Castañeda, 2009; Ochoa, 2011). El aguacate tiene alta susceptibilidad a los patógenos del suelo (Ogawa y Lyons, 1983; Phillips *et al.*, 1986; Téliz y Mora, 2007; Castañeda, 2009; Andrade *et al.*, 2011) como *Phytophthora cinnamomi* Rands que causa la pudrición de raíz o 'tristeza del aguacatero'. Esta enfermedad se reconoce como la más importante y destructiva y ha llegado a ser un factor limitante para la producción en diferentes países como México, Australia, Sudáfrica y Estados Unidos provocando

pérdidas del 20 al 25% (Ogawa y Lyons, 1983; Castañeda, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Ochoa, 2011).

*Armillaria* es un fitopatógeno relativamente nuevo en el aguacate, nativo de especies forestales como *Pinus radiata*, *Pseudotsuga menziessi* y *Larix occidentalis* (Robinson y Morrison, 2001; Solla *et al.*, 2002; Van Der Kamp y Hood, 2002; Cleary *et al.*, 2012) y *Quercus cerris* (Gioia *et al.*, 2003); también ataca a la vid (Baumgartner, 2004; Nogales *et al.*, 2009) y durazno (Beckman y Pussey, 2001). *Armillaria* mata árboles frecuentemente estresados por condiciones desfavorables, insectos y otros patógenos (Valdez *et al.*, 2004; Ochoa, 2011). En áreas donde la superficie forestal ha sido sustituida como parte del manejo, las plantas que se establecen son afectadas por *Armillaria*, conduciéndolas con frecuencia a su muerte (Valdez *et al.*, 2004). En el estado de Michoacán, el área forestal se está reemplazando por aguacate lo que ha ocasionado la muerte de árboles de este cultivo. *Armillaria* inverna en forma de micelio o rizomorfo en los árboles enfermos, raíces descompuestas o en el suelo (Agrios, 2005; Morales, 2009); se comporta como saprófito facultativo, lo que le permite mantenerse en el suelo por tiempo indefinido. Los rizomorfos que forma están constituidos por hifas diferenciadas y actúan como estructuras de reproducción asexual y de resistencia, lo que limita la eficacia de los métodos de control (Aguin *et al.*, 1998). La información acerca de *Armillaria* en aguacate no es precisa; algunos reportan a *Armillaria mellea* (Tamayo, 2007; Coria, 2008; Morales, 2009; Ochoa, 2011), pero la etiología no se ha confirmado. Los síntomas son variables, en especies de coníferas forestales se menciona resinosis, amarillamiento foliar que posteriormente se torna de color café y defoliación (Solla *et al.*, 2002). Los síntomas reportados en aguacate son



amarillamiento y defoliación apical (Tamayo, 2007; Coria, 2008), acortamiento de entrenudos y reducción del crecimiento (Morales, 2009), decaimiento lento y progresivo o decaimiento rápido y muerte súbita, manteniendo las hojas adheridas (Ochoa, 2011). Respecto al control, hasta la fecha no hay un método efectivo, en general se recomienda eliminar el árbol infectado, y hacer aplicaciones de sulfato cúprico y cal hidratada, cobre metálico, benomyl, propiconazole, tetratiocarbonato de sodio (STTC), cubiet (cobre bis (etoxi-dihidroxi-dietilamino) sulfato) y 2 - (tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB) que son productos registrados para el control de *Armillaria* en vid (Aguín *et al.*, 2006). Dentro del control biológico se maneja *Trichoderma viridae* y *T. atroviride* SC1 (Baumgartner, 2004; Tamayo, 2007; Longa *et al.*, 2009; Morales, 2009; Ochoa, 2011), antagonistas potenciales contra *A. mellea* en las raíces. Estas medidas no garantizan el control del patógeno, se requieren varias estrategias para el control efectivo (Ochoa, 2011).

Los objetivos de la presente investigación fueron (1) identificar la especie de *Armillaria* asociada a la pudrición de la raíz en aguacate, (2) describir epidemiológicamente la incidencia y severidad, (3) caracterizar las alteraciones estructurales en raíces infectadas natural y artificialmente y (4) determinar las pérdidas económicas causadas por este hongo.

## 1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.2.1. Importancia económica del aguacate

La importancia del aguacate en el mercado internacional ha crecido sostenidamente; a nivel internacional, la explotación comercial de este cultivo se ha intensificado en las últimas dos décadas. La producción mundial del aguacate ha incrementado a 550, 000 toneladas durante los últimos 15 años. El aguacate tiene un gran mercado para su consumo en fresco, en la industria del aceite, cosméticos, jabones, shampoos y como guacamole, congelados y pasta (APROAM; 2013).

México es líder mundial en el mercado del aguacate, participó en 2009 con 27% de la superficie total sembrada, es el principal exportador con el 40% y el de mayor consumo per-cápita, con 10 kg al año. Los rendimientos por hectárea ocupan el cuarto lugar a nivel mundial (10.1 Ton./Ha.), por debajo de República Dominicana (19.3 Ton./Ha.), Colombia (16.5 Ton./Ha.), Brasil (12.9 Ton./Ha.), seguido por Chile (10 Ton./Ha.), Estados Unidos e Indonesia (9.8 Ton./Ha.) (Secretaría de Economía, 2012).

Los principales estados productores de aguacate en México son Michoacán, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Guerrero y Puebla. El 82% de la superficie nacional se siembra en Michoacán (Vallejo, 2011, SAGARPA, 2013), con una producción en 2010 de 951,000 ton (88% nacional) y una productividad de 9.2 Ton/Ha. El proceso productivo y actividades derivadas generan más de 40 mil empleos permanentes y 60 mil empleos estacionales, equivalentes a 9 millones de jornales al año (Fierro, 2011). La franja aguacatera del estado de Michoacán es una región volcánica reciente que ocupa 7,752 km<sup>2</sup> y representa el 12.9% de la superficie estatal (Beltrán, 2013). El 40%

de esta superficie la ocupan los bosques de pino, el 9% bosques de encino y el 26% lo representa la superficie agrícola (Salazar *et al.*, 2005; Téliz y Mora, 2007). Los 22 municipios productores de aguacate en Michoacán suman 104,778 ha y el 81% de la superficie se ubica en los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Tacámbaro, Salvador Escalante, Ario de Rosales y Nuevo Parangaricutiro (Vallejo, 2011).

### **1.2.2. Enfermedades de raíz del aguacate**

Como muchas otras especies frutales, el aguacate sufre el ataque de enfermedades durante sus etapas de desarrollo (Ochoa, 2011). Muchas de estas enfermedades son endémicas y se encuentran confinadas a ciertas regiones, pero otras se encuentran ampliamente diseminadas y representan graves riesgos. A nivel mundial se reportan 50 agentes fitopatógenos, responsables de 30 enfermedades, así como 12 desordenes fisiológicos, de los que destacan las enfermedades causadas por hongos por su amplia distribución y fácil diseminación (Ochoa, 2011). El aguacate es muy susceptible a los patógenos del suelo (Phillips *et al.*, 1986). La pudrición de raíz o ‘tristeza del aguacatero’ causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, se reconoce como la enfermedad más importante y destructiva del aguacate y ha llegado a ser un factor limitante para la producción en diferentes países como México, Australia, Sudáfrica y Estados Unidos (Phillips *et al.*, 1986; Téliz y Mora, 2007; Castañeda, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Ochoa, 2011); además de la pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivorum*), pudrición blanca (*Rosellinia necatrix*), la languidez del aguacate (*Verticillium albo-atrum*) y el colapso (*Ganoderma* sp) (Teliz y Mora, 2007)

*Armillaria* se ha descrito como un problema fitosanitario de importancia económica en Michoacán a partir del 2007 (Tamayo, 2007) y en Morelos a partir de 2008 (Coria, 2008). *A. mellea* se ha registrado como la especie patógena en aguacate (Tamayo, 2007; Coria, 2008; Morales, 2009; Ochoa, 2011), pero, se requiere un estudio etiológico y taxonómico detallado.

### **1.2.3. La Armillariosis**

*Armillaria* está ampliamente distribuida en ecosistemas forestales y agrícolas en México (Alvarado, 1998; Cannon *et al.*, 2007, Tamayo, 2007; Téliz y Mora, 2007; Coria, 2008; Morales, 2009; Ochoa, 2011,), Nueva Zelanda (Van Der Kamp y Hooke, 2007), España (Nogales, 2006), Italia (De Gioga *et al.*, 2003), Estados Unidos (Rizzo y Whiting, 1998, Baumgartner *et al.*, 2011) y Kenia (Otieno *et al.*, 2003). En Michoacán y Morelos se observa particularmente en huertos de aguacate establecidos sobre terrenos forestales o en terrenos en donde previamente se cultivó durazno (Coria, 2008). Las grandes superficies afectadas en las proximidades del volcán Parícutín, en San Juan Viejo y Zacán son ejemplo del daño e importancia socioeconómica de *Armillaria* en Michoacán (Ochoa, 2011).

Este patógeno forma parte de un complejo de Hymenomycetes conocidos por su amplia gama de hospedantes y la variabilidad de sus cuerpos fructíferos (Young *et al.*, 1992). Las características morfológicas de *Armillaria* son muy variables entre especies. De manera general Shaw y Kile (1991) mencionan algunas características importantes a nivel género para diferenciarlo de otros basidiomicetes; macromorfología del basidioma, estructura y ornamentación del píleo, características del anillo,

ornamentación del estípite, presencia o ausencia subhimenial o basidial de fíbulas, localización de pigmentos en las paredes de las vacuolas además del tamaño y ornamentación de las basidiosporas. Es probable que otras especies de *Armillaria* estén involucradas, por lo que es necesario precisarlas con metodologías moleculares, compatibilidad somática y morfología del basidiocarpo.

El cuerpo fructífero de *Armillaria* es marrón a rojizo convexo, que posteriormente se hace plano con la edad. La etapa vegetativa del hongo tiene dos formas. Una forma son los rizomorfos, que crecen debajo de la corteza y que son planos, con coloración negra a marrón rojizo, y hasta 5 mm. de ancho. La capa exterior se compone de un micelio compacto oscuro y el núcleo interno es micelio blanco. Los rizomorfos que crecen en el suelo son cordones cilíndricos oscuros y se parecen a las agujetas de zapatos. El micelio que crece en las raíces y en el cuello del tronco del árbol presenta a menudo márgenes en forma de abanico, con coloración blanca (Forest Pest Fact Sheet, 2013).

El ciclo biológico de *Armillaria* en aguacate no se ha descrito en México. De manera general, Agrios (2005) menciona que el hongo inverna en forma de micelio o rizomorfos en los árboles enfermos, raíces descompuestas o en el suelo; esta es la fase saprófita. Como saprófita facultativo sobrevive durante un largo tiempo en madera muerta, en ausencia de cualquier hospedante vivo (Baumgartner y Rizzo 2006). Este material en descomposición es una fuente de inóculo de la que *Armillaria* puede propagarse a hospedantes nuevos y convertirse en parásito (Forest Pest Fact Sheet, 2013). El principal mecanismo de propagación del hongo de un árbol a otro es a través de rizomorfos o por contacto directo de las raíces de un árbol enfermo a uno sano

(Royal Horticultural Society, 2013; Forest Pest Fact Sheet, 2013). Los rizomorfos crecen desde las raíces de los árboles infectados o desde las raíces de tocones descompuestos, a través del suelo, hasta las raíces de los árboles sanos adyacentes y penetran la raíz e inician la infección por presión mecánica y la acción de algunas enzimas (Forest Pest Fact Sheet, 2013; Worrall *et al.*, 1986). Cuando las raíces sanas de los árboles entran en contacto con las raíces infectadas o descompuestas, el micelio las invade sin formar rizomorfos (Agrios, 2005). Una vez que el árbol muere, *Armillaria* se convierte nuevamente en saprófito. Los cuerpos fructíferos (basidiocarpos) se producen en la temporada de lluvias en la base de los árboles enfermos (Forest Pest Fact Sheet, 2013). El hongo puede propagarse por basidiosporas, que colonizan inicialmente los tocones o los tejidos leñosos muertos, posteriormente los rizomorfos que atacan a las raíces vivas directamente o a través de heridas (Agrios, 2005; Forest Pest Fact Sheet, 2013). Los árboles debilitados por otras causas son atacados por *Armillaria* con mayor facilidad que los árboles vigorosos.

El control de la pudrición de raíz por *Armillaria* es difícil; hasta la fecha no hay un método efectivo para erradicar a este patógeno (Royal Horticultural Society, 2013). La remoción de residuos orgánicos en áreas nuevas no garantiza el control de la enfermedad. En áreas infectadas, los árboles muertos y los tocones deben ser removidos y no se debe replantar en esos sitios. *A. mellea* es sensible a la sequía por lo que la remoción de tierra en torno a las raíces y corona retarda su avance (Ochoa, 2011). El manejo químico es de efectos limitados debido a la dificultad de llegar a los patógenos en las raíces del suelo a profundidades de hasta 2 m. La infusión intravascular de troncos de árboles se sugirió como una posible estrategia para el

control de los patógenos del suelo y raíz en especies arbóreas (Amiri y Schnabel, 2012). Baumgartner (2004) controló *Armillaria* en huertos y viñedos fumigando el suelo antes de la siembra con bromuro de metilo y disulfuro de carbono que pueden matar o debilitar el micelio en segmentos de madera enterrados. En contraste, el tetratiocarbonato de sodio aplicado en almendros no controló. En España, el tetratiocarbonato de sodio (STTC), cubiet (cobre bis (etoxi-dihidroxi-dietilamino) sulfato) y 2 - (tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB) son los únicos productos registrados para el control de *Armillaria* en vid (Aguín *et al.*, 2006). En algunas áreas de Michoacán, se están ensayando tratamientos con propiconazole en estadios iniciales de la enfermedad a la raíz y tronco, con resultados promisorios (Ochoa, 2011). Amiri y Schnabel (2012) sugieren el uso de propiconazol, que en raíces de durazno persiste 12 meses después de la aplicación, si esta persistencia ocurriera también en el fruto de aguacate, sería negativo para su comercialización. El crecimiento del micelio de *Armillaria tabescens* se inhibió *in vitro* a una dosis de propiconazol de 0,6 g / ml (Amiri *et al.*, 2008). *A. mellea* puede ser controlado con aplicaciones de metam sodio aun cuando puede encontrarse a grandes profundidades en el suelo colonizando raíces largas (Ochoa, 2011). Hongos hiperparásitos como *Trichoderma viridae* pueden ser utilizados en el control de *Armillaria* (Baumgartner, 2004; Ochoa, 2011). *T. atroviride* SC1, cuando se encuentra en la rizosfera es un antagonista potencial que podría ofrecer protección contra el establecimiento de *A. mellea* en las raíces (Longa *et al.*, 2009).

### 1.3. LITERATURA CITADA

- Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. 5<sup>th</sup> edition. Elsevier, United States of America, 922 p.
- Aguín O., Mansilla P., Pintos C., Salinero M. C. 1998. La podredumbre blanca de la raíz de la vid. Vida Rural España 47:1-2.
- Aguín O., Mansilla P., Sainz M. J. 2001. A fast method for production of *Armillaria* inoculum. Mycologia 93: 612-615.
- Alvarado R. D., Blanchette, R. A. 1994. *Armillaria* species from forests of Central México. Phytopatology 84:1106.
- Amiri A., Schnabel G. 2012. Persistence of propiconazole in peach roots and efficacy of trunk infusions for *Armillaria* root rot control. International Journal of Fruit Science 12: 437-449.
- Amirí A., Bussey K.E., Riley M. B., Schnabel G. 2008. Propiconazole Inhibits *Armillaria tabescens* in vitro and translocates into peach roots following trunk infusion. Plant disease 92: 1293-1298.
- Andrade H. P., De León, C., Alvarado R. D., García E. R., López J. A., Molina G. E., Espíndola B. M.C. 2011. Rootstock selection of avocado (*Persea americana*) tolerant-resistant to *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings VII World Avocado Congress. 5 – 9 September. Cairns Convention Centre, Queensland, Australia.
- Asociación de Productores de Aguacate de México (APROAM). 2013. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. URL: <http://www.aproam.com/CULTIVO/produccion.htm>. Consulta realizada el 30 de julio de 2013.



- Baumgartner K. 2004. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Disease* 88:1235-1240.
- Baumgartner, K., Rizzo, D. M. 2006. Relative resistance of grapevine rootstocks to *Armillaria* root disease. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:408-414.
- Baumgartner K., Coetzee M. P.A., Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology* 12: 515-534.
- Beckman T.G., Pussey P.L. 2001. Field of testing peach rootstocks for resistance to *Armillaria* root rot. *Hortscience* 36:101-103.
- Beltrán P. H. 2013 El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: Detección y manejo. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo Texcoco. 117 p.
- Cannon P., N.B.K., Mee-Sook K., J.W y Alvarado R., D. 2007. An *Armillaria* survey in Mexico: A basis for determining evolutionary relationships, assessing potentially invasive pathogens, evaluating future impacts of climate change, and developing international collaborations in forest pathology. Western International Forest Disease Work Conference. October 15-19, Sedona, AZ. Salem, OR: Oregon Department of Forestry, p. 1-9.
- Castañeda G. E.L. 2009. Búsqueda de portainjertos tolerantes-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo Texcoco. 62 p.
- Cleary M.B., Van der Kamp B.J., Morrison D.J. 2012 A. Effects of wounding and fungal infections with *Armillaria ostoyae* in three conifer species. Host response to the pathogen. *Forest Pathology* 42:109-123.

- Coria A., V.M. 2008. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, Libro Técnico No. 8, Uruapan, Michoacán, 145-146 p.
- De Gioia, T., Ubaldo, R., Sicoli, G., Luisi, N. 2003. Occurrence and distribution of *Armillaria gallica* genets in a declining oak stand of southern Italy. *Phytopathology Mediterranea* 42:199–204.
- Fierro C., D. 2011. Etiología y manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo Texcoco. 52 p.
- Forest Pest Fact Sheet, 2013. *Armillaria* root disease (*Armillaria* spp.) Saskatchewan Ministry of Environment. Disponible en URL: <http://www.environment.gov.sk.ca/adx/asp/adxGetMedia.aspx?DocID=3630,184,121,104,81,1,Documents&MediaID=4160&Filename=Armillaria+root+disease.pdf>. Consulta realizada el 30 de julio de 2013.
- Longa C.M.O., Savazzini F., Tosi S., Elad Y., Pertot I. 2009. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1549–1557.
- Morales G. J. L. 2009. Enfermedades de importancia económica en el cultivo de aguacate en Michoacán, México. III Congreso Latinoamericano del Aguacate. Simposio fitosanidad. 11 y 12 de Noviembre, Medellín, Colombia 44 p.
- Nogales A., Aguirreolea E., Camprubí A. y Calvet C. 2009. Response of mycorrhizal grapevine to *Armillaria mellea* inoculation: disease development and polyamines. *Plant Soil* 317:177-187.

- Ochoa A., S. 2011. Enfermedades del aguacate de importancia económica en México. *In*. Memoria del XXIV Curso de Actualización Frutícola. 12-14 de octubre. Coatepec Harinas, México. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, p. 9-11.
- Ogawa J.M. and Lyons J.M. 1983. How commodity marketing orders help solve crop problems in California. *Plant Disease* 67:1042-1046.
- Otieno W., Pérez S. A., Termorshuizen A. 2003. Characterization of *Armillaria* isolates from tea (*Camellia sinensis*) in Kenya. *Mycologia* 95:160-175.
- Phillips D., Grant B R., Weste G. 1986. Histological changes in the roots of an avocado cultivar Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Cytology and Histology Phytopathology* 77:691-698.
- Rizzo D., M., Whiting E., C. 1998. Spatial distribution of *Armillaria mellea* in pear orchards. *Plant Disease* 82:1226-1231.
- Robinson R. M., Morrison D. J. 2001. Lesion formation and host response to infection by *Armillaria ostoyae* in the roots of western larch and Douglas-fir. *Forest Pathology* 31: 371-385
- Royal Horticultural Society. 2013. Honey Fungus. URL: <http://apps.rhs.org.uk/advicesearch/profile.aspx?pid=180#section4> (Consulta realizada el 30 de julio de 2013).
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2013. Sistema producto aguacate. URL: [http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Aguacate/Attachments/3/pr\\_mich.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Aguacate/Attachments/3/pr_mich.pdf) (Consulta realizada el 30 de julio de 2013).

- Salazar G. S., Zamora C.L., Vega L. R. J. 2005. Actualización sobre la industria del aguacate en Michoacán, México. *California Avocado Society Yearbook* 87:45-54.
- Shaw G C., Kile G A. 1991. *Armillaria* Root Rot. *Landscape Notes. Agriculture Handbook No. 691.USA.* 233 p.
- Secretaría de Economía. 2012. Monografía del Sector Aguacate en México: Situación Actual y Oportunidades de Mercado. URL: [www.se.gob.mx](http://www.se.gob.mx). Consulta realizada el 31 de julio de 2013.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Avance de siembras y cosechas por cultivo. SAGARPA. URL: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=348](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=348). Consulta realizada el 17 de septiembre de 2013.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Cierre de la producción agrícola por estado. SAGARPA. URL: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351). Consulta realizada el 17 de septiembre de 2013.
- Solla, A., Tomlinson, F. Woodward, S. 2002. Penetration of *Picea sitchensis* root bark by *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae* and *Heterobasidio nannosum*. *Forest Pathology* 32: 55-70.
- Tamayo M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. *Politécnica Colombiana* 4:51-70.
- Téliz O. D., Mora A. A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. 2da Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.

- Valdez M., Córdoba J., Valenzuela R., Fierros M. A. 2004. Incremento del fitopatógeno *Armillaria mellea* (Vahl. Fr) Karsten en bosque de pino-encino, el relación al grado de disturbio por tratamiento silvícola. Revista Chapingo. Serie Forestales y del Ambiente 10: 99-103.
- Vallejo P. M.R., Téliz O. D., Nieto A. D., Ochoa M. D. L., Valdovinos P. G., Colinas L. M. T., De la Torre A. R. 2011. Fisiología y calidad postcosecha del aguacate cv. Hass infectado con el Avocado sunblotch viroid en Michoacán, México. Proceedings VII World Avocado Congress. 5 – 9 September. Cairns Convention Centre, Queensland, Australia.
- Van Der Kamp, B.J., Hood, I.A. 2002. *Armillaria* root disease of *Pinus radiata* in New Zealand. 2: invasion and host reaction. New Zealand Journal of Forestry Science32: 103-115.
- Worrall J.J., Chet I., Hüttermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. Journal of General Microbiology 132: 2527-2533.
- Young C. J., Sung M. J. Igarashi T. 1992. Biological species and morphological characteristics of *Armillaria mellea* complex in Hokkaido: *A. ostoyae* and *A. bulbosa*. Research Bulletins of the College Experiment Forests 49:185-194.

## CAPÍTULO II

### UNA NUEVA ESPECIE DE *Armillaria* ASOCIADA A LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE

#### RESUMEN

En Michoacán, la Armillariosis es una enfermedad que está matando árboles de aguacate en huertas establecidas en áreas previamente forestales. *Armillaria* sp. se aisló consistentemente de árboles muertos con pudrición de raíz y secamiento del follaje, se identificó por compatibilidad somática y PCR. Los apareamientos se combinaron con todos los cultivos puros de aguacate y uno de pino. Se obtuvo un grupo de compatibilidad distribuido en diferentes puntos del área de estudio. Los apareamientos con cepas de *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana* fueron incompatibles. La amplificación por PCR y secuenciación directa del ADN de la región intergénica (IGS-I) entre el extremo 3' del gen 26S y el gen 5S del ADNr de los 19 aislados resultaron en 57 secuencias que se editaron y alinearon para realizar el análisis virtual con enzimas de restricción (*Alu I*, *Hind II*, *Nde I*, *Bsm I* y *Tha I*) y el árbol filogenético. La secuencia de esta especie de *Armillaria* tuvo una longitud de 777 pb y no corresponde a ninguna especie de las 25 secuencias amplificadas con IGS comparadas en la base de datos del GenBank. Filogenéticamente *Armillaria* de aguacate está estrechamente ligada al grupo que conforma *A. tabescens*, *A. cepistipes*, *A. borealis* y *A. ectypa*. La identificación de esta especie se complementará con la descripción morfológica.

