



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

**ETIOLOGÍA, PATRÓN ESPACIO-TEMPORAL Y ANÁLISIS
FILOGENÉTICO DE *Armillaria* spp., EN ÁRBOLES DE
DURAZNO [*Prunus persica* (L.) Batsch.] EN EL SUR DEL
ESTADO DE MÉXICO**

RUBÉN DAMIÁN ELÍAS ROMÁN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis, titulada: **Etiología, patrón espacio-temporal y análisis filogenético de *Armillaria* spp., en árboles de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en el sur del Estado de México.** Realizada por el alumno: **Rubén Damián Elías Román**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. GUILLERMO CALDERÓN ZAVALA

ASESOR



DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES

ASESOR



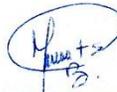
DR. REMIGIO ANASTACIO GUZMÁN PLAZOLA

ASESOR



DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA

ASESOR



DRA. MARÍA DE LA CRUZ ESPÍNDOLA BARQUERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2013

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo trabajador de México, principalmente a los productores de durazno del sur del Estado de México y al CONACYT

A la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S. C.

Al Colegio de Postgraduados, Posgrados de Fitosanidad-Fitopatología y Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura

Al Servicio Forestal del USDA. En especial a los investigadores del laboratorio de patología forestal de Moscow, Idaho, USA

Al Grupo Produce Estado de México A. C. por el apoyo financiero parcial de la presente investigación

A mi consejo particular y amigos por las asesorías

A todos muchas gracias

Etiología, patrón espacio-temporal y análisis filogenético de *Armillaria* spp., en árboles de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en el sur del Estado de México, México.

Rubén Damián Elías Román, Dr. e-mail: edamian@colpos.mx

Resumen

La pudrición de raíces por *Armillaria* es responsable de la mortalidad significativa de árboles de duraznos en