**Palabras clave:** compatibilidad somática, filogenia, IGS-I, reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación.

## CHAPTER II

### A NEW SPECIES OF *Armillaria* ASSOCIATED WITH THE ARMILLARIOSIS OF AVOCADO

#### ABSTRACT

In Michoacan, the Armillariosis is a disease that is killing avocado trees in orchards established in previously forest areas in Michoacan. *Armillaria* was isolated consistently from trees with root rot and drying of the foliage, was identified by PCR and somatic compatibility. The matings were combined with all pure cultures of avocado and one pine. Was obtained only one compatibility group distributed in different parts of the study area. Matings with isolates of *A. mellea*, *A. gallica* and *A. mexicana* were incompatible. The amplification by PCR and sequencing the DNA ribosomal of the intergenic region (IGS-I, between the 3' end of the gene 26S and the 5' of the gene 5S) of 19 isolates resulted in 57 sequences that were edited and aligned to make the virtual analysis with restriction enzymes (*Alu I*, *Hind III*, *Nde I*, *Bsm I* and *Tha I*) and the phylogenetic tree. Phylogenetically this *Armillaria* is closely linked to the group that makes up *A. tabescens*, *A. cepistipes*, *A.ectypa* and *A. borealis*. The secuencia of *Armillaria* sp. has a length of 777 pb and does not correspond to any of the species reported in the GeneBank. The identification of this species will be complemented by morphological description.

**Keywords:** chain reaction polymerase, IGS-I, phylogeny, sequencing, somatic compatibility.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

En Michoacán, la especie de *Armillaria* que infecta al aguacate no se ha identificado. Algunos autores atribuyen la enfermedad a la especie *A. mellea* (Téliz y Mora, 2000; Tamayo, 2007; Coria, 2008; Morales, 2009 y Ochoa, 2011), lo que coincide con estudios realizados en especies forestales, donde se menciona que el agente causal de la pudrición de la raíz es una especie pleiomórfica, *A. mellea* (Vahl. Fr.) Kummer (Singer 1956). A finales de 1970 Korhonen (1978) y Anderson y Ullrich (1979) reconocieron a *A. mellea* como especie biológica. Sin embargo, estudios genéticos recientes de *Armillaria* en especies forestales, indican que *A. mellea* se compone de un complejo de varios grupos (Proffer *et al.*, 1986). La identificación de especies de *Armillaria* por métodos tradicionales, en campo y laboratorio, plantea muchas dificultades ya que se basa en características morfológicas del micelio, rizomorfos y basidiocarpos que presentan poca variación (Mansilla *et al.*, 2000) como en el caso de *A. cepistipes* y *A. gallica*, que son muy similares morfológicamente (Termorshuizen y Arnolds, 1987; Guillaumin *et al.*, 1996). La incompatibilidad somática (IS) o reacciones interespecíficas de incompatibilidad, análisis de isoenzimas, RAPDs y análisis de RFLPs (Smith *et al.*, 1990; 1992, Rizzo y Harrington, 1993; Worrall 1994, Guillaumin *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 1997) se han utilizado para diferenciar este género, además de estudios complementarios que incluyen la morfología de los cuerpos fructíferos, rizomorfo y crecimiento en medio de cultivo (Schulze *et al.*, 1997). En la mayoría de los estudios, todos los métodos de detección dan resultados idénticos, aunque algunos estudios han demostrado diferencias de menor importancia (Ota *et al.*, 2000). La compatibilidad somática, ha sido usada por varios autores para la identificación de



especies heterotálicas de *Armillaria* (Ndongo y Guillaumin, 1997) y se refiere a la prevención de la fusión y la integración, después de reconocimiento de los apareamientos entre especies genéticamente distintas, donde se observa la línea pigmentada y puede ser una zona con micelio escaso en los lados (Worral, 1997). En este método, se presentan dos tipos de reacciones; la primera es la asociación haploide o diploide y la segunda, es la presencia de una línea pigmentada en el medio de cultivo entre las dos colonias apareadas (Ndongo y Guillaumin, 1997). Sin embargo, este método presenta limitaciones, el micelio del hongo debe estar aislado en medio de cultivo y los resultados tardan entre 4 y 5 semanas y en muchos casos, son ambiguos y subjetivos (Mansilla *et al.*, 2000; Harrington y Wingfield, 1995). La diversidad genética es generalmente mayor entre los grupos de compatibilidad somática, pero la variación sustancial genética en el caso de patógenos, puede existir en algunos casos, dentro de los grupos (Worral, 1997). Los análisis de isoenzimas muestran diferencias interespecíficas y algunas diferencias entre los aislados de la misma especie (Ota *et al.*, 1997). El desarrollo de la técnica de PCR, permite amplificar secuencias específicas de ADN de forma exponencial por síntesis *in vitro* (Mansilla *et al.*, 2000). La secuencia de la región intergénica (IGS) del ADN ribosomal (ADNr), facilita la técnica de PCR con el análisis de fragmentos de restricción (RFLP) para la diferenciación de especies (Mansilla *et al.*, 2000; Harrington y Wingfield, 1995). Usando datos de la secuencia de la región del espacio intergénico (IGS) entre el extremo 3' del gen 26S y del gen 5S del ADNr nuclear utilizado por Anderson y Stasovsky (1992), Harrington y Wingfield (1995), se amplifica una porción del operón del DNA ribosomal de los IGS que posteriormente se observa en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y en el

producto de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) (Schulze *et al.*, 1997). Tanto el espacio interno transcrito (ITS) y el espacio intergénico (IGS) del ADNr son altamente polimórficos y proporcionan herramientas útiles para estudios taxonómicos y filogenéticos (Chillali *et al.*, 1998). Con base en las secuencias altamente conservadas de estas regiones, se han diseñado primers de PCR para amplificar los espacios transcritos internos e intergénicos (White *et al.*, 1990; Henrion *et al.*, 1992; Gardes y Bruns, 1993). Estas técnicas han proporcionado un enfoque contemporáneo a la identificación de *Armillaria spp.*, utilizando características basadas en el ADN; ésto ha facilitado la rápida identificación de los aislamientos de campo para cuando los basidiocarpos no están disponibles (Coetze *et al.*, 2001).

Por los antecedentes de este patógeno en aguacate, los objetivos de la presente investigación fueron; identificar la especie de *Armillaria* en aguacate y determinar los grupos de compatibilidad presentes en aguacate.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Identificación molecular y compatibilidad somática

Las muestras de árboles infestados con *Armillaria*; se recolectaron en la huerta Xhanamba de aguacate Hass y Mexicano, localizada en el municipio de Charapan (19.37' 92.4" latitud norte. 102.18'01.7" longitud oeste. 2352 msnm), y de la huerta Comburinda en el municipio de Salvador Escalante (19.41'67.0" latitud norte. 101.81'70.0" longitud oeste. 2227 msnm) en el estado de Michoacán.

Raíces con signos del hongo se recolectaron de árboles sintomáticos (S) y muertos (M), se etiquetaron y colocaron en bolsas de plástico en una hielera, se trasladaron al laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados. Las muestras se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suelo. Los rizomorfos se cortaron en secciones de 1cm de longitud, se pasaron a una solución de cloro al 20% durante 10 min, en peróxido de hidrógeno al 3% por 5 min, y se enjuagaron con agua destilada estéril entre cada cambio (Cannon *et al.*, 2007; Aguín *et al.*, 2001). Para eliminar la humedad se secaron con una sanita estéril. El tejido con micelio se procesó de la misma manera, a excepción del peróxido de hidrogeno, el cual se sustituyó por alcohol al 70% debido a que el agua oxigenada es muy agresiva para desinfestar el tejido con micelio.

Los rizomorfos y el micelio se cultivaron en el medio selectivo BDS (Aguín *et al.* 2001; Cannon *et al.*, 2007) [extracto de malta (AM) con benomyl (40 mg), dicloran (20 mg) y estreptomycin (100 mg)]. Cinco segmentos de rizomorfos y de corteza con

micelio se colocaron en Cajas Petri, se cubrieron con papel aluminio y se guardaron en una caja a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Los aislamientos puros se conservaron en tubos de polipropileno de 5ml con medio selectivo VCAM (Very Cold *Armillaria* Medium (1.5% agar, 0.75% extracto de malta, 0.5% peptona y 0.75% dextrosa) (Cannon *et al.*, 2007); las dosis que se utilizaron fueron; 7.5 gr de agar, 3.75 gr de extracto de malta, 2.5 gr de peptona y 3.75 gr de dextrosa para 500 mL. El medio de cultivo se esterilizó durante 15 min a 120°C. Los tubos se almacenaron a 4°C.

La extracción de ADN se realizó de aislamientos de cuatro semanas de edad cultivadas en extracto de malta al 1% de acuerdo con los protocolos de Dellaporta *et al.* (1983), basado en el uso de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio); CTAB (Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio) (Gardes y Bruns, 1993; Otieno *et al.*, 2003) y el kit de extracción ZR Fungal Bacterial DNA Microprep™ Marca Zymo Research. La cantidad y calidad de ADN se hizo en un Nanodrop y se visualizó un fotodocumentador BIORAD Universal Hood II en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. También se hizo la extracción directa de ADN de rizomorfos y micelio de la raíz con el kit mencionado previamente; en este caso las muestras se desinfectaron como lo indica el protocolo de Aguíñ *et al.* (2004).

La PCR se realizó bajo el protocolo de Harrington y Wingfield (1995). La mezcla de reacción de PCR fue: 10 µL de Buffer, 4 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTP's, 1 µL de cada primer, 0.5 µL de Taq Polymerasa (Go Taq<sup>R</sup> Flexi DNA Polymerase), 31.5 µL de agua libre de ADNas y 1 µL de DNA para un volumen final de 50 µL. Los primers utilizados fueron los utilizados por Anderson y Stasovski (1992); LR12R (5'CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA3') (Veldman *et al.*, 1981) y O-1 (5'

AGTCCTATGGCCGTGGAT3') (Duchesne y Anderson, 1990) que amplifican un fragmento de la región IGS-I entre el extremo 3' del gen 26S y el extremo inicial del gene 5S del ADN ribosomal (ADNr) (Anderson y Stasovski, 1992; Baumgartner y Rizzo, 2001; Kim *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2010). Las condiciones para PCR fueron: 1 ciclo de 95 °C por 95 segundos (desnaturalización), seguido de 35 ciclos de 60 °C por 40 segundos (alineamiento), 72 °C por 2 minutos (elongación) y 90°C por 30 segundos (desnaturalización). La elongación final fue en un ciclo de 72 °C durante 10 minutos (Harrington y Wingfield, 1995). Esta reacción se llevó a cabo en el termociclador BIORAD MyCycler Thermal Cycler. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En cada carril se cargaron 2 µl del control positivo, negativo y del producto de PCR, además de incluir el marcador de 100 pares de bases (pb) Promega®. La electroforesis se realizó a 86 voltios durante 40 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio (1 µl) y se observó en el fotodocumentador BIORAD Universal Hood II.

Las secuencias se editaron en el programa GENE RUNR y ClustalW (Chena *et al.*, 2003; Otieno *et al.*, 2003) y se compararon con la base de datos del GenBank.

Para el análisis de restricción, se utilizó el programa Gen Script Restriction Enzyme Map Analysis Tools. Las enzimas fueron *Alu I*, *Hind III*, *Tha I* y *Bsm I* (Harrington y Wingfield, 1995; Mansilla *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2010; Baumgartner *et al.*, 2011).

Las pruebas de compatibilidad se realizaron con la confrontación de cepas en extracto de Malta al 2% (26.35 gr de Agar extracto de Malta; 500 ml de agua destilada) (Baumgartner *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2009; Peabody *et al.*, 2005). Fragmentos de

micelio de 1 mm de diámetro, se colocaron en las Cajas Petri separadas a 2 mm entre aislamientos. Se realizaron 3 repeticiones de cada apareamiento y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 días. La identificación de la especie se determinó por el aspecto y la formación de la línea pigmentada entre las colonias.

Otro parámetro que se tomó como base para diferenciar las especies, fue el patrón de crecimiento, comparado con las especies *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana*, aisladas de durazno en el Estado de México (Elías, 2013).

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Análisis molecular

El ADN extraído con CTAB se corroboró en el gel de agarosa (Figura 1). Esta metodología mostró buena concentración y absorbancia de acuerdo a los resultados obtenidos en el Nanodrop. Algunas muestras se degradaron (Pozo 2, 3, 4, 12, 16 y 19) posiblemente por errores en el pipeteo durante la extracción, sin embargo, esto no interfirió en el procedimiento de PCR. Las muestras de los pozos 3, 5 y 13 corresponden a la extracción realizada con el protocolo de DellaPorta y los restantes (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 y 18) con la metodología de CTAB. La cantidad colectada de ADN con el kit de extracción fue menor (20 uL) comparada con el protocolo de DellaPorta y CTAB.

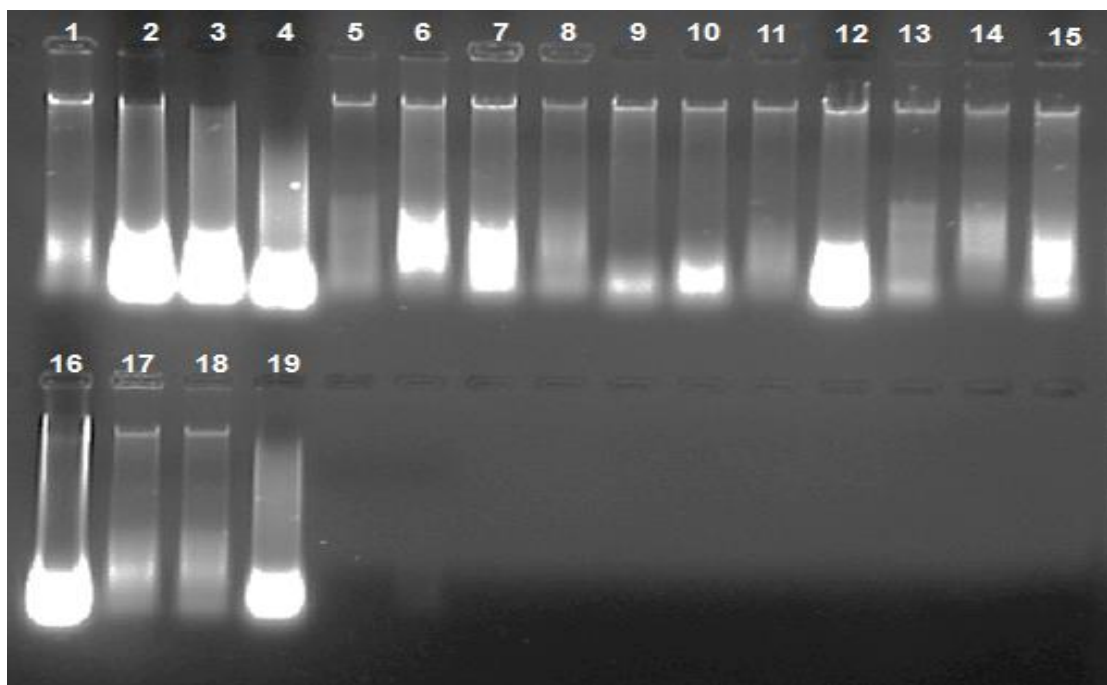


Figura 1. DNA de *Armillaria* visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En el carril 3 y 15 la extracción se realizó con el protocolo de Dellaporta, los restantes se realizaron bajo la metodología del CTAB.

La amplificación de la PCR con el ADN de todas las cepas fue buena; el producto de PCR amplificó con los primers utilizados en el protocolo de Harrington y Wingfield (1995) y resultó un fragmento de aproximadamente 800 pb, que concuerda con el rango obtenido por Mansilla *et al.*, (2000) para *Armillaria gallica* y *A. ostoyae* (Figuras 1 y 2).

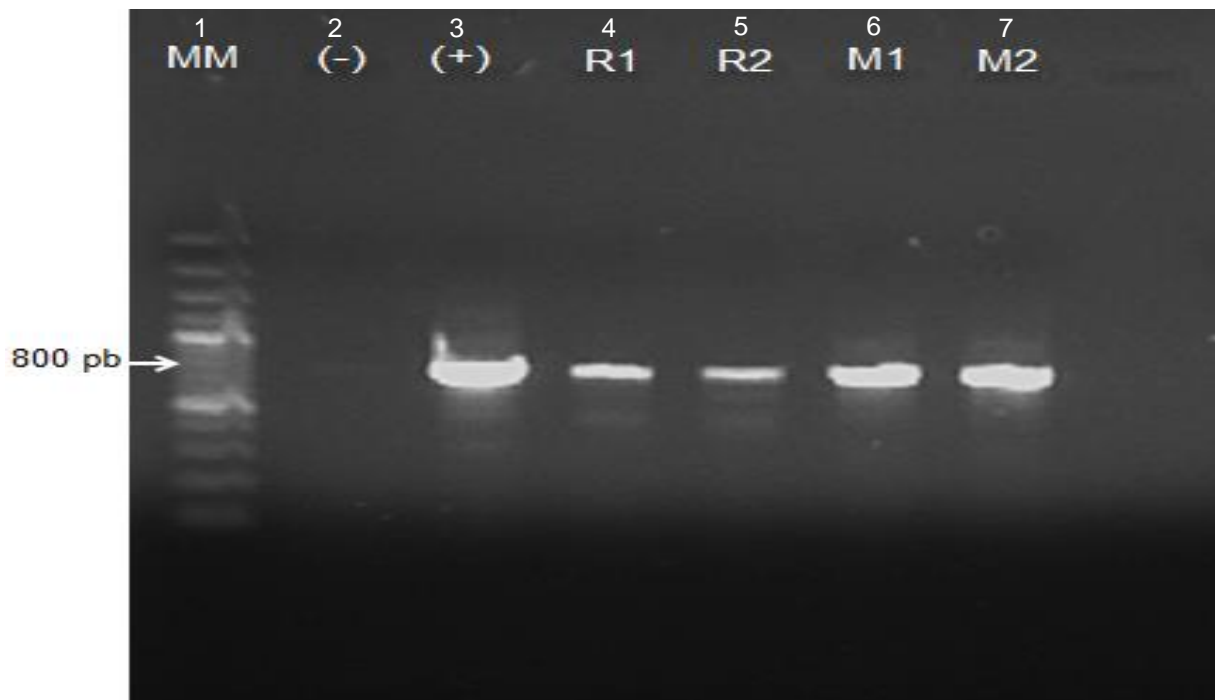


Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando la amplificación del producto de PCR de la región IGS-1 con extracción directa de rizomorfos y micelio de la raíz con el kit ZR Fungal Bacterial DNA Microprep™. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®), en carril 2 control negativo, carril 3 control positivo y del carril 4 al 7 producto de PCR. La banda amplificada es de un fragmento de aproximadamente 800 pb.



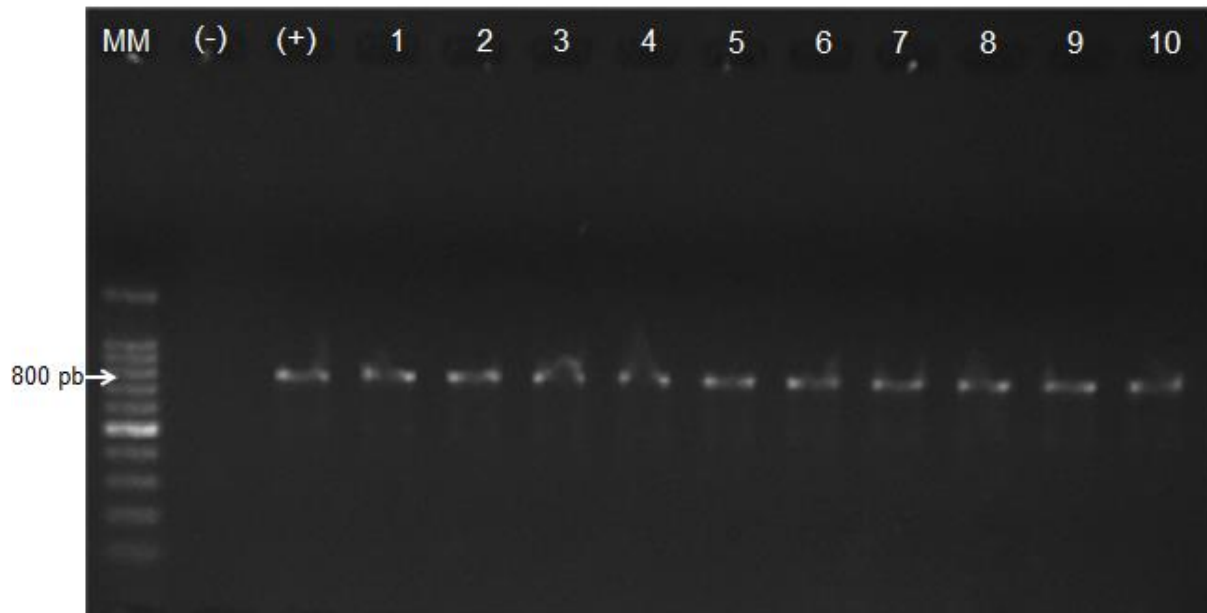


Figura 3. Producto de PCR en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®), en carril 2 control negativo, carril 3 control positivo y del carril 4 al 12 son las muestras de DNA de *Armillaria* amplificando una banda de aproximadamente 800 pb.

Las secuencias editadas y alineadas en los programas GENE RUNR y ClustalW (Chena *et al.*, 2003; Otieno *et al.*, 2003) resultaron en una secuencia consenso de 777 pb que corresponde con la región IGS-I situada entre el extremo 3' del ARN de la subunidad ribosomal grande y el extremo 5' del gen del ARN ribosómico 5S (Harrington y Wingfield, 1995; Baur *et al.*, 1998; Prospero *et al.*, 1998). Estos resultados no son suficientes para determinar la especie. El análisis de las enzimas de restricción con secuencias de la base de datos del GenBank, de la región IGS-1 (Cuadro 1) (Hasegawa *et al.*, 2010), mostraron diferencias en los sitios de corte con la enzima *Alu I* como lo mencionan Harrington y Wingfield (1995) y Mansilla *et al.*, (2000). Los resultados con la enzima *Alu I* mostraron los polimorfismos útiles encontrados para la identificación por Coetzee *et al.*, (2001), Kim *et al.* (2001) y Otieno *et al.* (2003),

mostrando variación con todas las especies. Baumgartner y Rizzo (2001) reportaron fragmentos de 320 y 155 pb para la especie *A. mellea*, y tres fragmentos de 399, 240 y 183 pb para *A. gallica*. González *et al.*, (2009) mencionaron que la enzima *Alu I* produjo tres bandas por encima de los 100 pb (320, 180 y 155) para el primer patrón de *A. mellea*, y para el segundo patrón de la misma especie se presentaron dos bandas de 320 y 180 pb. Coetzee *et al.* (2001) y Mansilla *et al.* (2001) reportaron tres patrones con longitud diferente 215, 175 y 150 para la misma especie. Mientras que para *A. gallica* hay diferencias en la primer y tercer banda de acuerdo a González *et al.* (2009) (400, 240 y 190 pb). El análisis realizado con el programa mostró dos patrones para *A. mellea*, el primero con seis bandas (38, 221, 251, 490, 892, 1024 pb) y el segundo con tres (92, 132, 459 pb), mientras que *A. gallica* mostró cuatro bandas (44, 65, 226, 256 pb). Con base en estos resultados el análisis filogenético con IGS-1 se realizó con las especies mencionadas en el cuadro 1 (Coetzee *et al.*, 2001).

**Cuadro 1.** Resultados del análisis de las secuencias de *Armillaria* del GenBank con la enzima *Alu I*.

<b>Especie</b>	<b>No. accesión</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Posición/sitio de corte</b>
<i>Armillaria sp (Mich.)</i>		1	133/135
<i>Armillaria mellea</i>	AY207144.1	6	38/40, 221/223, 251/253, 490/492, 892/894, 1024/1026
<i>Armillaria mellea</i>	FJ664597.1	3	92/94, 132/134, 459/461
<i>Armillaria solidipes</i>	JF895918.1	4	44/46, 65/67, 226/228, 256/258
<i>Armillaria tabescens</i>	HQ232286.1	4	76/78, 498/500, 543/545, 604/606
<i>Armillaria NABS</i>	F243062.1	4	275/277, 457/459, 471/473, 510/512
<i>Armillaria luteovirens</i>	EU586021.1	1	76/78
<i>Armillaria ostoyae</i>	JQ898313.1	4	92/94, 646/648, 927/929, 936
<i>Armillaria lutea</i>	AF243066.1	2	457/459, 471/473
<i>Armillaria gallica</i>	JF895913.1	4	44/46, 65/67, 226/228, 256/258
<i>Armillaria cepistipes</i>	EU257710.1	5	44/46, 445/447, 627/629, 641/643, 680/682
<i>Armillaria ectypa</i>	EU257712.1	5	60/62, 451/453, 558/560, 592/594, 623/625
<i>Armillaria sp</i>	AY773969.1	12	345/347, 366/368, 387/389, 411/413, 440/442, 530/532, 576/578, 629/631, 756/758, 805/807, 882/884, 887/889
<i>Armillaria luteobubalina</i>	AF445068.1	7	142/144, 185/187, 292/294, 297/299, 327/329, 408/410, 437/439
<i>Armillaria gemina</i>	FJ495079.1	6	180/182, 324/326, 331/333, 378/380, 572/574, 648/650
<i>Armillaria affinis</i>		5	58/60, 240/242, 270/272, 745/747, 920/922
<i>Armillaria sinapina</i>	EU665181.1	4	8/10, 409/411, 591/593, 605/607
<i>Armillaria calvescens</i>	JF895901.1	4	44/46, 65/67, 226/228, 256/258
<i>Armillaria zimbabwe</i>	AF489484.1	4	447/449, 474/476, 702/704, 707/709
<i>Armillaria fuscipes</i>	AY882965.1	12	345/347, 366/368, 387/389, 411/413, 440/442, 530/532, 576/578, 629/631, 756/758, 805/807, 882/884, 887/889
<i>Armillaria borealis</i>	JN657443.1	8	51/53, 359/361, 450/452, 554/556, 585/587, 632/634, 641/643, 690/692
<i>Armillaria singular</i>	D89926.1	4	115/117, 145/147, 383/385, 785/787
<i>Armillaria limonea</i>	FJ618740.1	4	115/117, 145/147, 383/385, 785/787
<i>Armillaria mexicana</i>	KC111009.1	5	187/189, 658/660, 805/807, 991/993, 1021/1023
<i>Armillaria montagnei</i>	FJ711623.1	6	73/75, 257/259, 287/289, 752/754, 927/929, 1382/1384
<i>Armillaria sparrei</i>	FJ618750.1	3	115/117, 145/147, 787/789
<i>Armillaria pallidula</i>	DQ338550.1	11	63/65, 84/86, 245/247, 275/277, 747/749, 922/924, 1380/1382, 1710/1712, 1716/1718, 2392/2394, 2447/2449

**Cuadro 2.** Resultados del análisis de las secuencias de *A. tabescens*, *A. cepistipes*, *A. ectypa*, *A. borealis* y del GenBank con la enzima *Alu I*, *Hind III*, *Tha I* y *Bsm I*.

Especie	No. De accesión	Enzima	Secuencia	Frecuencia	Posición/sitio de corte
<i>Armillaria</i> sp (Michoacán)		<b>AluI</b>	AGCT	1	133/135
		<b>Hind III</b>	GTAC	1	161/164
		<b>ThaI</b>	CGCG	1	644/646
<i>Armillaria tabescens</i>	HQ232286.1	<b>AluI</b>	AGCT	4	76/78, 498/500, 543/545, 604/606
		<b>BsmI</b>	GAATGC	1	318/325
		<b>Hind III</b>	GTYRAC	1	366/369
<i>Armillaria cepistipes</i>	EU257710.1	<b>AluI</b>	AGCT	5	44/46, 445/447, 627/629, 641/643, 680/682
<i>Armillaria ectypa</i>	EU257712.1	<b>AluI</b>	AGCT	5	60/62, 451/453, 558/560, 592/594, 623/625
		<b>BsmI</b>	GAATGC	1	305/312
		<b>Hind III</b>	GTYRAC	3	353/356, 543/546, 608/611
		<b>Tha I</b>	CGCG	1	672/674
<i>Armillaria borealis</i>	JN657443.1	<b>AluI</b>	AGCT	8	51/53, 359/361, 450/452, 554/556, 585/587, 632/634, 641/643, 690/692

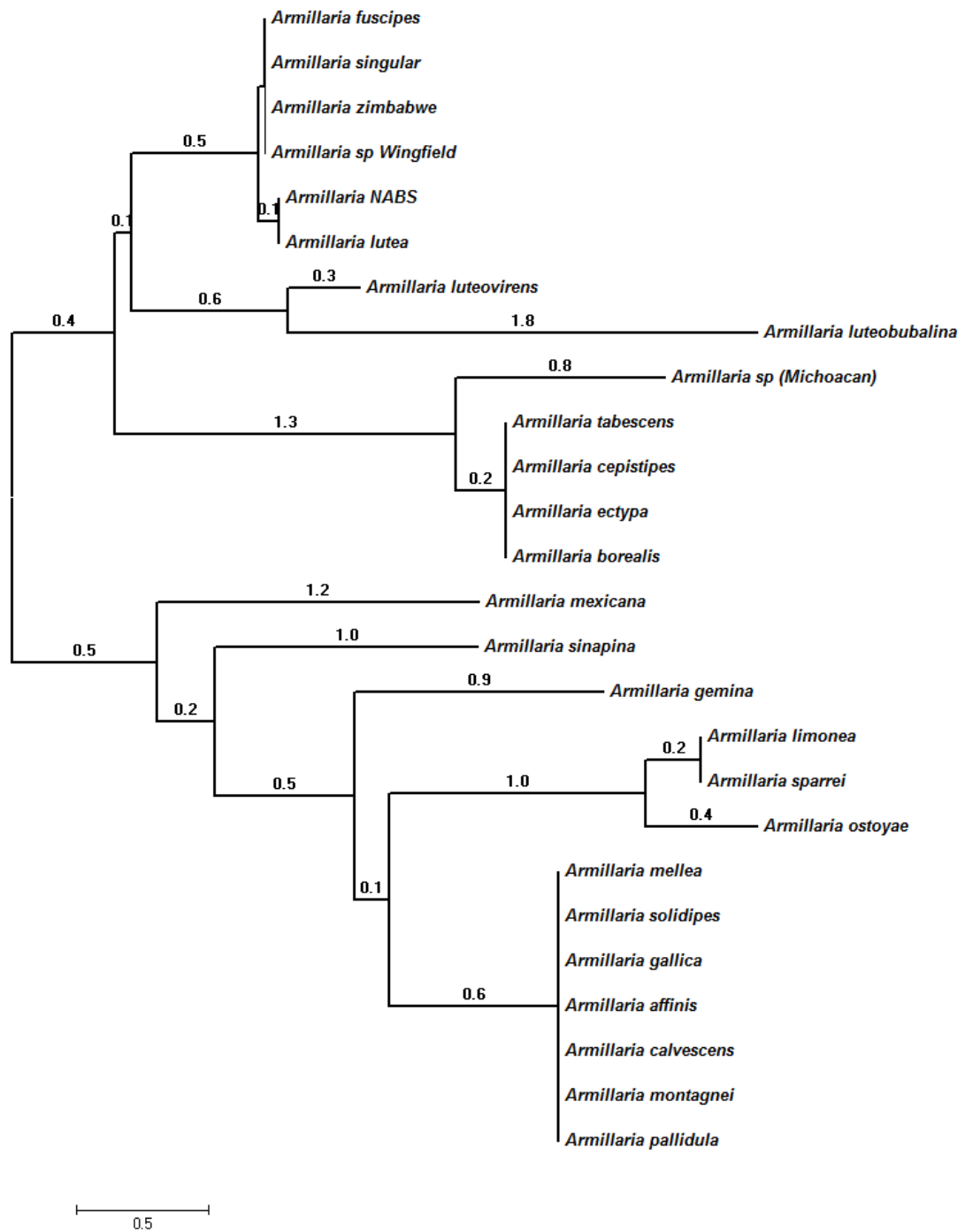


Figura 4. Análisis filogenético generado con secuencias de IGS-I con las especies reportadas en el GenBank. El valor de la distancia se encuentra en el extremo inferior izquierdo. Se observa que *Armillaria* sp (aguacate), registrada en la presente investigación, está ligada al grupo conformado por *A. tabescens*, *A. ectypa*, *A. borealis* y *A. cepistipes*. El valor de confiabilidad se muestra sobre las líneas horizontales.

El análisis filogenético dio como resultado que la especie presente en aguacate tiene características similares a las especies que integran el grupo de *A. tabescens*, *A. cepistipes*, *A. ectypa* y *A. borealis*. Con estas especies se utilizaron las enzimas *Alu I*, *Hind II*, *Bsm I*, *Nde I*, *Tha I* (Harrington y Wingfield; 1995), los resultados fueron diferentes con cada una de las enzimas, cabe mencionar que algunas no reconocen el sitio de corte para algunas especies de *Armillaria* (Cuadro 2).

Solo tres de las enzimas utilizadas reconocen sitios de corte para la especie de aguacate *Alu I* (135), *Hind III* (164) y *Tha I* (646). Las enzimas *Hind III*, *Bsm I* y *Alu I* presentaron sitios de corte en la especie *A. tabescens*. El sitio de corte de la enzima *Hind III* fue 369 y 325 para la enzima *Bsm I*. La enzima *Alu I* presentó cuatro sitios de corte en la especie *A. tabescens* (78, 500, 545, 606), con estos resultados se concluye que *Armillaria* de aguacate es diferente de *A. tabescens*. En *A. cepistipes* y *A. borealis* solo la enzima *Alu I* mostró resultados. *A. borealis* presentó ocho sitios de corte (53, 361, 452, 556, 587, 634, 643, 692), y *A. cepistipes* cinco (46, 447, 629, 643, 682), estos resultados son diferentes a los que reportan Mansilla *et al.*, (2001), quienes registraron tres sitios de corte que podrían corresponder a *A. borealis* o *A. cepistipes*. Harrington y Wingfield(1995), reportaron tres sitios de corte (399, 183, 200 pb) para el tipo A de *A. cepistipes* y cuatro bandas (310, 200, 135 y 89 pb) para el tipo B de esta especie; en el caso de *A. borealis* se obtienen cuatro bandas para el tipo A (310, 200, 135 y 89) y B (310, 200, 104 y 89) reportadas por Harrington y Wingfield (1995), estos resultados concluyen que *Armillaria* de aguacate es diferente a *A. borealis* y *A. cepistipes*. *Armillaria ectypa* presentó cinco sitios de corte con la enzima *Alu I* lo que difiere

con la especie de aguacate, por el sitio y frecuencia de corte, la enzima *Hind III* cortó tres fragmentos (356, 546, 611); *Tha I* presentó un sitio de corte con posición y frecuencia diferente (674). Estos resultados y los apareamientos confirman que la especie de *Armillaria* en aguacate es distinta a las reportadas en la base de datos.

### **2.3.2. Compatibilidad somática**

Las pruebas de compatibilidad somática resultaron en la fusión de las colonias dando origen a una sola cepa (Cuadro 3). El reverso de todas las cajas de Petri no mostró línea pigmentada característica de reacciones incompatibles. *A. mellea* y *A. borealis* mostraron un aspecto algodonoso como lo mencionan Rizzo y May, 1994; González *et al.*, 2009; Baumgartner *et al.*, 2011 en *A. mellea* a los 20 días del apareamiento y un aspecto costroso a los 45 días.

Cuadro 3. Resultados de los apareamientos realizados con las cepas de *Armillaria* provenientes de aguacate. Cepa 6, 14 y 16 corresponden a aguacate del municipio de Salvador Escalante, cepa 18 corresponde a una cepa aislada de un tocón de pino encontrado en la huerta Xhanamba (Charapan) y las restantes a aguacate en Charapan. C, reacción compatible; I, reacción incompatible.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2			C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3				C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4					C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
5						C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
6*							C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
7								C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
8									C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
9										C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
10											C	C	C	C	C	C	C	C	C
11												C	C	C	C	C	C	C	C
12													C	C	C	C	C	C	C
13														C	C	C	C	C	C
14*															C	C	C	C	C
15																C	C	C	C
16*																	C	C	C
17																		C	C
18*																			C
19																			



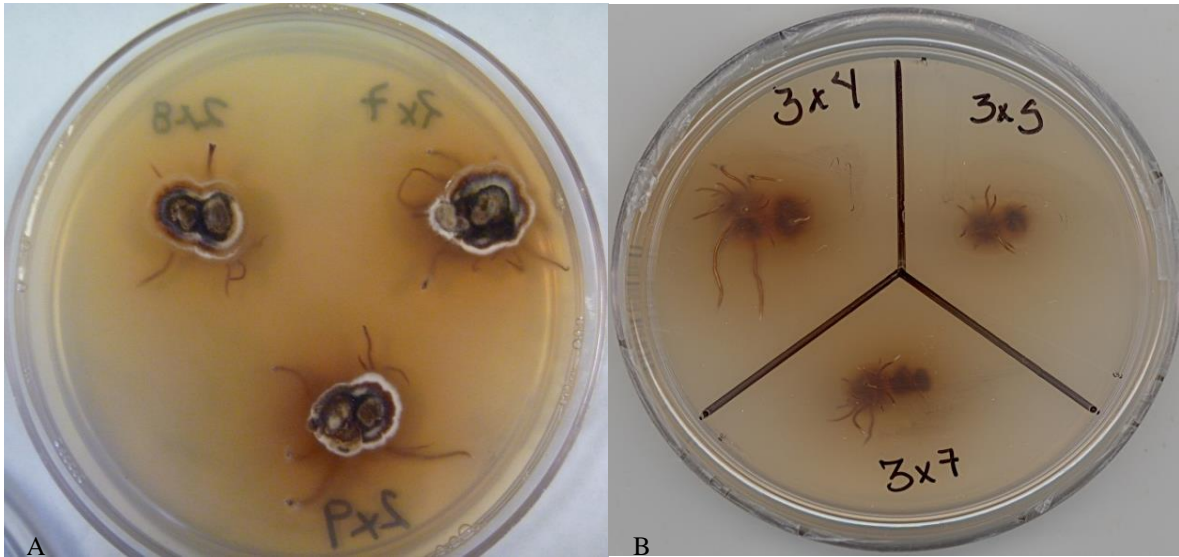


Figura 5. Vista anterior (A) y posterior (B) de las pruebas de compatibilidad somática en medio de cultivo extracto de Malta al 2% con aislados de *Armillaria* de aguacate. En ningún caso se observó la línea oscura entre las colonias apareadas que caracteriza a las reacciones incompatibles.

Con estos resultados se concluye que *Armillaria* aislada de aguacate en los municipios de Charapan y Salvador Escalante, está constituida por un solo grupo de compatibilidad y es una sola especie (Figura 6).



Figura 6. Mapa de la distribución del grupo de compatibilidad de *Armillaria* en aguacate en la huerta Xhanamba.

El aspecto de la colonia de las cepas de *A. mellea* y *A. gallica* de durazno fue algodonoso sin desarrollo de rizomorfos, mientras que *Armillaria* de aguacate tuvo un aspecto ligeramente costroso en la superficie de la colonia y presentó el desarrollo de los rizomorfos con ramificación dicotómica (Figura 7).

Los apareamientos realizados con las cepas provenientes de durazno mostraron reacción incompatible entre los diploides de *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana* (Figura 8) reacción encontrada entre los apareamientos realizados por Coetzee *et al.*, (2001).

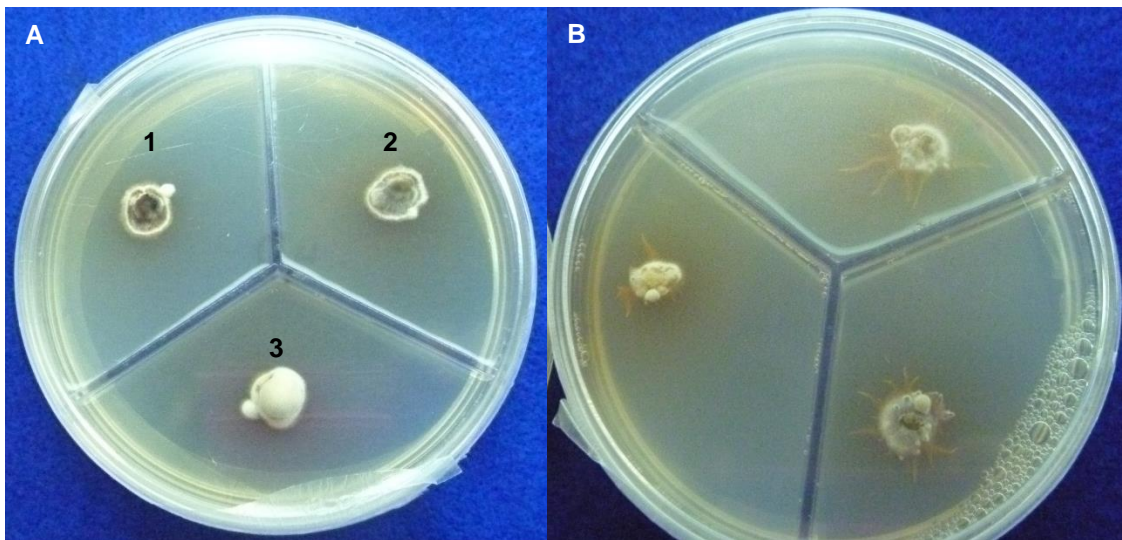


Figura 7. Patrón de crecimiento de *Armillaria mellea*, *A. gallica*, *A. mexicana* y *Armillaria* sp (aguacate) a los 20 días del aislamiento. (1) Colonia algodonosa, en el centro con aspecto oscuro costroso de la especie *Armillaria mellea*, (2) *Armillaria gallica* con aspecto algodonoso ligeramente costroso en la parte central de la colonia, (3) *Armillaria mexicana* con aspecto algodonoso. (B) Colonia con aspecto algodonoso y desarrollo de rizomorfos de *Armillaria* sp aislada de aguacate. Ninguna de las especies provenientes de durazno formó rizomorfos a los 20 días del desarrollo de la colonia.

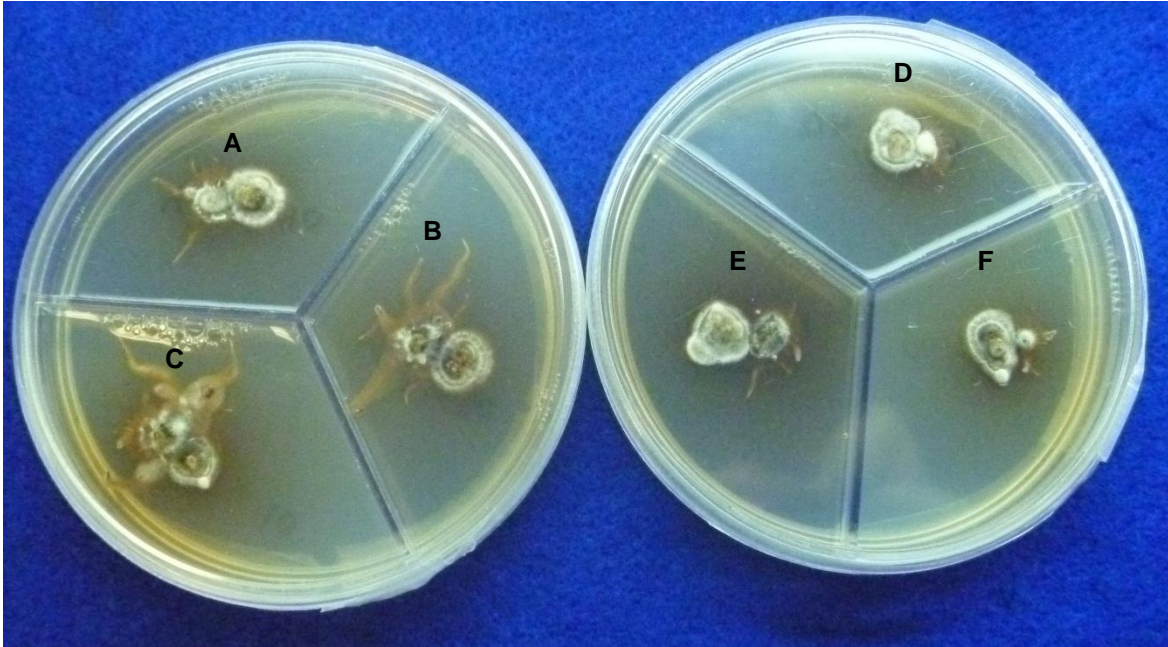


Figura 8. Apareamientos de *Armillaria* sp. (Aguacate) con *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana*. Reacciones Incompatibles entre *Armillaria* sp. Vs *Armillaria mellea* (A, D); *Armillaria* sp. vs *A. gallica* (B, E), *Armillaria* sp. vs *A. mexicana* (C, F).

## 2.4. CONCLUSIONES

La extracción de ADN de rizomorfos y micelio aislado de la raíz de aguacate hecha con el kit de extracción, dio buenos resultados en calidad y concentración. La metodología realizada con CTAB y el protocolo de Dellaporta mostraron buena absorbancia. La PCR realizada con el DNA de los 3 protocolos amplificó la banda dentro del rango esperado para algunas especies de *Armillaria*. El análisis con las secuencias del banco de genes para las enzimas de restricción, así como la filogenia mostró que la especie de *Armillaria* en aguacate es diferente a las reportadas en la base de datos del GenBank. El tamaño del fragmento amplificado fue diferente y no hay registros previos de esta secuencia en el GenBank. Otro parámetro para fundamentar la conclusión de que el aislamiento de aguacate es una nueva especie de *Armillaria* fue la compatibilidad somática en donde todas las cepas aisladas de aguacate formaron un solo grupo y fue incompatible con *Armillaria mexicana*, *A. mellea* y *A. gallica* de durazno.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- Aguín O., Mansilla P., Sainz M. J. 2001. A fast method for production of *Armillaria* inoculum. *Mycologia* 93: 612-615.
- Aguín C. O., Sainz J. M., Mansilla V. P. 2004. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 110: 683–687.
- Anderson J. B., Stasovski E. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84: 505-516.
- Anderson J.B., Ullrich R. C. 1979. Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia* 71: 402–414.
- Baumgartner K., Coetzee P. A. M., Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology* 12: 515–534.
- Baumgartner K., Rizzo M. D. 2001. Ecology of *Armillaria* spp. in Mixed-Hardwood forests of California. *Plant Disease* 85:947-95.
- Baur M, Blauenstein H., Heiniger U., Rigling D. 1997. Evaluation of a PCR-based Identification Method for *Armillaria* Species Occurring in Switzerland. En: Root and Butt Rots of Forest Trees (9th International Conference on Root and Butt Rots). INRA Editions, Les Coloques n° 89: 435. Carcans, France.
- Cannon P., N.B.K., Mee-Sook K., J.W y Alvarado R., D. 2007. An *Armillaria* survey in Mexico: A basis for determining evolutionary relationships, assessing potentially invasive pathogens, evaluating future impacts of climate change, and developing international collaborations in forest pathology. Western International Forest Disease Work Conference. 1-9 p.

- Chenna R., Sugawara H., Koike T., López R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31: 3497-3500.
- Chillali M., Idder-Ighili H., Guillaumin J.J., Mohammed C., Lung E. B., Botton B. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycology Research* 102: 533-540.
- Coetzee A. M. P., Wingfield B. D. Harrington T.C., Steimel J., Coutinho A. T., Wingfield J.M. 2001. The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. *Molecular Ecology* 10: 387–396.
- Coria A., V.M. 2008. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, Libro Técnico No. 8, Uruapan, Michoacán, 145-146 p.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Duchesne L. C., Anderson J.B. 1990. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*. *Mycologia Research* 94:266-269.
- Elías R. R. D. 2013. Etiología, patrón espacio-temporal y análisis filogenético de *Armillaria* spp. en árboles de durazno (*Prunus pérsica* L. Bastch) en el sur del Estado de México. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, 118 p.
- Gardes, M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- González D. E., Pérez S. A., Álvarez L.A., León M., Campos A. P., Armengol J., García J. J. 2009. Agentes fúngicos presentes en plantaciones de nísperos

- (*Eriobotrya japonica* Lindl) con síntomas de decaimiento en la provincia de Alicante. Boletín Sanidad Vegetal Plagas 35:453-467.
- Guillaumin, J.-J., Anderson, J. B., Legrand, P., Ghahari, S. & Berthelay, S. 1996. A comparison of different methods for the identification of genets of *Armillaria* spp. New Phytologist 133:333-343.
- Harrington T. C., Rizzo D. M. 1993. Identification of *Armillaria* species from New Hampshire. Mycologia 85:365-368.
- Harrington T.C., Wingfield B. 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. Mycologia 87:280-288.
- Hasegawa E., Yuko O., et al., Hattori T., Kikuchin T. 2010. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene. Mycologia 102:898–910.
- Henrion, B., Le Tacon, F., Martin, F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. New Phytologist 122:289-298.
- Kim S. M., Klopfenstein N. B., McDonald G.I., Arumuganathan K., Vidaver A.M. 2001. Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCR-based techniques to assess intraspecific and interspecific matings of *Armillaria* species. Mycology Research 105:153-163.
- Korhonen K. 1978. Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. Karstenia 18:31-42.
- Legrand, P., Ghahari, S. & Guillaumin, J.-J. (1996) Occurrence of genets of *Armillaria* spp. in four mountain forests in central France: the colonization strategy of *Armillaria ostoyae*. New Phytologist 133:321-332.

- Mansilla V.P., Aguín C.O., Abelleira A. A., Sainz O. J. 2000. Adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies *Armillaria* en Galicia. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 26:79-88.
- Morales G. J. L. 2009. III Congreso Latinoamericano del Aguacate. Simposio fitosanidad. 44 p.
- Ndongo A. S., Guillaumin J.J. 1997. Somatic incompatibility among African *Armillaria* isolates. *European Journal Forest Pathology* 27:201-206.
- Ochoa A., S. 2011. Enfermedades del aguacate de importancia económica en México. *In*. Memoria del XXIV Curso de Actualización Frutícola. 12-14 de octubre. Coatepec Harinas, México. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, p. 9-11.
- Ota Y., Intini M., Hattori T. 1997. Genetic characterization of heterothallic and non-heterothallic *Armillaria mellea sensu stricto*. *Mycology Research* 104:1046-1054.
- Otieno W., Pérez S. A., Termorshuizen A. 2003. Characterization of *Armillaria* isolates from tea (*Camellia sinensis*) in Kenya. *Mycologia* 95:160-175.
- Peabody B. R., Peabody C. D., Tyrrell G. M., MacQueen E. E., Howdy P. R., Semelrath M. K. 2005. Haploid vegetative mycelia of *Armillaria gallica* show among-cell-line variation for growth and phenotypic plasticity. *Mycologia* 97: 777–787.
- Proffer T. J., Jones A. L., Ehret G. R. 1986. Biological Species of *Armillaria* Isolated from Sour Cherry Orchards in Michigan. *Phytopathology* 77:941-943.



- Prospero S., Rigling D., Giudici F., Jermini M. 1998. Determination des espèces d'armillaire responsables du pourridié-agaric de la vigne au Tessin. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 30:315-319.
- Rizzo D. M., Harrington T.C. 1993. Declination and biology of clones of *Armillaria ostoyae*, *A. gemina* and *A. calvescens*. *Mycologia* 85:164-174.
- Rizzo D. M., May G. 1994. Nuclear replacement during mating in *Armillaria ostoyae* (Basidiomycotina). *Microbiology* 140:2115-2124.
- Rizzo D. M., Whiting E. C. 1998. Spatial Distribution of *Armillaria mellea* in Pear Orchards. *Plant Disease* 82:1226-1231.
- Schulze S., Bahnweg G., Moller M., Sandermannjr H. 1997. Identification of the genus *Armillaria* by specific amplification of an rDNA-ITS fragment and evaluation of genetic variation within *A. ostoyae* by rDNA-RFLP and RAPD analysis. *European Journal Forest Pathology* 27:225-239.
- Singer R. 1956. The *Armillariella mellea* group. *Lloydia* 19:176-187.
- Smith M.L., Duchesne L.C., Brunh J.N., Anderson J.B. 1990. Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. *Genetics* 126: 575-582.
- Tamayo M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. *Politécnica* 4:51-70.
- Téliz O. D., Mora A. A. 2000. El aguacate y su manejo integrado. 2da Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.
- Termoshuizen, A., Arnolds, E. 1987. On the nomenclature of the European species of the *Armillaria mellea* groups. *Mycotaxon* 30:101-106.

- Veldman G.M., Klootwijk V.C. H. F. de Regt, Rudi R.J. 1981. The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. *Nucleic Acids Research* 9:6935-6952.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), Academic Press: San Diego. p. 315-322
- Worrall, J. J. 1994. Population structure of *Armillaria* species in several forest types. *Mycologia*86:401-407.
- Worrall J. J. 1997. Somatic Incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia* 89:24-36.

## CAPÍTULO III

### LA ARMILLARIOSIS DEL AGUACATE EN CHARAPAN, MICHOACÁN: INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PÉRDIDAS ECONÓMICAS

#### RESUMEN

*Armillaria* sp está matando árboles de aguacate Hass y Mexicano en plantaciones establecidas en terrenos donde previamente había especies forestales en el municipio de Charapan, Michoacán. La incidencia y severidad de la Armillariosis se determinó mediante muestreos dirigidos realizados en el ciclo 2012-2013 (julio, septiembre, enero y mayo). Árboles con síntomas y los adyacentes a los sintomáticos fueron identificados, muestreados y mapeados. La severidad de la enfermedad se evaluó con una escala del 1 al 5, en que 1= sano, 2= sintomático inicial (INI), 3= sintomático intermedio (INT), 4= sintomático avanzado (A) y 5= muerto (M). La incidencia en la evaluación inicial de julio 2012 fue de 16 árboles con síntomas de Armillariosis (5 INI, 4 INT, 3A y 4 M). En septiembre 2012, a los dos meses de la primera evaluación, se localizaron seis árboles nuevos, para un total de 22 sintomáticos (7 INI, 3 INT, 2 A y 9 M, tres árboles clasificados con síntomas avanzados en Julio murieron en dos meses). En enero 2013, a los seis meses de la primera evaluación, la incidencia se mantuvo en 22 árboles, pero la severidad, se incrementó quedando cuatro árboles INI, dos INT y 15 M. El incremento de 9 a 15 M, en tres meses, se originó de tres INI, uno INT y dos A. En la última evaluación de mayo 2013, la incidencia aumentó a 29 árboles (nueve INI, tres INT, un A y 15 M y un replante). Un INI y un A detectados

en enero, murieron en cuatro meses. Cinco INI y un A detectados como focos de infección nuevos. Las pérdidas en producción para mercado nacional y exportación no reflejaron diferencias, debido a la variación en el precio del aguacate durante el año. Sin embargo, perder un árbol de aguacate de 7 años por Armillariosis reflejó pérdidas de más de \$5,000 por árbol considerando ingresos por producción a partir del tercer año. Con base en la incidencia y severidad de la Armillariosis registrada en los 30 árboles de este estudio (30 de un total de 2500 en 22 ha), la pérdida económica fue de \$156,773, equivalentes a \$12,592 dólares. Esta es la consecuencia económica a los siete años de establecer 22 ha de aguacate en un bosque de pino y encino en Michoacán; pérdida que con base en este estudio, probablemente se incrementará en los próximos años.

**Palabras clave:** Armillariosis, diseminación, ecología, patología forestal y agrícola

## CHAPTER III

### THE ARMILLARIOSIS OF AVOCADO IN CHARAPAN, MICHOACÁN: INCIDENCE, SEVERITY Y ECONOMIC LOSSES

#### ABSTRACT

*Armillaria* sp. is killing trees and Mexican Hass avocado in plantations established in previously forest areas in the municipality of Charapan, Michoacán. The incidence and severity of the Armillariosis was determined by sampling directed made in the 2012-2013 cycle (july, september, january and may). Trees symptomatic and the adjacent were identified, sampled and mapped. The severity of the disease was assessed using a scale of 1 to 5 where 1=healthy, 2=initial symptomatic (INI), 3=symptomatic intermediate (INT), 4=symptomatic advanced (A) and 5=dead (M). The incidence in the initial evaluation of july 2012 was 16 trees with symptoms of Armillariosis (5 INI, 4 INT, 3A and 4M). In september 2012, two months after the first evaluation, were detected six trees new, for a total of 22 symptomatic (7 INI, 3 INT, 2 A and 9 M, three trees classified with advanced symptoms in july killed in two months). In January 2013, six months of the first evaluation, the incidence remained 22 trees. The severity increased, were detected four trees INI, two INT and 15 M. In three months, the increase was from 9 to 15, 3 INI, 1 INT and 2 A to detected in september. In the last assessment in May 2013, the incidence increased to 29 trees (nine INI, three INT, an A and 15 M and replant). One INI and one A detected in january, died in four months. Five INI and one A were detected as a new focus of infection. The losses in production for export and national market did not reflect differences due to the variation in the

price of avocados during the year. However, lose a 7-year avocado tree by Armillariosis reflected losses of more than \$5,000 per tree considering income by production from the third year. Based on the incidence and severity of 29 trees detected with Armillariosis in this study (29 from a total of 2500 in 22 has), the economic loss was \$156,773, equivalent to \$12,592. This is the consequence of economic of establish 22 has of avocado in a forest of pine and oak in Michoacan, the loss is based on this study to the seven years of the plantation, is likely to increase in the coming years.

**Keywords:** Armillariosis, spread, ecology, forestry and agricultural pathology.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

México es líder mundial en el mercado de aguacate Hass, el principal estado productor en México es Michoacán donde, se cosecharon 1,117, 339 t en 105,512 ha en 2012 (SIAP, 2013). El 81% de la superficie aguacatera en Michoacán se ubica en los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Tacámbaro, Salvador Escalante, Ario de Rosales y Nuevo Parangaricutiro (Vallejo, 2011). Armillariosis es una enfermedad que mata árboles en los bosques de todo el mundo (Robinson *et al.*, 2003). En Australia se estima que aproximadamente entre el 3-5% de la superficie forestal es afectada a partir de 0.1 hasta 30 has. Pérdidas hasta del 50% por *Armillaria spp* se han registrado en *Pinus elliotii*, *Tectona grandis* y 25% en *Eucalyptus pilularis* (Kile, 1983; Mwenje y Ride, 1997; Ivory, 1987; y Swift 1964, 1968, 1972). La superficie afectada por *Armillaria borealis*, *A. mellea*, *A. ostoyae*, *A. cepistipes* y *A. gallica* en Polonia se estimó en 144,000 ha en 1999 y en cuatro años (2003) subió a más de 200,000 ha (Kaliszewski *et al.*, 2007). En *Camellia spp.* las pérdidas estimadas son del 50% (Onsando *et al.*, 1997). En México, *Armillaria* se encuentra en bosques de *Quercus*, *Abies religiosa*, *Pinus hartwegii*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ayacahuite*, *Quercus spp.*, *Alnus spp.*, y *Arbutu spp*, parasitando árboles vivos y como destructor de madera (Valdez *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2007). Los principales métodos de dispersión de *Armillaria*, son las raíces infectadas que tienen contacto con las raíces sanas, los rizomorfos son una fuente importante de inóculo que contribuyen a la dispersión del patógeno y representan un 80% de las infecciones en pinos y el 20% lo representan tocones de árboles muertos (Mallet,

1992), como fuente de inóculo para los árboles adyacentes ya que establecen un contacto raíz-raíz y por consiguiente el contacto de los rizomorfos con raíces sanas como lo mencionan Morrison (2004) en *Pseudotsuga menziesii* y en aguacate Téliz y Mora (2007). Las raíces pueden ser infectadas durante muchos años antes de que los síntomas sean expresados en los árboles. Cortes de eucaliptos de 10 años han sufrido pérdidas anuales de 0.3 a 2.0 m<sup>3</sup> por hectárea dependiendo de la severidad de la enfermedad (Edgar *et al.*, 1976). Cualquier estrés en árboles sanos predispone a la Armillariosis si el hongo está cerca de las raíces, en este caso, las propiedades del suelo influyen en la infección de los rizomorfos (Mallet, 1992; Worrall *et al.*, 2004; Ochoa, 2011).

La viabilidad del inóculo es un elemento importante para la infección. Garret (1970) definió el potencial de inóculo como la energía de crecimiento disponible de un parásito para infectar la superficie de un órgano y es determinada por el tamaño y especie del hospedante, el tiempo desde la colonización y los factores ambientales que afectan el sustrato colonizado. El potencial de inóculo primario es más alto después de que la colonización es completa y se reducirá gradualmente a medida que el hongo consume la madera. La patogenicidad primaria de *Armillaria* spp en eucalipto incluye cinco aspectos: (1) la asociación constante del hongo con la enfermedad; (2) el patrón de desarrollo de la enfermedad; (3) la correlación entre la infección de la raíz y el desarrollo de los síntomas en árboles grandes; (4) la evidencia de la resistencia del hospedante a la infección y (5) la patogenicidad en campo (Kile, 1993). *Armillaria* se propaga en áreas forestales principalmente a través de rizomorfos o por el crecimiento del micelio hacia raíces



sanas. La importancia de cada modo de propagación depende de las especies de *Armillaria* y del área forestal (Onsando *et al.*, 1997)

La superficie aguacatera se está incrementando en Michoacán en montañas con bosques. EL cambio de áreas forestales por un cultivo como el aguacate puede afectar la ecología y ambiente propicio para la agricultura. Patógenos en el suelo como *Armillaria* spp, *Ganoderma* spp, *Rosellinia* spp, *Phytophthora* spp, *Phymatotrichopsis omnívora* han coevolucionado con los árboles forestales por siglos (Téliz y Mora, 2007). Las nuevas plantaciones de aguacate, establecidas en áreas forestales, podrían sufrir ataques por estos patógenos. *Armillaria* spp se ha detectado recientemente en aguacate en plantaciones establecidas en sustitución de bosques (Tamayo, 2007, Téliz y Mora, 2007; Coria, 2008; Morales, 2009; Ochoa, 2011). Las pérdidas económicas provocadas por el hongo *Armillaria* en aguacate en México no han sido determinadas, pero se estiman hasta del 10% en huertos comerciales de Michoacán (Ochoa, 2011), sin embargo, su incidencia, y severidad e impacto económico no se han precisado; por tal razón los objetivos de la presente investigación fueron registrar el desarrollo espacial y temporal de *Armillaria* en aguacate y cuantificar las pérdidas económicas con base en los costos de inversión y el potencial productivo del cultivo.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Incidencia, severidad y evaluación de la enfermedad

Se elaboró un croquis de la distribución de árboles de aguacate Hass y Nativos en la huerta Xhanamba ubicada en el municipio de Charapan, Michoacán. Esta huerta se caracteriza por la alta incidencia de árboles afectados por pudrición de la raíz por *Armillaria*, que exhiben diferentes grados de severidad y se encuentran dispersos en diferentes puntos geográficos del huerto. Ésta huerta cuenta con una densidad de 2500 árboles de 7 años de edad, más del 10% presentan varios síntomas de Armillariosis; en el follaje amarillamiento, flacidez, defoliación apical, cambio de coloración de amarilla a café, flor y frutos adheridos, en el tronco presencia de cancro con grieta vertical, raíces con presencia de micelio en forma de abanico y rizomorfos. El sitio de estudio cuenta con una temperatura que oscila entre 7° C a 22° C y precipitación promedio anual de 1200 mm. El clima predominante es templado con lluvias en verano, predominan los bosques mixtos, con pino y oyamel. (INEGI, 2012).

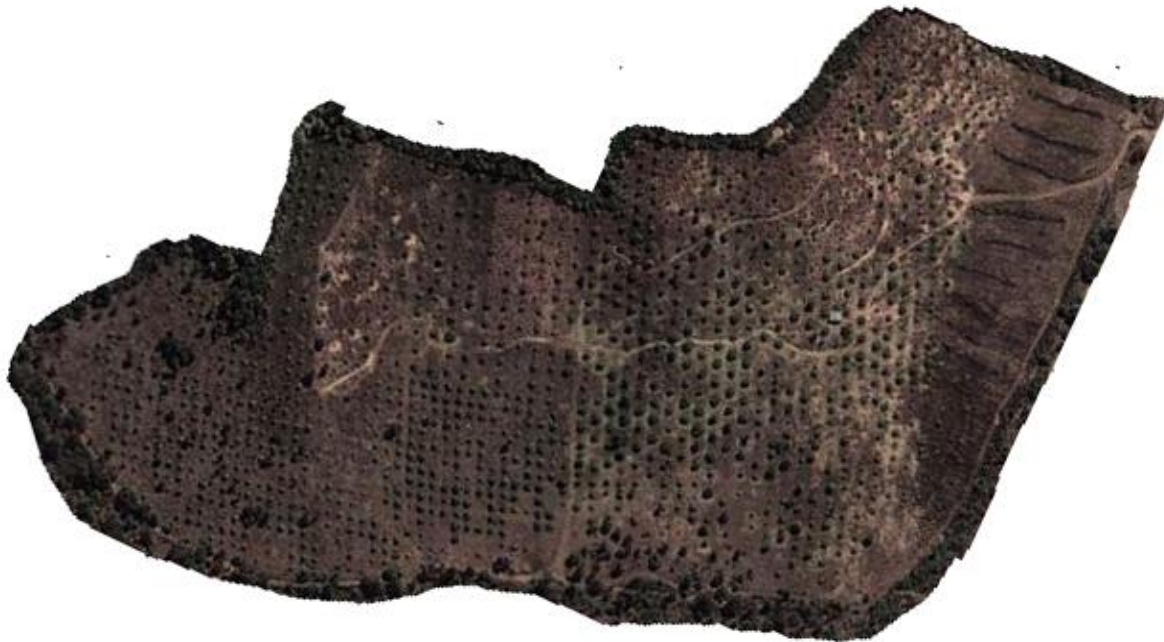


Figura 1. Imagen aérea del huerto Xhanamba, Charapan, Michoacán 2013 (2352 msnm, 19° 37' 92.4" de latitud norte y 102° 18' 01.7" de longitud oeste).

La evaluación de la enfermedad se basó en una escala de severidad con los siguientes valores: 1=sano, 2=sintomático inicial (amarillamiento), 3=sintomático intermedio (amarillamiento y flacidez foliar), 4=sintomático avanzado (defoliación apical o parcial, grieta en la base del tronco) y 5=muerto (follaje con coloración café, flor y frutos adheridos al árbol) (Figura 2). Los árboles asintomáticos, sintomáticos y muertos, se localizaron e identificaron en el mapa del huerto. Se realizaron muestreos dirigidos a los árboles con síntomas, y a los adyacentes. De cada árbol se tomaron coordenadas X y Y para calcular el desplazamiento del hongo. Con estos datos se generó un mapa de los árboles sintomáticos y el progreso (del desplazamiento de la enfermedad en el tiempo y el espacio). Se buscaron los signos del hongo para corroborar la presencia del patógeno.

Todos los árboles marcados fueron monitoreados, observando los síntomas en el follaje y detectando los signos del hongo (micelio y rizomorfos) en la raíz, se realizaron cuatro muestreos, dos en época de lluvias ( julio y septiembre de 2012) y dos en sequía (mayo y enero 2013) con un intervalo de dos y cuatro meses respectivamente. La distancia del marco de plantación se consideró para evaluar la distancia de avance del patógeno. El porcentaje de infestación se determinó con la siguiente fórmula:

Porcentaje de infestación = (No. de árboles infestados/No. total de árboles\*100)

El valor medio y rango de las temperaturas y humedades relativas durante el ciclo de muestreo se registraron de la estación meteorológica de Los Reyes, Mich. Durante el periodo de evaluación se realizaron las prácticas comunes de cultivo en ese huerto: aplicaciones de giberelinas (en dosis comercial durante la floración en los meses de noviembre y marzo), microelementos (en dosis comerciales, a partir de noviembre a marzo), nitrógeno (2 kg por árbol en junio y julio), propiconazole (1 cc inyectado al tronco tres semanas antes del muestreo de enero y mayo) y *Trichoderma harzianum* (490 gr/100 lt de agua asperjada al cajete dos semanas antes del muestreo de enero y mayo)



Figura 2. Escala de severidad de síntomas de *Armillaria* en aguacate. 2A Sano. 2B Sintomático inicial (Flacidez y amarillamiento del follaje). 2C Sintomático intermedio (defoliación apical, grieta vertical en la base del tronco). 2D Sintomático avanzado (defoliación parcial o total, follaje con necrosis). 2E Muerto (Follaje seco y necrótico, flor y frutos adheridos al árbol).

### **3.2.2. Pérdidas económicas**

Los costos de inversión y operación del proceso productivo hasta los siete años del huerto, se basaron en datos del FIRA (2009). Se realizaron dos evaluaciones económicas: la primera para determinar el promedio de la producción media del huerto, y las pérdidas en rendimiento provocadas por Armillariosis. La segunda, corresponde al costo del árbol y a las pérdidas provocadas por este patógeno en un año (Hernández, 2000; Kaliszewski *et al.*, 2007). Los indicadores financieros utilidad bruta, gastos de operación y financieros, utilidad de operación, reparto de utilidades y utilidad neta se calcularon con los datos obtenidos de los costos de inversión y operación, de acuerdo a la metodología de Hernández (2000). Con estos cálculos, se obtuvieron las pérdidas a los siete años del total de árboles sintomáticos.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Dispersión del patógeno en tiempo y espacio

En julio de 2012, durante el primer muestreo, se detectaron 16 árboles sintomáticos, cinco con síntomas iniciales (SI), cuatro con síntomas intermedios (SIN), tres con síntomas avanzados (SA) y cuatro muertos (M) (el árbol uno fue sacado y se colocó un replante) (Figura 3). La precipitación pluvial fue de 2.60 mm, temperatura máxima 32.3°, mínima 17.31°, media 24.87° y humedad relativa de 49%.

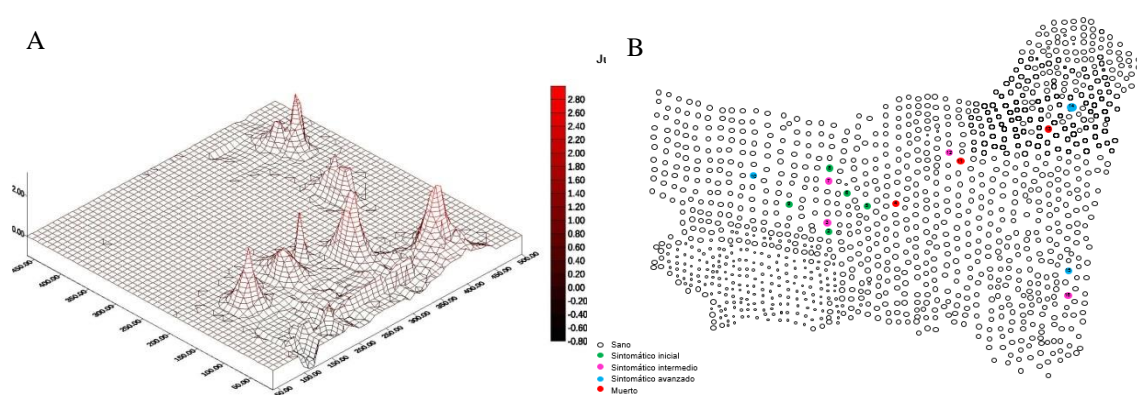


Figura 3. Gráfica de severidad de síntomas (A), se observan varios puntos con severidad variable cinco árboles con síntomas iniciales, cinco con síntomas intermedios, tres con sintomatología avanzada y cuatro muertos (el árbol uno detectado como replante). Distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis de severidad variable en la huerta Xhanamba en Charapan, Michoacán (B) (julio 2012).

En el segundo muestreo (septiembre 2012), el número de árboles sintomáticos aumentó a 22, dos con INI (uno localizado en el área con mayor incidencia y el otro en un área donde no se había manifestado la enfermedad, árbol 19 y 20), un árbol (23) IN y tres árboles M (árbol 17, 18 y 21) (Figura 4). Los tres árboles clasificados con síntomas avanzados en julio murieron en dos meses

(árbol 15 y 16) (Figura 4). Con base en esta evaluación de incidencia y severidad, partiendo del marco de plantación *Armillaria* avanzó entre siete y 15 metros en un periodo de dos meses (julio a septiembre de 2012), en el área de mayor incidencia donde se localizan los árboles 14, 17, 18, 20 y 21. En esta zona, se aplica el criterio mencionado por Morrison (2004), quien hace énfasis acerca de que los rizomorfos avanzan hasta dos metros a partir de la base alimentaria; específicamente en el área de mayor incidencia, el foco de infestación tiene una superficie de 35m, considerando que los árboles 17, 18, 20 y 21 se detectaron como focos de infección en este muestreo, a partir del árbol 14. La precipitación pluvial fue de 119 mm, 21° C y 84% de HR para este muestreo (septiembre 2012).

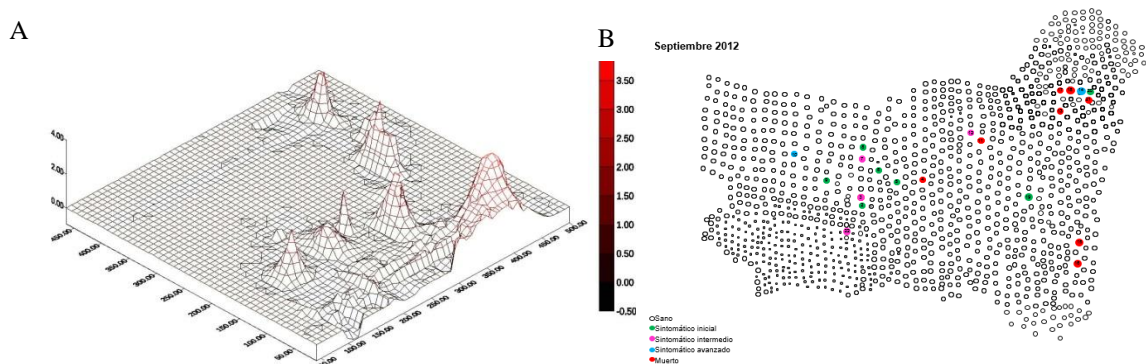


Figura 4. Gráfica de severidad de síntomas (A), la línea roja indica el grado de severidad, en rojo se ubican los árboles muertos. Distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis de severidad variable en la huerta Xhanamba en Charapan, Michoacán (B); siete árboles iniciales, cuatro intermedios, dos avanzados y nueve muertos (árbol uno se registró como replante) (septiembre 2012).

En enero de 2013 (precipitación 12.20 mm, 18°C y 66% HR), se registró el mismo número de árboles detectados en septiembre, la incidencia no aumentó. La severidad manifestó cambios en varios puntos del huerto. Se registraron cuatro árboles INI, tres árboles IN, 14 M y el replante sin manifestación de síntomas. Tres



árboles INI, un INT y dos A murieron en dos meses (árbol 8, 10, 14, 19, 20 y 22) (Figura 5).

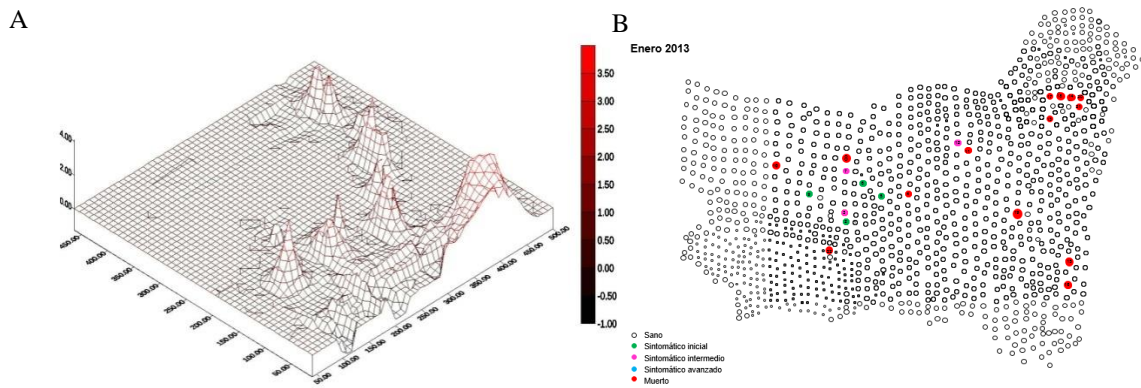


Figura 5. Gráfica de severidad de síntomas (A), la línea roja indica el grado de severidad, en rojo se ubican los árboles muertos. Distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis de severidad variable en la huerta Xhanamba en Charapan, Michoacán (B); cuatro árboles iniciales, tres avanzados y 14 muertos y un replante (enero 2013).

En mayo de 2013, la temperatura fue de 23° C, 32% de HR, sin precipitación. La incidencia aumento, se detectaron siete árboles nuevos, seis INI y un INT. La escala de severidad se conformó de la siguiente manera; 15 árboles M y el replante sin síntomas, nueve árboles INI, tres INT y un A (Figura 6). El incremento de la incidencia y severidad coincide con lo reportado por Horner (1991), menciona que el período de mayor esporulación de *Armillaria* va desde mayo a julio ya que las basidiosporas originan infecciones nuevas, mientras que Gonzalo *et. al.*, (1997) afirma que las concentraciones máximas de las basidiosporas se alcanzan en el mes de noviembre, posteriormente disminuyen y aumentan otra vez en mayo. El desarrollo de *Armillaria* en espacio fue el mismo intervalo que se mencionó en los datos obtenidos en el muestreo de septiembre (7 a 15 metros), la propagación radial se extiende del margen del centro de la enfermedad más allá

del inóculo primario, y la mortalidad de árboles conduce a la coalescencia de los centros de infección (Morrison, 2004).

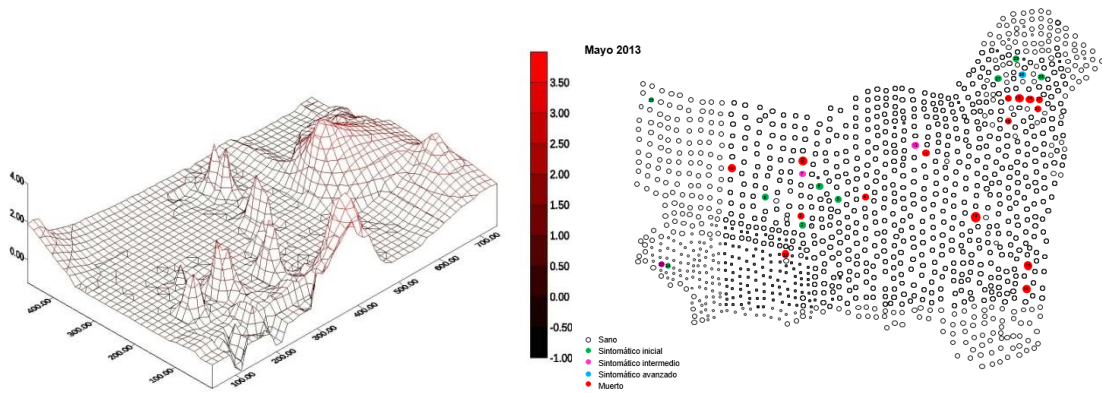


Figura 6. Gráfica de severidad de síntomas (A), la línea roja indica el grado de severidad, en rojo se ubican los árboles muertos. Distribución de árboles de aguacate Hass con síntomas de Armillariosis de severidad variable en la huerta Xhanamba en Charapan, Michoacán (B); nueve árboles iniciales, tres intermedios, un avanzado, 15 muertos y un replante (Mayo 2013).

El número total de árboles en cada escala de severidad por muestreo se observa en la Figura 7, se observa que la incidencia de la enfermedad va en aumento, estos resultados reflejan la cuantificación de la incidencia actual; sin embargo, no proyectan el desarrollo temporal y espacial a largo plazo como lo demuestran los resultados obtenidos por Morrison (2004), se sugiere ampliar el periodo de estudio para *Armillaria*, con esto se obtendrían datos exactos y se podrían establecer diferencias importantes.

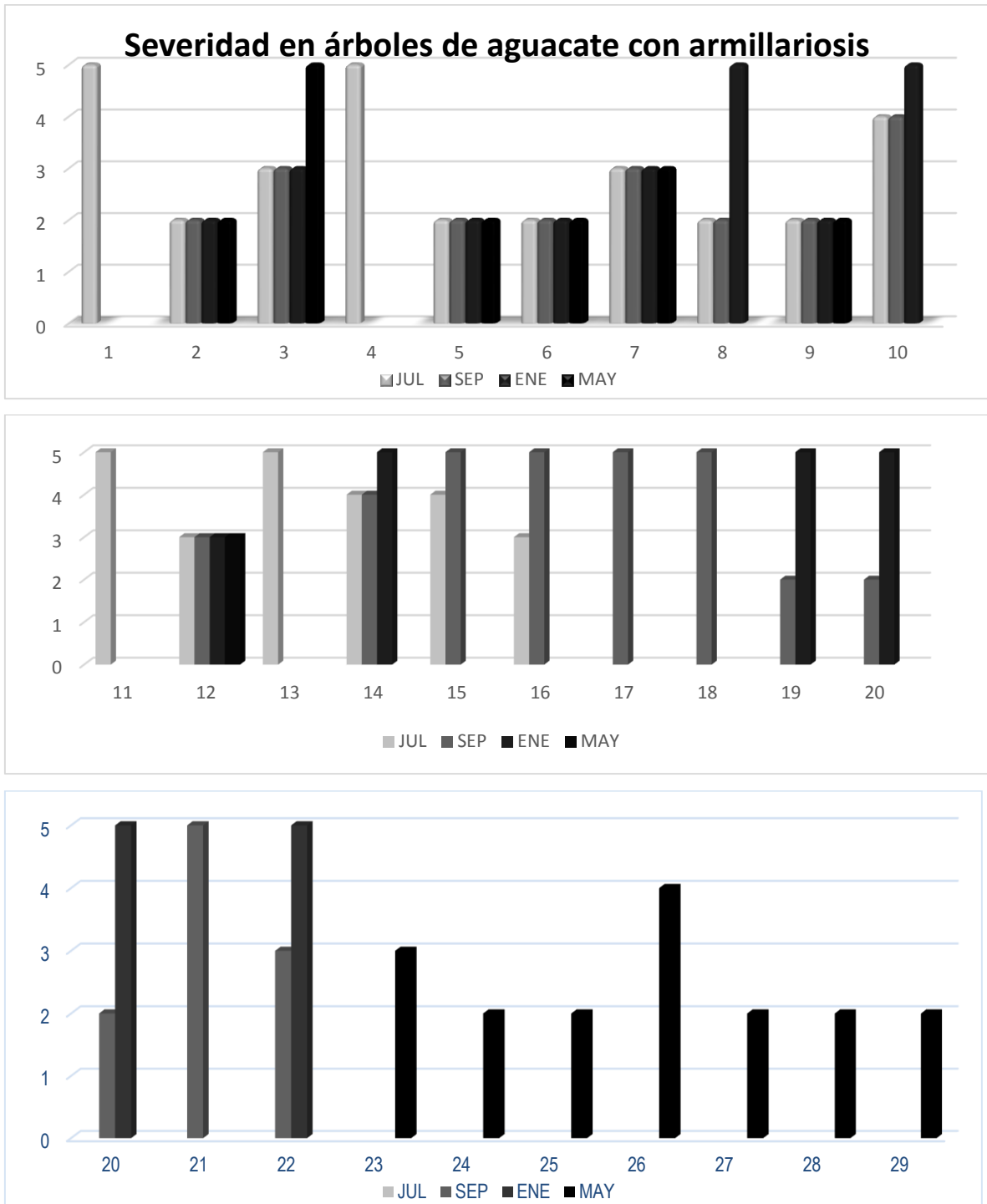


Fig. 7. Evolución de la severidad (inicial INI, intermedios INT, avanzados A y muertos M) de árboles de aguacate con Armillariosis en cuatro muestreos (julio y septiembre de 2012 y enero y mayo de 2013), Michoacán, México, 2013.

El porcentaje de árboles infestados y muertos por *Armillaria* en un año indica que el patógeno se está diseminando rápidamente (figura 7), en este ciclo el porcentaje acumulado es del 1.16%. En todas las infecciones de los árboles detectados como muertos se presentaron rizomorfos sobre la raíz y en el suelo, lo que indica que estas estructuras son quienes inician la infección como lo menciona Morrison (2011). La severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la colonización o la cantidad del inóculo en la raíz (Morrison, 2011), mientras que la incidencia, alcanza el grado máximo después del quinto año de la plantación en *P. radiata* (Beveridge, 1973), como lo menciona Ochoa (2011) en aguacate la enfermedad es más visible en árboles de cinco años; sin embargo, la incidencia en árboles asintomáticos puede ser moderada (Mackenzie, 1987). Caso contrario a *P. radiata*, se observa disminución de la incidencia debido a las respuestas del hospedante, que incluyen resinosis, formación de callos y raíces adventicias (Lundquist, 1993). En aguacate, la incidencia no disminuyó a pesar de las prácticas realizadas por el productor y no se presentaron respuestas de defensa. Los resultados en este cultivo concuerdan con los de Robinson y Morrison (2001), quienes afirman que en árboles de 6 a 8 años de edad, el hongo avanza libremente, y supera la resistencia del huésped dando como resultado la muerte del árbol.

### **3.3.2. Pérdidas económicas**

El promedio anual de producción por hectárea fue de 3 ton/ha al tercer año. En el séptimo año la producción por hectárea es de 10 ton, con este dato se calculó la producción de la huerta Xhanamba (Cuadro 1).

El precio por kg de aguacate, para mercado nacional y exportación, se basó en datos de INFOHASS (2013) y APROAM (2013). Se calculó el precio promedio para el ciclo 2012-2013 (Cuadro 4) (\$17 para mercado nacional y \$24 para exportación).

La Huerta Xhanamba produce 794.2 ton a los siete años, el precio para mercado nacional fue de \$17.00 y \$24.00 para exportación (APROAM, 2013; INFOHASS; 2013). El porcentaje de las pérdidas en producción para el huerto en estudio son de 1.16% considerando la densidad de población y el número de árboles sintomáticos y se tomó como base la producción del séptimo año debido a que es el ciclo en el que se llevó a cabo el estudio (Cuadro 3).

**Cuadro 1.** Producción anual de aguacate por hectárea.

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Total en 7 años
Producción (Ton/Ha)			3.0 ton	4.7 ton	8.7 ton	9.7 ton	10 ton	42.5 ton
Producción total de Xhanamba (22 Has)			66 ton	103.4 ton	191.4 ton	213.4 ton	220 ton	794.2 ton

**Cuadro 2.** Precio por año por kg de aguacate para mercado nacional y exportación.

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
<b>NACIONAL</b>	15	15	16.5	18	18	21.5	22	20	14.5	10.5	12.5	12
<b>EXPORTACIÓN</b>	22.5	22.5	24	25.5	25.5	29	29.5	27.5	22	17.5	20	19.5

Fuente. APROAM e INFOHASS (2013)

**Cuadro 3.** Pérdidas en producción provocadas por Armillariosis

	Pérdidas en kg	Pérdidas en \$ para mercado nacional	Pérdidas en \$ para exportación
Pérdidas por <i>Armillaria</i> considerando 29 árboles (1.16%)	2,900 kg	\$49,300	\$69,600

El análisis de las pérdidas en producción mostró que, económicamente hay una diferencia de \$20300.

Los costos de proceso productivo incluyeron costos de producción, operación, flujo de efectivo e ingresos. El estado de pérdidas y ganancias, se realizó con los indicadores financieros mencionados por Hernández (2000).

**Costos de inversión.** De acuerdo a Hernandez (2000) son los costos necesarios para iniciar la actividad cinegética por ejemplo palas, azadones, aspersora motorizada, machetes, mochila aspersora (Cuadro 4)

**Cuadro 4. Costos de inversión de la huerta Xhanamba**

	Precio unitario	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4
<b>Palas</b>	\$176	\$880			
<b>Azadones</b>	\$208	\$1,040			
<b>Machetes</b>	\$78	\$390			
<b>Aspersora motorizada</b>	\$2,000				\$4,000
<b>Fumigadora</b>	\$825	\$2,475			
<b>Tijeras de poda</b>	\$475			\$1,900	
<b>Total anual</b>		\$4,785		\$1,900	\$4,000

Fuente: Elaboración propia

El equipo que se requiere para realizar las actividades culturales del huerto tales como podas, aplicaciones foliares de productos químicos, formación de cajetes, se considera costo de inversión. En el caso de palas, azadones, fumigadora y machetes, el egreso se realiza en primer año, considerando que la

vida útil de las herramientas es en promedio de 7 años. En el caso de las tijeras y las aspersora motorizada, el egreso se realiza en el 3 y 4° año, cuando el árbol ha desarrollado y necesita de podas. Para el primer año el total de los costos de inversión es de \$4,785, en el tercer año son de \$1,900 y en el cuarto de \$4,000.

**Costos de operación.** Son los insumos o mano de obra para llevar a cabo la actividad cinegética (Hernández, 2000) (Cuadro 5). En este caso se consideró un aumento de 3.4% por año debido a la variabilidad del precio en los insumos.

Los costos de operación incluyen todos los descritos en el Cuadro 1, para una hectárea los costos en el primer año son de \$63,700 pesos, a partir del segundo año se considera el 3.4% de aumento, con esto se obtienen costos de \$56, 023, a partir de este año, se adquieren plantas para reposición. En total para las 22 hectáreas del área de estudio se obtuvieron costos de \$3, 005, 905 pesos a los siete años del establecimiento.

**Ingresos.** De acuerdo a Hernández, representan los beneficios o ingresos estimados que generara la huerta a los 7 años, en este caso, se considera la producción obtenida por año. Los datos de producción, generaron los ingresos por año (Cuadro 6).



**Cuadro 5.** Costos de operación de la huerta Xhanamba a los 7 años.

Concepto	Costos/ha	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Costo total/ha a los 7 años	Gastos Xhanamba
Plántula (replantes)	100	10000	500	500	500	500	500	500	13000	91000
Fertilizantes, abonos o mejoradores	14000	14000	14476	14968	15476	16002	16546	17108	108576	760032
Plaguicidas	5700	5700	5893	6093	6300	6514	6735	6964	44199	309393
Herbicidas		400	414	429	443	459	475	491	3111	21777
Salarios jornales	11200	11200	11580	11973	12380	12800	13235	13684	86852	607964
Desvare o podas	1200	1200	1240	1282	1325	1370	1416	1464	9297	65079
Aspersiones	4800	4800	4963	5131	5305	5485	5671	5863	37218	260526
Combustible	3000	3000	3102	3207	3316	3428	3544	3664	23261	162827
Asesoría técnica	10000	10000	10340	10691	11054	11429	11817	12218	77549	542843
Mantenimiento de equipo o maquinaria	2000	2000	2068	2138	2210	2285	2362	2442	15505	108535
Cuotas (sanidad)	1400	1400	1447	1496	1546	1598	1652	1708	10847	75929
<b>TOTAL</b>		<b>\$63,700</b>	<b>\$56,023</b>	<b>\$57,908</b>	<b>\$59,855</b>	<b>\$61,870</b>	<b>\$63,953</b>	<b>\$66,106</b>	<b>\$429,415</b>	<b>\$3,005,905</b>

Elaboración propia con referencias de FIRA (2009).

**Cuadro 6.** Ingresos por ventas de acuerdo a la producción de aguacate por año

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Total a los 7 años
<b>Producción total de la huerta Xhanamba (22 Has)</b>			66 ton	103.4 ton	191.4 ton	213.4 ton	220 ton	794.2 ton
<b>Ingresos por ventas para mercado nacional</b>	0	0	\$1,122,000	\$1,757,800	\$3,253,800	\$3,627,800	\$3,740,000	13,501,400
<b>Ingresos por ventas para mercado de exportación</b>	0	0	\$1,584,000	\$2,481,600	\$4,593,600	\$5,121,600	\$5,280,000	19,060,800

Fuente: Elaboración propia con datos de APROAM (2013) e INFOHAS (2013).

Si el producto se vende en el mercado nacional, los ingresos son \$13, 501,400. Para exportación, se observó una diferencia representativa, los ingresos aumentan a \$19, 060,800.

**Flujo de efectivo.** Se calculó con los costos de inversión y operación, la suma de estos arroja el total por año y se consideran los ingresos anuales si el producto es vendido en mercado nacional. La utilidad se obtiene restando ingresos totales a costos totales (Hernández, 2000) (Cuadro 7)

**Cuadro 7.** Flujo de efectivo de la huerta Xhanamba a los 7 años del establecimiento

Año	Costos		Costos totales	Ingresos totales	Utilidad
	Inversión	Operación			
1	\$4,875	\$63,700	\$68,575	0	<b>(-68,575)</b>
2	0	\$56,023	\$56,023	0	<b>(-56,023)</b>
3	\$1,900	\$57,908	\$59,808	\$1,122,000	<b>1,062,192</b>
4	\$4,000	\$59,855	\$63,855	\$1,757,800	<b>1,693,945</b>
5	0	\$61,870	\$61,870	\$3,253,800	<b>3,191,930</b>
6	0	\$63,953	\$63,953	\$3,627,800	<b>3,563,847</b>
7	0	\$66,106	\$66,106	\$3,740,000	<b>3,673,894</b>
Total			\$440,190	13,501,400	<b>13,061,210</b>

Fuente: Elaboración propia

La utilidad es negativa en el primer y segundo año, en este periodo no se obtienen ingresos y los gastos de inversión son más fuertes. En el tercer año las utilidades son positivas lo que indica la rentabilidad del cultivo. Para determinar el precio del árbol, se consideró la utilidad total y el total de árboles. El costo por

árbol es de \$5224; las pérdidas totales para este ciclo son de \$151,496 por los 29 árboles sintomáticos.

El resumen del estado de pérdidas y ganancias se observa en el cuadro 8, donde se calculan los indicadores financieros. En los primeros dos años la utilidad es negativa debido a que no hay ingresos; a partir del tercer año la utilidad incrementa, aun así las pérdidas por *Armillaria* son significativas.

**Cuadro 8.** Indicadores financieros de las pérdidas provocadas por Armillariosis en aguacate

Estado de Pérdidas y Ganancias							
Concepto	Años						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Ingresos por Ventas</b>	0	0	1122000	1757800	3253800	3627800	3740000
<b>Costos de Producción</b>	68700	56023.0	59808.0	63855.0	61870.0	63953.0	66106.0
<b>Utilidad Bruta</b>	-68700	-56023	1062192.0	1693945.0	3191930.0	3563847.0	3673894.0
<b>gastos financieros</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Utilidad de Operación</b>	-63700	-65865.8	-17105.2	9479.2	59784.9	73119.2	75149.3
<b>Reparto de Utilidades</b>	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Utilidad Neta</b>	-63700	-65865.8	-17105.2	9479.2	59784.9	73119.2	75149.3

### 3.4. CONCLUSIONES

Los síntomas provocados por Armillariosis no se observan en replantes. La severidad e incidencia de la enfermedad incrementó en el mes de mayo. Todos los árboles muestreados mostraron rizomorfos sobre la raíz, estos se consideraron como inóculo primario. La cantidad de rizomorfos y micelio está relacionada con la manifestación de los síntomas, esta variable combinada con las condiciones ambientales, determinan la velocidad de la enfermedad. La incidencia se manifestó en diferentes puntos del huerto, con esto se podría afirmar que el inóculo está en toda el área, ya que previamente la vegetación era pino y encino. De esto, se determina el avance de la enfermedad, las infecciones iniciales pueden ser ocasionadas por los tocones de árboles infectados o bien, por los rizomorfos distribuidos en el suelo. Sin embargo, perder un árbol de aguacate de 7 años por Armillariosis reflejó pérdidas de \$5,224 por árbol considerando ingresos por producción a partir del tercer año. Con base en la incidencia y severidad de la Armillariosis registrada en los 29 árboles de este estudio (29 de un total de 2500 en 22 ha), la pérdida económica fue de \$151,496 equivalentes a \$11, 882 dólares. Esta es la consecuencia económica a los siete años de establecer 22 ha de aguacate en un bosque de pino y encino en Michoacán; pérdida que con base en este estudio, probablemente se incrementará en los próximos años.

### 3.5. LITERATURA CITADA

- Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México (APEAM). 2013. Consulta realizada en Junio de 2013.
- Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate de Uruapan Michoacán. APROAM. 2013. Costo de producción actual de aguacate en huerto con manejo integrado huerta de temporal mes de febrero 2013. El aguacatero. Boletín Informativo. Consultado el 12 de septiembre de 2013. Disponible en versión digital: <http://www.aproam.com/boletines/aguacatero.html>
- Beveridge, A. E., 1973: Mortality in young plantations on sites cleared of indigenous forest. In: New Zealand Forest Service Report 1972. Rotorua: Forest Research Institute, pp. 32–33.
- Edgar, J.G., Kile, G.A. Almond, C.A. 1976. Tree decline and mortality in selectively logged eucalypt forests in central Victoria. Australian Forestry39: 288-303.
- FIRA. 2009. AGUACATE Análisis de Rentabilidad del Ciclo 2006- 2007 y Costos de Cultivo para el Ciclo 2007- 2008. Dirección de Consultoría en Agronegocios Dirección Regional de Occidente Residencia Estatal Michoacán. Disponible en versión digital en [http://www.fira.gob.mx/Nd/AGUACATE\\_Michoacan - Rentabilidad 2006-2007\\_Costos\\_2007-2008.pdf](http://www.fira.gob.mx/Nd/AGUACATE_Michoacan_-_Rentabilidad_2006-2007_Costos_2007-2008.pdf). Consultado en mayo de 2013.
- Garrett, S. D. 1970. Pathogenic Root Infecting Fungi. Cambridge: Cambridge University Press. 294 p.

- Gonzalo M. A., Paredes M. M., Muñoz A. F., Tormo R., Silva I. 1997. Dinámica de dispersión de basidiosporas en la atmósfera de Badajoz. Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín 12:294-300.
- Hernández T. M. 2000. Evaluación financiera de la unidad de conservación manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre San Pedro Tultepec, Estado de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, 99 p.
- Horner I. J. 1991. Epidemiology of root-rot kiwi fruit. Acta Horticulture 297:573-578.
- INFOHASS. El informativo al servicio del aguacatero. 2013. Precio de referencia en huerto. Mercado de EE. UU. Consulta realizada en junio de 2013. Disponible en: <http://www.infohass.net/PrecioHuertoUSA.aspx>
- INFOHASS. El informativo al servicio del aguacatero.2013. Precio de referencia en huerto. Mercado nacional. Consulta realizada en junio de 2013. Disponible en: <http://www.infohass.net/PrecioHuertoNacional.aspx>
- Ivory M.H. 1987. Diseases and disorders of pines in tropics. A Field and Laboratory Manual. Oxford Forestry Institute.
- Kaliszewski A., Lech P., Oszako T.2007. The occurrence of, and economic losses caused by *Armillaria* in the Western Carpathian Mts. Acta Mycologia 42: 219-233.
- Kile G. A. 1983. *Armillaria* Root Rot in Eucalypt Forests: Aggravated Endemic Disease. Pacific Science 37: 459-464.
- Lundquist, J. E., 1993: Spatial and temporal characteristics of canopy gaps caused by *Armillaria* root disease and their management implications in lowveld forests of South Africa. European Journal Forest Pathology 23: 362–371.

- Mackenzie, M., 1987: Infection changes and volume loss in a 19-year-old *Pinus radiata* stand affected by *Armillaria* root rot. *New Zealand Journal Forestry Science* 17:100–108.
- Mallett, K.I. 1992. *Armillaria* root rot in the Canadian prairie provinces. *Forestry Canada, Northwest Region, Northern Forestry Centre, Edmonton, Alberta. Information Report NOR-X-329. 22 p.*
- Morrison, D. J., 2004: Rhizomorph growth habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species. *Forest Pathology* 34:15–26.
- Morrison D. J. 2011. Epidemiology of *Armillaria* root disease in Douglas-fir plantations in the cedar-hemlock zone of the southern interior of British Columbia. *Forest Pathology* 41:31–40.
- Mwenje E., Ride J.P. 1997. The use of pectic enzymes in the characterization of *Armillaria* isolates from America. *Plant Pathology* 46:341-354.
- Ochoa A., S. 2011. Enfermedades del aguacate de importancia económica en México. In. Memoria del XXIV Curso de Actualización Frutícola. 12-14 de octubre. Coatepec Harinas, México. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, p. 9-11.
- Onsando, J. M., Wargo, P. M., and Waudu, S. W. 1997. Distribution, severity, and spread of *Armillaria* root disease in Kenya tea plantations. *Plant Disease* 81:133-137.
- Robinson M. R., Matthew R. W., Smith H. R. 2003. Incidence of *Armillaria* root disease in karri regrowth forest is underestimated by surveys of aboveground symptoms, *Australian Forestry* 66:273-278.

- Robinson, R. M.; Morrison, D. J., 2001: Lesion formation and host response to infection by *Armillaria ostoyae* in the roots of western larch and Douglas-fir. *Forest Pathology* 31:371–385.
- Swift M.J. 1964. *Armillaria mellea* diseases in Central Africa. Report Issued on Behalf of Interested Parties Harare: University of Zimbabwe, 1-5.
- Swift M.J. 1968. Inhibition of rhizomorph development by *Armillaria mellea* in Rhodesian forest soils. *Transactions of the British Mycological Society* 51: 241-247.
- Swift M.J. 1972. The ecology of *Armillaria mellea* (Vahl ex Fries) in the indigenous and exotic woodlands of Rhodesia. *Forestry* 45:67-86.
- Téliz O. D., Mora A. A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. 2da Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.
- Worral J.J., Kelly F. S., Harrington T. C., Steimel J. P. 2004. Incidence, host relations and population structure of *Armillaria ostoyae* in Colorado campgrounds. *Forest Ecology and Management* 192: 191-206.



## CAPÍTULO IV

### HISTOPATOLOGÍA DE RAÍCES DE AGUACATE (*Persea Americana Mill*) INFECTADAS CON *Armillaria*

#### RESUMEN

Los síntomas aéreos y las alteraciones estructurales de raíces de plántulas de aguacate infectadas natural y artificialmente con *Armillaria* sp. fueron caracterizadas. Los árboles infectados en campo mostraron amarillamiento, flacidez, defoliación apical, parcial, marchitamiento, muerte del follaje y cáncer acompañado de una grieta en la base del tronco. A los 137 días después de la inoculación, las plántulas mostraron amarillamiento, flacidez y deformación foliar, y se observaron rizomorfos y micelio en forma de abanico sobre las raíces. El tejido vascular de las plántulas no inoculadas presento fenoles y almidón. El parénquima cortical y el asociado al tejido vascular de los árboles infectados naturalmente y de las plántulas inoculadas mostraron compuestos fenólicos, desintegración y muerte celular. Hubo oclusión de los elementos de vaso por la presencia de micelio. La prueba de lugol fue negativa en el tejido vascular, lo que podría estar asociado al establecimiento del rizomorfo.

**Palabras clave:** almidón, *Armillaria* sp, micelio, rizomorfo.

## CHAPTER IV

### HISTOPATHOLOGY OF AVOCADO (*Persea americana* Mill) ROOTS INFECTED BY *Armillaria* sp.

#### ABSTRACT

Aerial symptoms and structural alterations in roots of seedlings of avocaficially infected with *Armillaria* were characterized. The trees infected in field showed loss of foliar turgor, yellowing, apical defoliation, wilting, death of the foliage and cancer with a crack in the base of the trunk. 137 days after inoculation, seedlings showed yellowing and loss of turgor foliar, rhizomorphs and mycelium subcortical were observed in roots. The vascular tissue of the non inoculated seedlings presented phenols and starch. The cortical parenchyma and the associated with the vascular tissue of the naturally infected and inoculated seedlings showed phenolic compounds, disintegration and cell death. There were elements of vessel occlusion by the presence of mycelium. Lugol's test was negative in the vascular tissue that is associated which could be associated with the establishment of the rhizomorph.

**Key words:** *Armillaria*, mycelium, rhizomorph, starch.

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Los suelos forestales en el estado de Michoacán se deforestan para establecer cultivos de aguacate, por lo que las plantaciones de este cultivo quedan expuestas al ataque de los fitopatógenos presentes de forma natural en esas áreas.

Dentro de los patógenos nativos en los terrenos forestales se tienen varias especies de *Armillaria* (*A. borealis*, *A. epistipes*, *A. ostoyae*, *A. gallica*, *A. tabescens* y *A. ectypa*) (Aguín *et al.*, 2004), las cuales son responsables de la pudrición de la raíz de varias especies de pino y encino. En árboles forestales, la fase inicial de la enfermedad se manifiesta con el amarillamiento y oscurecimiento de las hojas en árboles forestales. Posteriormente, ocurre la secreción de resina de las raíces y troncos (Mallet y Hiratsuka, 1987). Debajo de la corteza del tronco y raíces se desarrolla micelio en forma de abanico, mientras que los rizomorfos se forman exclusivamente en las raíces (Van Der Kamp y Hood, 2002).

La mayoría de los trabajos que describen las alteraciones histológicas que induce este patógeno se han hecho con especies forestales. En *Larix occidentalis*, *Pseudotsuga menziessi* y *Picea sitchensis* ocurre la compartimentalización de tejido, formación de callos y peridermis (Robinson y Morrison, 2001; Solla *et al.*, 2002; Cleary *et al.*, 2012). La formación de resina se observó en *L. occidentalis*, *P. menziessi*, *Pinus radiata* (Van Der Kamp y Hood, 2002) y en *Thuja plicata* (Cleary y Holmes, 2011). Bajo estas condiciones, se induce la formación de una capa de células suberizadas y lignificadas (Cleary *et al.*, 2012), así como la diferenciación de rizomorfos (Solla *et al.*, 2002.). De acuerdo con Robinson y Morrison (2001), la formación de capas de corcho se presenta como una respuesta debida a la

liberación de resina. Los rizomorfos penetran el tejido por mecanismos químicos y físicos e invaden sobre y debajo de la corteza de la raíz, la cual presenta muerte celular ligada al avance del patógeno; finalmente el rizomorfo se establece entre la corteza y el xilema en *Glyricidia maculata* (Leach, 1936). Las hifas invaden las células vasculares y parenquimatosas del xilema y médula. La presencia de almidón puede ser escasa en la corteza, mientras que en la médula es mayor y puede llegar a ocupar la totalidad del tejido (Leach, 1936; Solla *et. al.*, 2002). En *Glyricidia maculata* se observaron compuestos de origen fenólico y necrosis como respuesta al patógeno (Leach, 1936); la muerte celular también se presentó en *P. menziessi* (Cleary y Holmes, 2011) y *P. radiata* (Van Der Kamp y Hood, 2002). De acuerdo con Cleary *et al.* (2012), estas alteraciones pueden ser el resultado de la respuesta a factores abióticos asociada a los mecanismos de defensa del hospedante.

*Armillaria* sp. se ha observado recientemente asociada a árboles de aguacate marchitos o muertos en montañas previamente forestadas, lo que confirma el registro y prevención contra el cambio de bosque por huertos de aguacate (Téliz, 2000; Téliz y Mora, 2007; GIIIA, 2013). Sin embargo, las alteraciones inducidas por *Armillaria* sp. en aguacate no se han estudiado, por lo que el objetivo de esta investigación fue describir los síntomas en el follaje y las alteraciones morfológicas en raíces de aguacate infectadas por *Armillaria* sp.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Análisis histológico e histoquímico

Raíces de aguacate con signos y síntomas inducidos por *Armillaria* sp. se colectaron y disectaron en tres segmentos de 1 cm de longitud para aislar al patógeno y para el análisis histológico.

Los segmentos de raíz se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% y con etanol al 70% durante 10 y 5 min, respectivamente. Las muestras se enjuagaron con agua destilada estéril y se cultivaron en BDS (Benomyl-Dicloran-Streptomycina) y V8 (Agar - Jugo V8-CaCO<sub>3</sub>) a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El inóculo se preparó a partir de los aislamientos purificados y crecidos durante 20 días en BDS. El micelio se fragmentó y mezcló con semillas de encino (Beckman y Pussey, 2001; Aguín *et al.*, 2004) previamente remojadas durante 24 horas y esterilizadas a 120°C durante 40 minutos, y se incubó durante 60 días en oscuridad a temperatura ambiente.

La raíz principal de 35 plántulas de aguacate Hass se laceró mecánicamente con tijeras desinfectadas con alcohol al 70% durante 5 min para acelerar el proceso de infección, y se inoculó con una semilla de encino. Como tratamiento testigo, la raíz principal de tres plántulas de aguacate Hass y dos de Mexicano se inocularon con una semilla de encino sin micelio. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se regaron cada tercer día hasta la manifestación de síntomas.

Las raíces recolectadas en campo y de las plántulas inoculadas artificialmente (141 días después de la inoculación-ddi), se cortaron en secciones de 1 cm de longitud y se fijaron en una mezcla de formaldehído-ácido acético glacial y etanol al 96% durante 24 horas (López *et al.*, 2005; Cleary y Holmes, 2011). Las muestras se deshidrataron gradualmente en etanol al 10, 20, 30, 40, 50, 70, 85, 96 y 100% durante 5 horas. Posteriormente, se colocaron en una mezcla de etanol absoluto: xileno (1:1) y xileno durante 5 horas en cada cambio. El material se incluyó en paraplast (SIGMA Chemical Co. USA) durante 48 horas a 60°C. Las muestras se cortaron transversal y longitudinalmente en un micrótopo rotatorio (Spencer 820) a 10 µm de grosor. Las secciones obtenidas se desparafinaron y tiñeron con la técnica diferencial safranina-verde rápido de acuerdo con el protocolo descrito por López *et al.* (2005). Las secciones se observaron y describieron con ayuda de un microscopio American Optical (Spencer). El registro fotográfico se hizo en un Fotomicroscopio III Carl Zeiss con cámara digital para microscopía PAXcam.

Con base a las observaciones hechas en la tinción con safranina-verde rápido, se realizó la prueba histoquímica para determinar la presencia de almidón. Para esta técnica se empleó la metodología de Johansen (1940); las muestras se procesaron de acuerdo a los métodos anteriormente descritos. En el caso de la tinción con Lugol (2 g de yoduro de potasio, 0.5 g de yodo y 100 ml de agua destilada) las muestras se hidrataron de la siguiente manera: etanol 100, 96, 85, 70, 50, 40% finalmente se colocaron en agua destilada. El tejido fue teñido con Lugol durante 15 minutos, se colocó el cubre objetos y se observaron en el microscopio anteriormente descrito.

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. Síntomas en árboles infectados naturalmente**

Los árboles de aguacate con Armillariosis en la huerta se caracterizaron por amarillamiento, flacidez y necrosis de las hojas, capas de micelio, algunas con bordes en forma de abanico debajo de la corteza y rizomorfos oscuros en la superficie de la raíz. En árboles en producción y floración se observó flor y frutos adheridos a las ramas, y de cáncer asociado a una grieta en la base del tronco (Figura 1).

#### **4.3.2.- Síntomas en plántulas inoculadas en invernadero.**

A los 137 días después de la inoculación (ddi), las plántulas presentaron amarillamiento, pérdida de turgencia y en algunas ocasiones deformación foliar (enrollamiento de la hoja hacia el envés) (Figura 2).

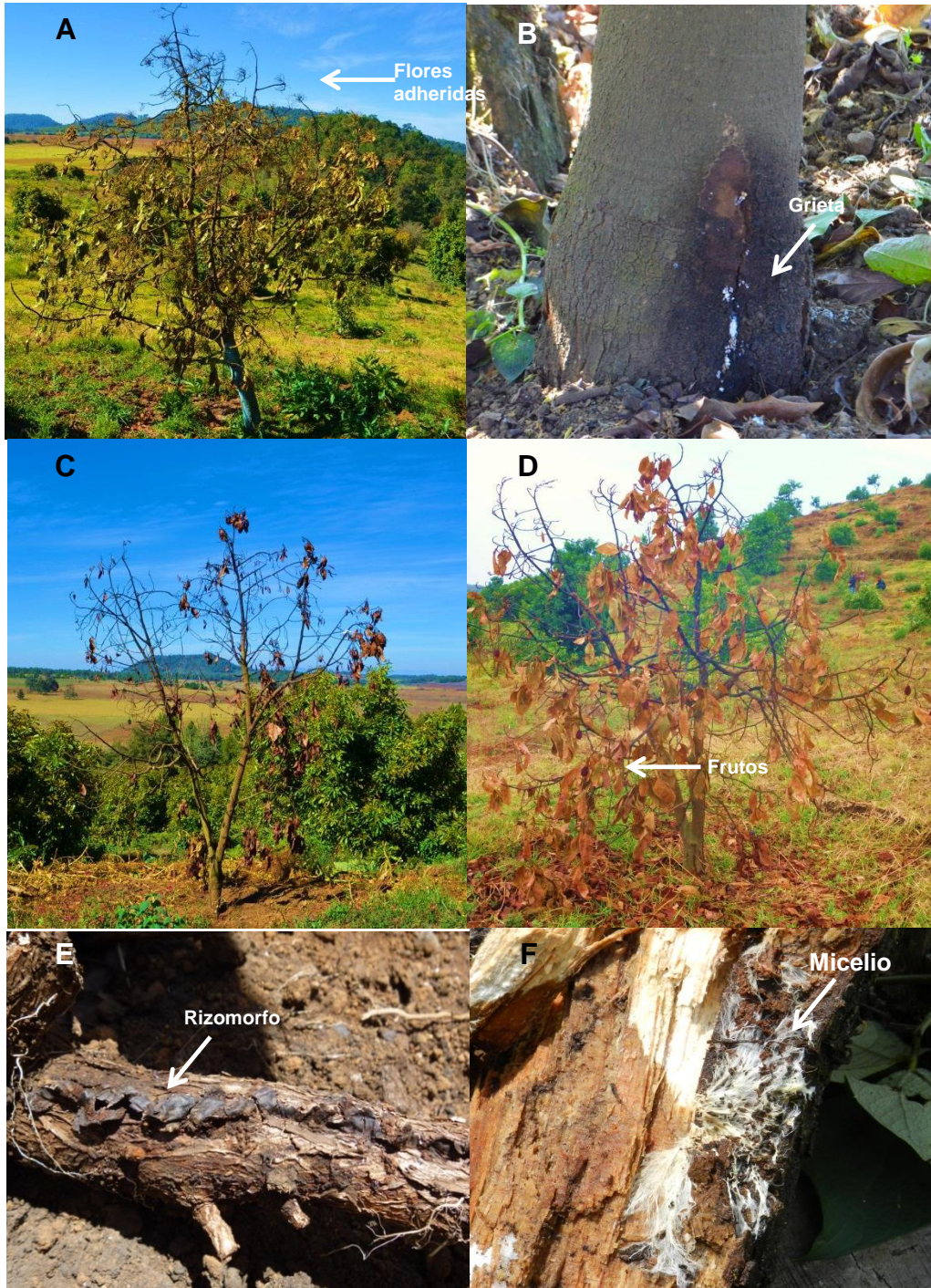


Figura 1. Síntomas en árboles de aguacate infectados con *Armillaria* en campo. Defoliación apical, flor adherida y flacidez (A); grieta y cáncer en la base del tronco (B); defoliación parcial con follaje marchito (C); frutos adheridos con follaje marchito y adherido al árbol (D); rizomorfo sobre la raíz (E); micelio en forma de abanico debajo de la corteza (F).



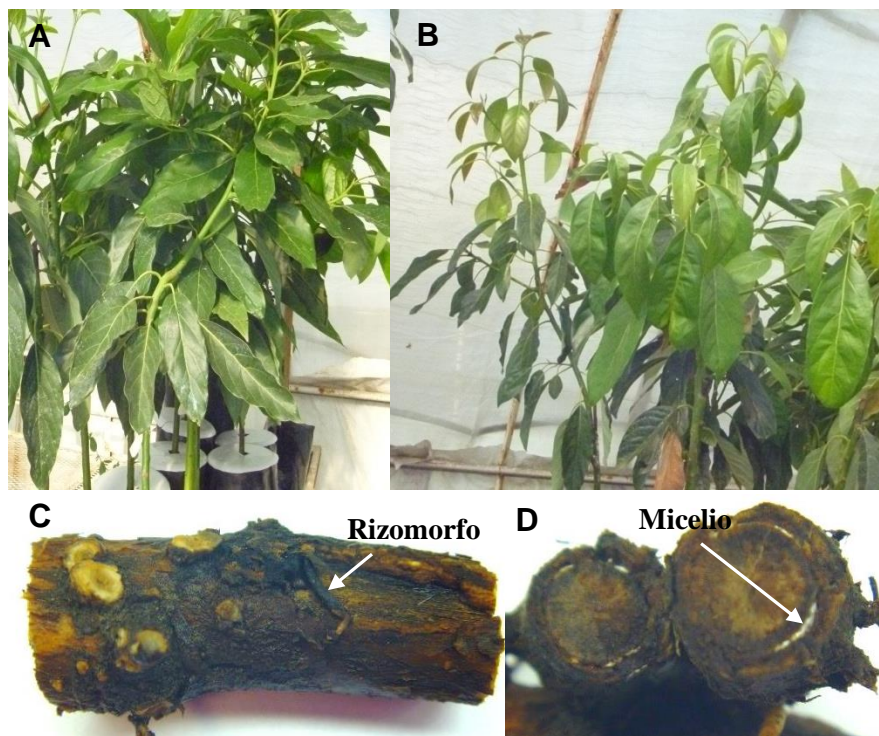


Figura 2. Síntomas inducidos por *Armillaria* en plántulas de aguacate Hass mantenidas bajo invernadero. Plántula sana (A), plántula inoculada (B), raíz con rizomorfo (C). raíz con micelio subcortical (D).

En este estudio, no se observaron diferencias entre los síntomas expresados en las plantas de aguacate infectadas naturalmente y las inoculadas en invernadero. Bajo estas condiciones, las plantas mostraron amarillamiento y pérdida de turgencia de las hojas, lo cual coincide con lo reportado por Coria (2008) y Ochoa (2011) en aguacate Hass en huertas comerciales de los estados de Morelos y Michoacán, respectivamente.

### 4.3.3. Histología

**Raíces de plantas sanas (testigo).**- En sección transversal, las raíces conservaron restos de tejido peridérmico y una capa pluriestratificada de floema secundario en donde algunas de las células parenquimatosas presentaron depósitos de color café rojizo de posible naturaleza fenólica (Figura 3A). El xilema secundario se observó como una banda continua de elementos de vaso, parénquima y fibras (Figura 3B); las células parenquimatosas presentaron almidón (Figuras 3C y 3D). El xilema primario se localizó en el centro de la raíz también con algunos depósitos de fenoles (Figura 3B).

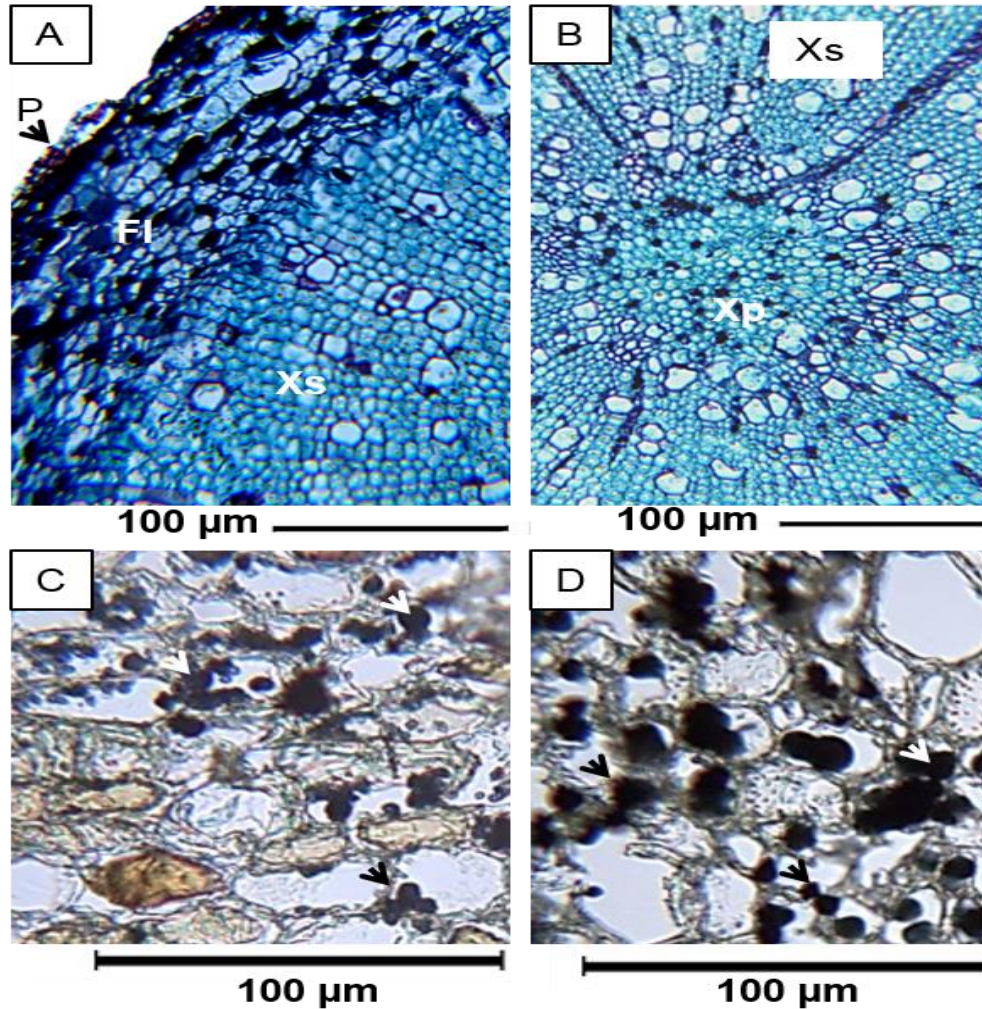


Figura 3. Sección transversal de raíz sana de aguacate. Pe (Peridermis); F (Floema); Xs (Xilema secundario); Xp (Xilema primario). Cortes transversales tratados con lugol (C y D). Las flechas señalan la presencia de almidón en las células parenquimatosas del xilema y floema secundario

**Raíces de plantas sintomáticas.-** Las raíces de árboles infectados naturalmente en campo mostraron micelio en la peridermis. Posteriormente, el micelio invadió intra e intercelularmente el floema secundario; en donde algunas de las células se necrosaron y otras presentaron mayor contenido de fenoles con respecto al tejido sano (Figura 4A). Las hifas de *Armillaria* se distribuyeron longitudinalmente en la zona de transición entre la peridermis y el floema,

empezaron a diferenciarse en rizomorfo (Figura 4B). En sección longitudinal se observaron fíbulas y una capa de células esclerenquimatosas en el tejido micelial del rizomorfo (Figuras 4A y 5A). Las células parenquimatosas y los elementos de vaso del xilema secundario fueron colonizados por el hongo (Figura 4C), y presentaron fenoles (Figuras 4C y 4D). La prueba histoquímica para determinar la presencia de almidón fue negativa (Figura 5B).

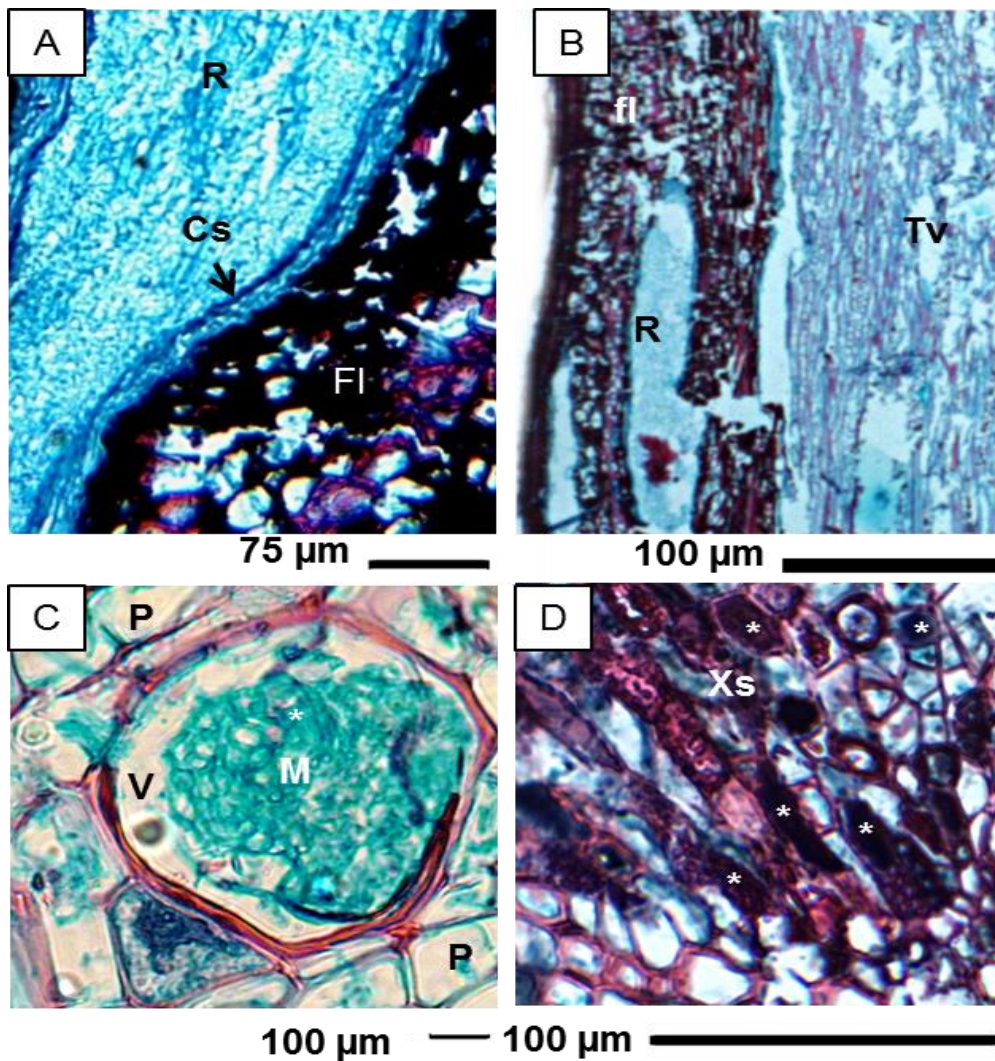


Figura 4. Sección transversal (A, C y D) y longitudinal (B) de raíces de aguacate infectadas natural y artificialmente con *Armillaria*. Cs (Células esclerenquimatosas); Fenoles (\*); Fl (Floema); M (Micelio); P (Parénquima); R (Rizomorfo); Tv (Tejido vascular); V (Vasos); Xs (Xilema secundario).

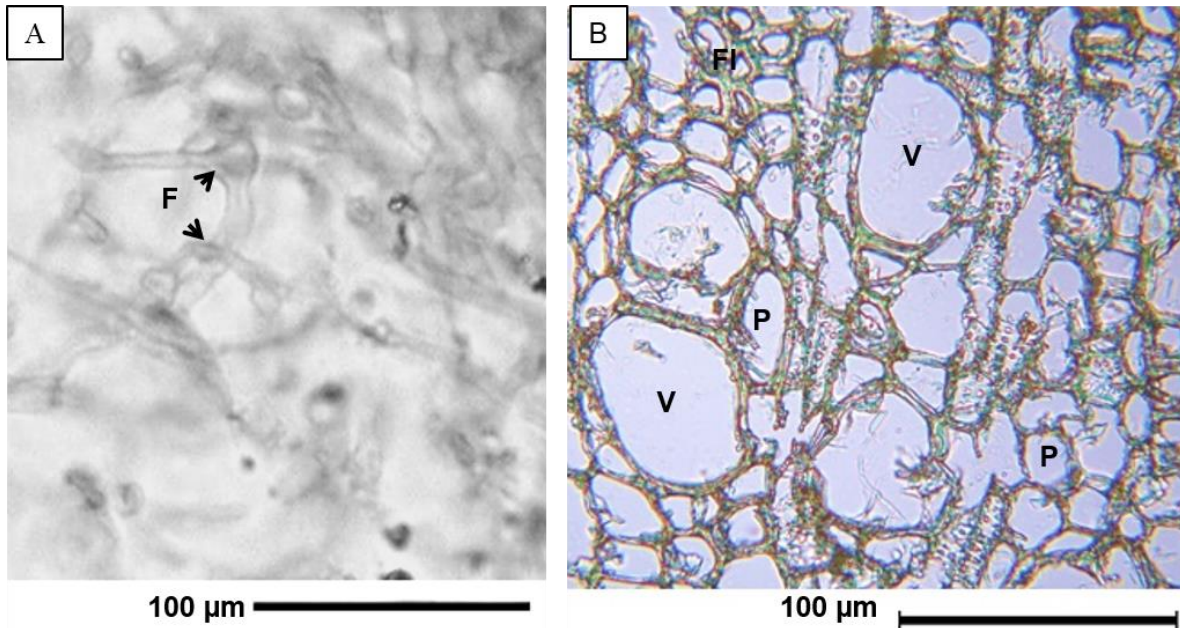


Figura 5. Cortes transversales de raíces de aguacate infectadas natural y artificialmente. F (Fíbulas); FI (Floema); P (Parénquima); V (Vasos del xilema).

No se observaron diferencias entre los síntomas iniciales expresados en los árboles de aguacate infectados naturalmente y las plántulas inoculadas en invernadero. En la mayoría de los árboles del huerto y en dos plántulas inoculadas artificialmente, las hojas mostraron amarillamiento y pérdida de turgencia, lo cual coincide con lo reportado por Coria (2008) y Ochoa (2011) en aguacate Hass en huertas comerciales de los estados de Morelos y Michoacán, respectivamente. De acuerdo con Dionicio Alvarado Rosales (2013) y Daniel Téliz Ortiz (2013), comunicación personal, estos síntomas también se presentan en árboles de durazno y ciruela infectados en campo con *Armillaria* sp. Un síntoma adicional inducido en las plántulas inoculadas artificialmente fue el enrollamiento de la lámina hacia el envés de un total de 36 hojas se observó en cinco hojas apicales de las dos plántulas que manifestaron los síntomas.

Las alteraciones observadas en los árboles de aguacate infectados naturalmente fueron similares a las descritas en la asociación de *Armillaria* con *Larix occidentalis*, *Pseudotsuga menziessi*, *Pinus radiata* y *Thuja plicata* (Robinson y Morrison, 2001; Van Der Kamp y Hood, 2002; Cleary y Holmes, 2011), excepto que en aguacate no hubo formación de callos ni resina. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Leach (1936) en plántulas de té (*Glyricidia maculata*).

A nivel histológico, las células del tejido cortical y vascular de aguacate se observaron con depósitos de fenoles. El rizomorfo se estableció entre la corteza y el xilema, por lo que el floema quedó totalmente desorganizado, lo que limita el suministro de nutrimentos, lo cual coincide con las alteraciones descritas por Leach (1936) en *G. maculata*. Las hifas del hongo invadieron las células parenquimatosas y vasos del xilema primario y secundario, que explica el amarillamiento, marchitez y necrosis foliar en campo, esto debido a que el micelio interfiere en el movimiento de nutrientes; es posible que tal invasión ocurra intra e intercelularmente, como lo reportó Solla *et al.*, (2002) en *Picea sitchensis*; sin embargo, se sugiere hacer estudios complementarios a nivel de microscopía electrónica de transmisión para corroborar tales observaciones. Además de la presencia de fenoles, hubo necrosis de la corteza y del tejido vascular de las raíces de aguacate. Es posible que estas alteraciones se deban a la actividad enzimática de la lacasa, la cual es producida de manera natural por el rizomorfo (Worral y Hüttermann, 1986); Aunque también pudieran ser el resultado de los mecanismos de defensa estructural y bioquímica que expresa la planta ante el patógeno (Soustrade y Escarmant, 1997; Shaw y Kile 1991).

En las plántulas de aguacate no se observaron los sitios de penetración debido a que la inoculación se hizo mecánicamente, facilitando la entrada del hongo. En *L. occidentalis*, *P. menziessi*, *P. radiata* y *T. plicata* tampoco se observó el punto de contacto del patógeno probablemente por la acumulación de resina (Robinson y Morrison, 2001) o la formación de callos (Van Der Kamp y Hood, 2002).

En las raíces de aguacate de los árboles infectados naturalmente, las células parenquimatosas de la corteza, xilema secundario y xilema primario no dieron reacción positiva a la presencia de almidón, lo que podría deberse a que el hongo lo utilizó como sustrato para mantener su desarrollo durante la invasión del resto de los tejidos de la raíz (Leach, 1936).

El amarillamiento y pérdida de turgencia inducidos por *Armillaria* en las plántulas de aguacate infectadas artificialmente fueron similares a los observados en campo. El hongo indujo degradación y muerte celular de la corteza y tejido vascular, así como la acumulación de fenoles. El rizomorfo se estableció entre la corteza y el xilema, mientras que los elementos de vaso del xilema secundario se ocluyeron por la presencia de micelio.

#### 4.4. CONCLUSIONES

Los síntomas inducidos por *Armillaria* en los arboles infectados naturalmente fueron defoliación apical parcial, amarillamiento, necrosis foliar, permanencia de flores, frutos y hojas en las ramas, y la presencia de cáncer acompañado de una grieta en la base del tronco.

Las plántulas inoculadas artificialmente mostraron amarillamiento y flacidez foliar, y excepcionalmente enrollamiento de la lámina hacia el envés.

El hongo indujo degradación y muerte celular del tejido vascular, y la acumulación de fenoles.

El almidón observado en las plántulas sanas, no se presentó en las raíces infectadas natural y artificialmente.

El rizomorfo se estableció entre la peridermis y el floema secundario.

Los elementos de vaso del xilema secundario se ocluyeron por la presencia de micelio.



#### 4.5. LITERATURA CITADA

- Aguín M. J., Saínz, O. y Mansilla J.P. 2004. A fast method for production of *Armillaria* inoculum. *The Mycological Society of America*. 93:612-615.
- Andrade H. P. 2012. Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* (Rands). Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, 63-85 p.
- Beckman T.G., Pussey P.L. 2001. Field Testing Peach Rootstocks for Resistance to *Armillaria* Root Rot. *Hortscience*. 36:101-103.
- Cleary, Van der Kamp B.J. y Morrison D.J. 2012 B. Effects of wounding and fungal infections with *Armillaria ostoyae* in three conifer species. Host response to abiotic wounding in non-infected roots. *Forest Pathology*, 42:100-108.
- Cleary M.B., Van der Kamp B.J., Morrison D.J. 2012 A. Effects of wounding and fungal infections with *Armillaria ostoyae* in three conifer species. Host response to the pathogen. *Forest Pathology*, 42:109-123.
- Cleary, y Holmes T. 2011. Formation of traumatic resin ducts in the phloem of western redcedar (*Thuja plicata*) roots following abiotic injury and pathogenic invasion by *Armillaria ostoyae*. *IAWA Journal*. 32: 351–359.
- Coria A., V.M. 2008. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, Libro Técnico No. 8, Uruapan, Michoacán, 145-146 p.
- GIIIA (Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate. Bautista M. N., Beltrán P. H., Castañeda V. A., Chávez A. A. M., Equihua M. A., Duran P. E., Fierro C. D., González H. H., González S. M.G., Lomelí F. R., Marroquín P. F., Michua C. J., Nava D. C., Nieto A. D., Ochoa A. S.,

- Ochoa M. D., Rodríguez L. E., Santillán G. M. T., Saucedo C. J. R., Soria R. J., Téliz O. D., Valdovinos P. G., Vallejo R. M. 2013. El Aguacate en Michoacán. Plagas y Enfermedades. López Impresos, Michoacán, México, 56 p.
- Leach R. 1936. Observations on the parasitism and control of *Armillaria mellea*. Royal Society. 3:561-576.
- López-Curto. M.L., Márquez-Guzmán J. y Murguía-Sánchez G. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México/Facultad de Ciencias, México, D.F. 178 p.p.
- Mallet K.I., Hiratsuka Y. 1987. Inoculation studies of loddpole pine with Alberta isolates of the *Armillaria mellea* complex. Canadian Journal Forestry. 18: 292-296.
- Ochoa A., S. 2011. Enfermedades del aguacate de importancia económica en México. In. Memoria del XXIV Curso de Actualización Frutícola. 12-14 de octubre. Coatepec Harinas, México. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, p. 9-11.
- Phillips, D., Grant, B. R., Weste, G. 1987. Histological changes in the roots of an avocado cultivar Duke 7, infected whit *Pythophthora cinnamomi*. Phytopathology. 77: 691-698.
- Robinson R. M., Morrison D. J. 2001. Lesion formation and host response to infection by *Armillaria ostoyae* in the roots of western larch and Douglas-fir. Forest Pathology. 31: 371-385.

- Shaw G., Kile A. G. 1991. *Armillaria* Root Disease. Agricultural Handbook, No. 691. United States Department of Agriculture Forest Service. Chapter 5, 62-66 p.
- Solla, A., Tomlinson, F. Woodward, S. 2002. Penetration of *Picea sitchensis* root bark by *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae* and *Heterobasidion annosum*. Forest Pathology. 32: 55-70.
- Soustrade I. R., Escarmant B. L. 1997. Laccase isoenzyme patterns of European *Armillaria* species from culture filtrates and infected woody plant tissues. European Journal Forestry Pathology. 27: 105-114.
- Téliz D. 2000. El Aguacate y su Manejo Integrado. Ed Mundiprensa México, S.A. de C.V. 1a edición. 233 p.
- Téliz D., Mora A. 2007. El Aguacate y su Manejo Integrado. Ed Mundiprensa México, S.A. de C.V. 2a edición. 321 p.
- Van Der Kamp, B.J., Hood, I.A. 2002. *Armillaria* root disease of *Pinus radiata* in New Zealand. 2: invasion and host reaction. New Zealand Journal of Forestry Science. 32: 103-115.
- Worrall J.J., Chet I., Hüttermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. Journal of General Microbiology. 132: 2527-2533.

## CAPÍTULO V

### LOS RIZOMORFOS DE *Armillaria*: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA

#### RESUMEN

Los rizomorfos de medio de cultivo y campo se caracterizaron con técnicas histológicas. Se identificaron los tejidos presentes en estas estructuras, macroscópicamente se establecieron las diferencias en el crecimiento y ramificación y coloración. Los rizomorfos provenientes de raíces y los de condiciones artificiales presentaron la misma estructura. Se observó la corteza, subcorteza, médula primaria e hifas, las células de estos tejidos son redondas a oblicuas y no presentan organelos por ser estructuras de resistencia. La diferencia entre los rizomorfos analizados fue la presencia de tejido mucilaginoso (hifas) durante el desarrollo en condiciones controladas, la coloración de los rizomorfos durante las primeras semanas de cultivo fue amarillo-cremoso, transcurridas tres semanas adquieren una coloración rojiza marrón a negra, misma coloración que se presenta en rizomorfos presentes en raíces y suelo en ambiente natural.

**Palabras clave:** hifas, corteza, médula primaria, subcorteza

## CHAPTER V

### RHIZOMORPHS OF *Armillaria*: MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION

#### ABSTRACT

The rhizomorphs of culture medium and field were characterized with histological techniques. Macroscopically were established differences in the growth, branching and coloration of both rhizomorphs. The rhizomorphs from roots of field and artificial conditions showed the same structure. Was observed cortex, subcortex, primary medulla and hyphal, these cells of these tissues were round to oblique and they do not have organelles since this are structures of resistance. The difference between the rhizomorphs analyzed was the presence of mucilaginous tissue (hyphae) in rhizomorphs of controlled conditions, the coloration during the first weeks was creamy-yellow, three weeks after, the rhizomorphs acquired coloration brown to black, this coloration was observed in the rhizomorphs in soil and roots of infected trees

**Keywords:** cortex, hyphae, primary medulla, subcortex

## 5.1. INTRODUCCIÓN

La estructura, desarrollo y funciones de los rizomorfos producidos por algunos Basidiomycetes no se han estudiado de forma intensiva (Snider, 1959), Los rizomorfos son adaptaciones morfológicas especiales (Shaw y Kile, 1991); con una apariencia externa similar a las raíces de árboles. De las raíces infectadas los rizomorfos se extienden por el suelo para encontrar y parasitar las raíces de árboles vecinos (Worral *et al.*, 1986). Los rizomorfos de *Armillaria* proporcionan un método de propagación vegetativa y es el método más común que el hongo utiliza para extenderse de un hospedante a otro. Varios trabajos se limitan al desarrollo del rizomorfo en *Armillaria mellea* (Snider, 1959; Hartig, 1873). Townsend (1954) clasificó los rizomorfos de acuerdo al arreglo de los tejidos: rizomorfos no diferenciados (*Hymenogaster luteus*), rizomorfos que muestra hifas similares dispuestas de manera diferente (*Hymenogaster tener*, *Collybia platyphylla*, rizomorfos que muestran zonas de hifas de diferentes tamaños (*Flammula sapinea*, *Crucibulum vulgare*, *Cyathus striatus*, *Psalliota campestris*, *P. aroensis*, *Phallus impudicus*, *Hysterangium nephriticum*) y los de hifas con paredes engrosadas (*Lycoperdon pyriforme*, *L. gemmatum*, *Armillaria mellea*, *Marasmius androsaceus*). El micelio fue estudiado con microscopía electrónica por Berliner y Duff (1965) quienes observaron las hifas compuestas por doble membrana, mientras que Moore (1965) e Issac (1995) hacen referencia a los espacios porosos de las células del rizomorfo. El trabajo de Brefeld (1877) es históricamente importante en dos aspectos: fue uno de los primeros ejemplos de la técnica de cultivo puro con cualquier organismo, y fue la primera descripción del

crecimiento apical de rizomorfos, lo que reporta como meristemo, esto en base a observaciones microscópicas y a las estructuras del hongo.

La caracterización morfológica de los rizomorfos se ha realizado también en *A. tabescens* aislada de maderas duras (Motta y Cope, 1982). La importancia del conocimiento del rizomorfo radica en que es una estructura en el proceso de división nuclear somática en los basidiomicetos (Motta, 1969), además de ser una estructura de protección y de movilización de nutrientes del patógeno (Issac, 1995). Los antecedentes mencionados se relacionan con *Armillaria* en árboles forestales. El aguacate es un cultivo de gran importancia económica en Michoacán en donde el área susceptible de cultivo se ha saturado y nuevas plantaciones se están estableciendo en montañas forestales (GIIIA, 2013). Hongos del suelo, como *Armillaria*, han evolucionado y coexistido con los árboles forestales por siglos. Al tirar y sacar los árboles forestales *Armillaria* no se muere de hambre sino que sobrevive por meses o años saprofiticamente y con sus rizomorfos, como estructuras de resistencia. Los árboles de aguacate se desarrollan vigorosamente en estas áreas forestales. Es probable que las raíces de aguacate estimulen y atraigan a los rizomorfos, que las parasitan y matan en poco tiempo, por ser un cultivo “exótico”. La Armillariosis se está presentando en estos huertos de aguacate establecidos en montañas forestales. La muerte de árboles de aguacate por la pudrición de raíces causada por *Armillaria* está ocurriendo en estas nuevas plantaciones. El desarrollo de los rizomorfos en aguacate es desconocido, por lo que el objetivo del presente estudio fue caracterizar morfológicamente los rizomorfos de raíces de árboles de aguacate y compararlos con los rizomorfos aislados y desarrollados en medio de cultivo.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Colecta de rizomorfos del campo

Los rizomorfos se colectaron de raíces de árboles sintomáticos de la huerta Xhanamba (2352 msnm, 19° 37' 92.4" de latitud norte y 102° 18' 01.7" de longitud oeste). Una sección de los rizomorfos se sembró para aislar al hongo en medio BDS (Cannon *et al.*, 2007; Aguíñ *et al.*, 2001). En cada caja se colocaron cinco segmentos de tejido con micelio y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante cuatro semanas.

### 5.2.2. Análisis histológico

Los rizomorfos colectados en campo y los cultivados por 3 semanas en medio BDS inmersos en el medio de cultivo y externos a este se cortaron en secciones de 1 cm de longitud y se fijaron en una mezcla de formaldehído-ácido acético glacial y etanol al 96% durante 24 horas (López *et al.*, 2005). Las muestras se deshidrataron gradualmente en etanol al 10, 20, 30, 40, 50, 70, 85, 96 y 100% durante 4 horas y se colocaron en la mezcla de etanol absoluto: xileno (1:1) y xileno durante 3 horas en cada cambio. Las muestras se incluyeron en paraplast (SIGMA Chemical Co. USA) durante 24 horas a 60°C. Los cortes se realizaron transversal y longitudinalmente en un micrótopo rotatorio (Spencer 820) a 10 µm de grosor. Los cortes obtenidos se desparafinaron y tiñeron con safranina-verde rápido (López *et al.* (2005). Las secciones se observaron y describieron en un



microscopio American Optical (Spencer). El registro fotográfico se hizo en un fotomicroscopio III Carl Zeiss con cámara digital para microscopía PAXcam.

## 5.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1. Rizomorfos de Campo

La coloración de los rizomorfos es rojiza marrón a negra (Worral et al., 1986; Issac, 1995; Smith y Griffin, 1970), la ramificación es dicotómica y no se distinguió macroscópicamente la zona apical, tampoco hubo presencia de tejido mucilaginoso adherido a la corteza (Figura 1). En general los rizomorfos de la raíz y los desarrollados en el suelo tuvieron una longitud variable. Los cortes histológicos mostraron algunos de los tejidos y la zona apical que menciona Motta, 1982, 1969 y Shaw y Kile (1991). El rizomorfo maduro se compone de tres capas concéntricas en sección longitudinal: El centro apical o médula primaria con una masa de hifas apicales, la subcorteza y la corteza. Las células del tejido cortical y subcortical son oblicuas y carentes de organelos debido a que es un tejido esclerenquimatoso o de protección (Issac, 1995). El corte transversal muestra los mismos tejidos, sin embargo las hifas del hongo son dispersas y abundantes en comparación con el corte longitudinal (Figuras a, b, c-1, c-2). El canal de oxígeno que menciona Isacc (1995) no se observó, posiblemente debido a que las hifas están dispersas en todo el rizomorfo.

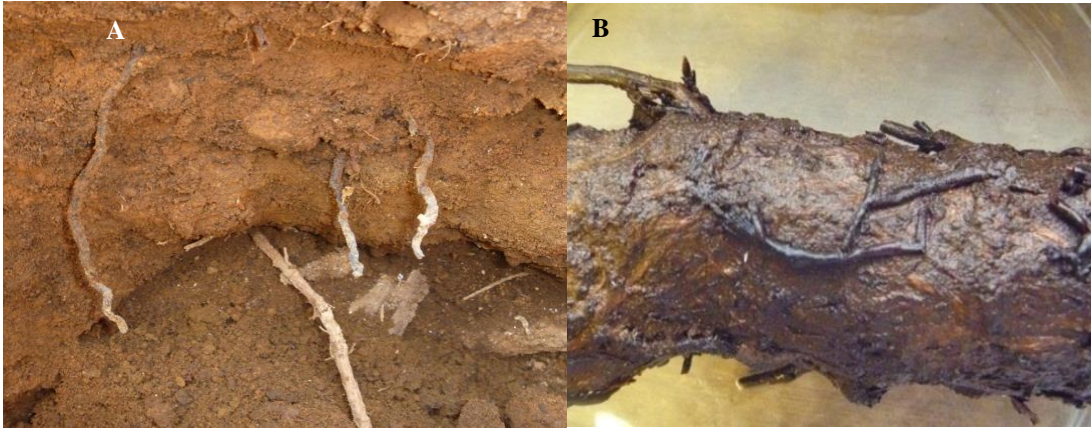
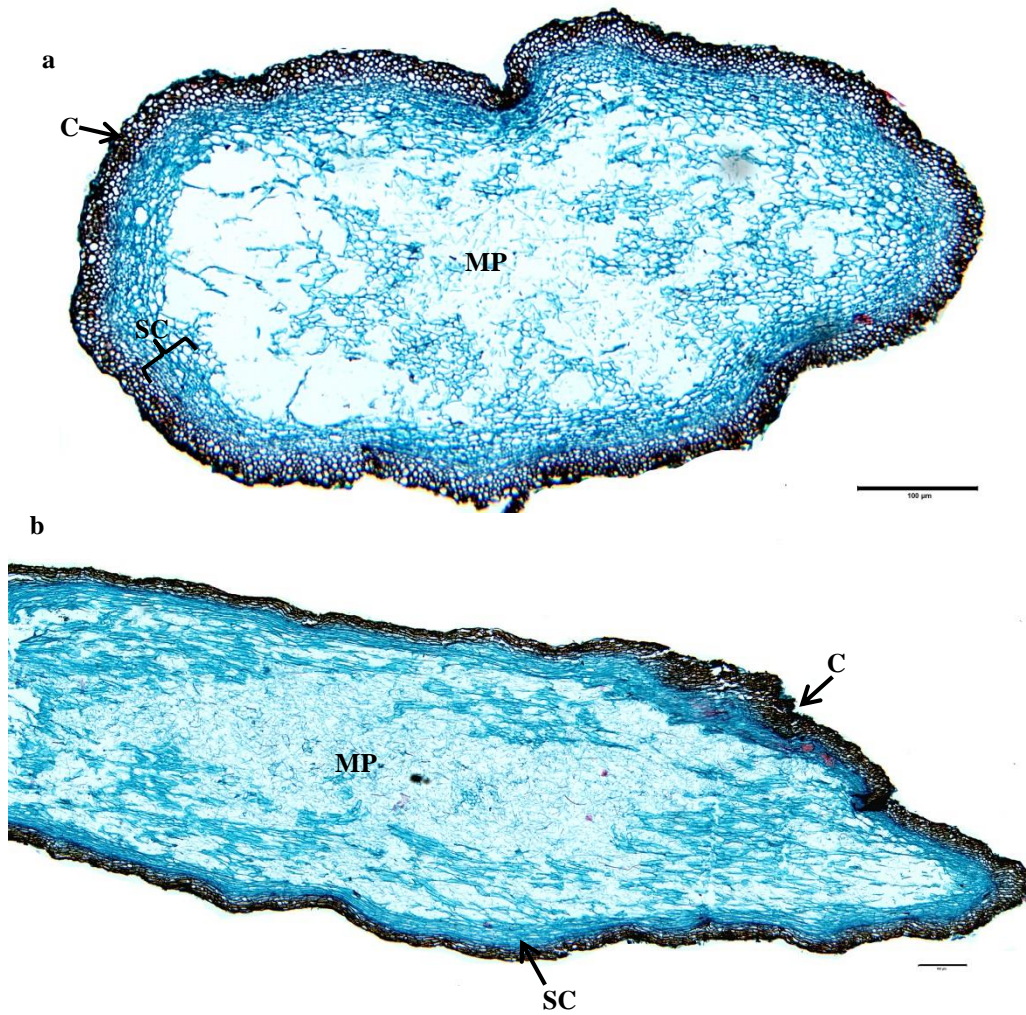


Figura 1. Rizomorfos de *Armillaria* en un huerto de aguacate establecido en una zona previamente forestal. . Rizomorfos desarrollados en el suelo (A); rizomorfos sobre raíz de aguacate (B)



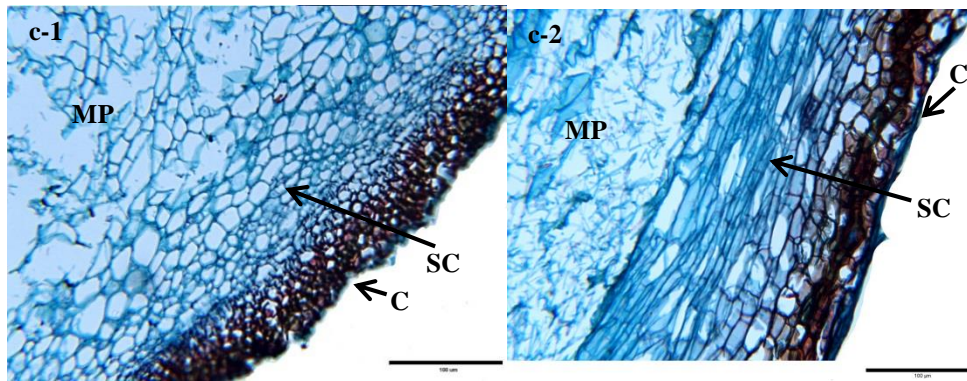


Figura 2. Cortes histológicos de rizomorfos de *Armillaria* de campo ilustrando la distribución de los tejidos. Corte transversal (a y c-1): MP, médula primaria; SC, subcorteza; corte longitudinal (b y c-2); C, corteza; SC, subcorteza y MP, médula primaria (en este tejido se encuentran las hifas del patógeno).

### 5.3.2. Rizomorfos in vitro

Los rizomorfos de laboratorio se caracterizaron por tener una coloración amarillo cremosa durante las dos semanas iniciales de su desarrollo (), además presentaron hifas (Shaw y Kile, 1995; Harting, 1870, 1874). Los rizomorfos inmersos en el medio BDS, además de la coloración amarillo cremosa también presentaron el tejido hifal filamentoso. Cuando los rizomorfos emergen del medio BDS y entran en contacto con el oxígeno las puntas adquieren una coloración negra o marrón (Smith y Griffi, 1970), y tienen mayor crecimiento (Worrall *et al.*, 1986; Smith y Griffin, 1970) la coloración oscura es atribuida a la enzima lacasa o a la actividad de la p-difenol oxidasa, la ramificación de los rizomorfos fue dicotómica. Los cortes histológicos mostraron corteza, subcorteza y médula primaria, como fue descrito por Motta (1982, 1969), Shaw y Kile (1991) y Harting (1870, 1874). Las células de la subcorteza presentaron una coloración más oscura, tal vez debida a la pigmentación por melanina (Issac, 1995), mientras que las del tejido cortical se observaron más claras. La masa de hifas no se

observó tan compacta en los cortes longitudinal y transversal, como en el caso del rizomorfo de campo (Figura 4).

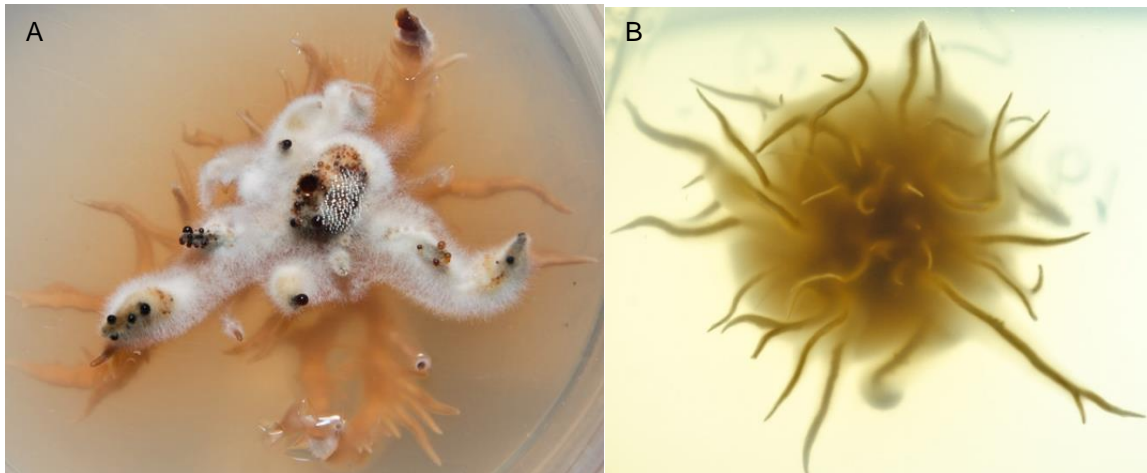


Figura 3. Rizomorfo de *Armillaria* aislado de raíces de aguacate, después de tres semanas de crecimiento en medio de cultivo BDS. A, vista anterior de la caja y B vista posterior. Puntas de los rizomorfos con coloración oscura al tener contacto con el oxígeno, adjunto a estos se observan las hifas del hongo (descrito por algunos autores como tejido mucilaginoso), rizomorfos con coloración amarillo cremosa inmersos en el medio de cultivo.

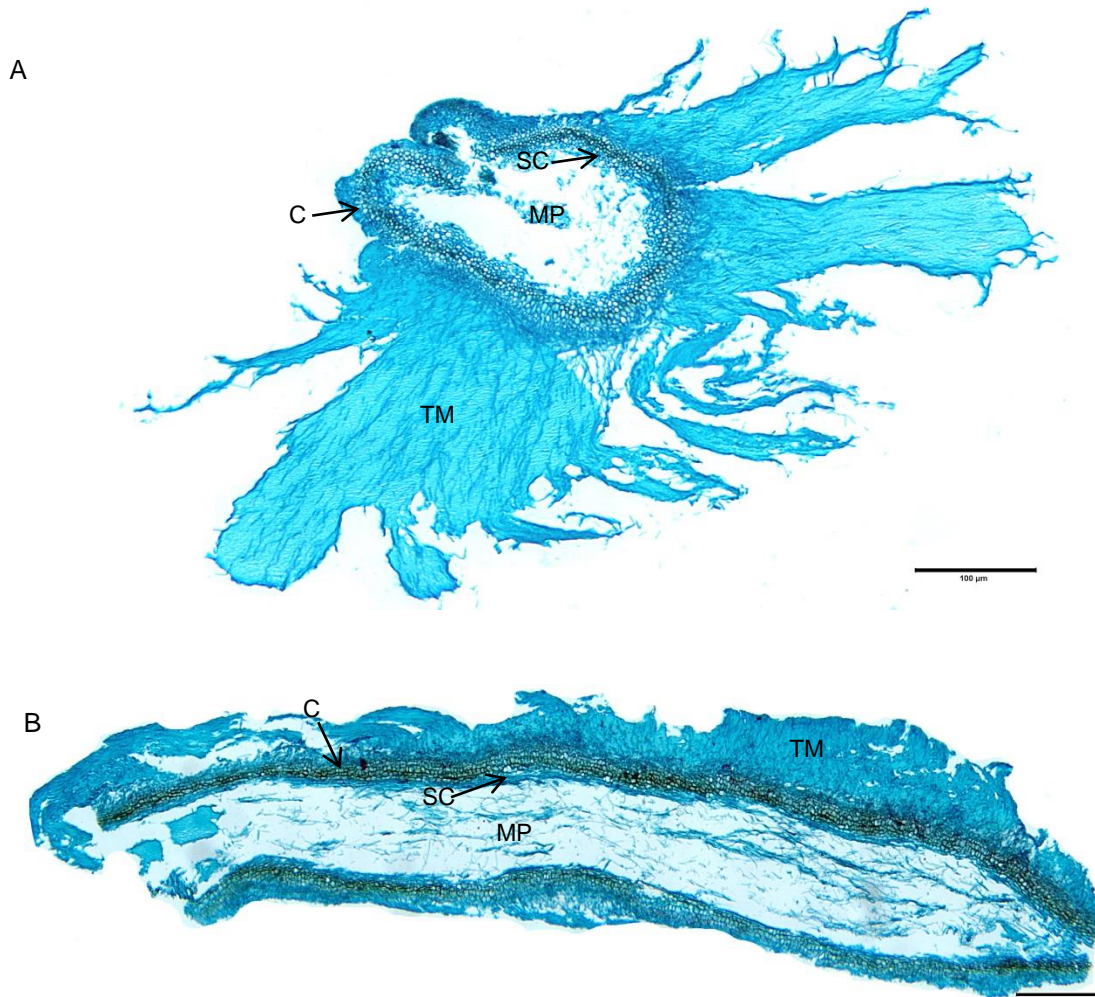


Figura 4. Rizomorfos de *Armillaria* en medio de cultivo BDS. Corte transversal (A) y longitudinal (B). TM, tejido mucilaginoso constituido por hifas del hongo; C, corteza; SC, subcorteza, MP, médula primaria.

Las diferencias (presencia de tejido mucilaginoso) que se presentan entre los rizomorfos concuerdan con Harting (1874), hay variación en los rizomorfos de acuerdo al ambiente en donde se desarrollan. El crecimiento y longitud depende de la cantidad de oxígeno disponible ya sea en el suelo o in vitro (Smith y Griffin, 1970), con estos estudios se fundamenta la actividad de los rizomorfos de medio de cultivo después de tres semanas de ser aislados. La pigmentación o coloración puede deberse a la presencia de tres sustancias;

lacassa (Worral et al., 1986), melanina (Issac, 1995) p-difenol oxidasa (Smith y Griffin, 1970).

Existen diferencias entre los rizomorfos y los cordones miceliales producidos por otro hongo del suelo como *Phymatotrichopsis omnivora*, los primeros están altamente diferenciados, son autónomos y tienen crecimiento apical, mientras que los cordones miceliales son agregaciones de hifas no diferenciadas además, los rizomorfos se pueden desarrollar fuera de la base alimenticia o dentro del sustrato (suelo o medio de cultivo), característica que comparten con los cordones miceliales (Shaw y Kile, 1991, Issac, 1995; Téliz 2000).

## 5.4. CONCLUSIONES

Este trabajo describe por primera vez la morfología y crecimiento de los rizomorfos de *Armillaria* sp en árboles de aguacate y complementa la información para entender la biología y patogénesis de este hongo del suelo en un frutal cultivado.

El análisis histológico mostró las diferencias entre los rizomorfos originarios de campo y los de condiciones artificiales. Los dos presentan los mismos tejidos con el mismo tipo de células (células esclerenquimatosas o de protección), sin embargo en el caso de los cultivados en BDS, se observó tejido mucilaginoso que está constituido básicamente por las hifas del patógeno, esa es la diferencia más evidente. Además, en estos se observó que adquieren la misma coloración oscura una vez que emergen del medio y tienen contacto con la luz y el oxígeno. Las hifas adheridas a los rizomorfos inmersos en el medio, se degradan al cabo de tres semanas, cuando el rizomorfo tiene contacto con el oxígeno y empieza a adquirir la pigmentación oscura.



## 5.5. LITERATURA CITADA

- Aguín O., Mansilla P., Sainz M. J. 2001. A Fast Method for Production of *Armillaria* inoculum. *Mycologia* 93: 612-615.
- Berliner M. C., Duff R. H. 1965. Ultrastructure of *Armillaria mellea* hyphae. *Canadian Journal Botany*. 43: 171-172.
- Brefeld O. 1877. Botanische untersuchungen ber Schimmelpilze, Vol. III. Leipzig:Félix.
- Cannon P., N.B.K., Mee-Sook K., J.W y Alvarado R., D. 2007. An *Armillaria* survey in Mexico: A basis for determining evolutionary relationships, assessing potentially invasive pathogens, evaluating future impacts of climate change, and developing international collaborations in forest pathology. Western International Forest Disease Work Conference. 1-9.
- Hartig R. 1873. Vorlaufige Mitteilung fiber den Parasitismus von *Agaricus melleus* und dessen Rhizomorphen. *Bot. Zeit.* 31: 295-297.
- Hartig R. 1870, Das auftreten der rhizomorpha in Nadelhozkulturen. *Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen* 2: 359-361.
- Hartig R. 1874. Wichtige Krankheiten der Phytopathologie für Botaniker und Forstmänner. Berlin: Springer. 127 p. (Important Disease of Forest Trees. Contributions to mycology and phytopathology for botanist and foresters Phytopathological Classics No. 12; 1975. St Paul,MN: American Phytopathological Society.)
- Issac S. 1995. What are fungal cords, strands and rhizomorphs and how are they of benefit to the fungus?.*Mycology Answers* 9:90-91.

- López-Curto. M.L., Márquez-Guzmán J. y Murguía-Sánchez G. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México/Facultad de Ciencias, México, D.F. 178 p.p.
- Moore R. T. 1965. The ultrastructure of fungal cells. In G. C. Ainsworth and A. S. Sussman [ed.], The fungi. Vol. I. Academic Press, New York 95-118 p.
- Motta, J. J. 1969. Cytology and morphogenesis in the rhizomorph of *Armillaria mellea*. American Journal Botany 56: 610-619.
- Motta J.J., Cope P.D. 1982. Rhizomorph Cytology and Morphogenesis in *Armillaria tabescens*. Mycologia 74: 671-674.
- Smith A. M., Griffin D. M. 1970. Oxygen and the ecology of *Armillariella elegans* Helm. Australian Journal of Biological Science 24: 231-262.
- Snider, P. J. 1959. Stages in development of rhizomorphic thalli of *Armillaria mellea*. Mycologia 51: 693-707.
- Téliz D. 2000. El Aguacate y su Manejo Integrado. Ed Mundiprensa México, S.A. de C.V. 1a edición. 233 p.
- Townsend B. B. 1954. Morphology and development of fungal rhizomorphs. Brit. Mycological Society Transactions 37: 222-233.
- Worrall J.J., Chet I., Hüttermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. Journal of General Microbiology 132: 2527-2533.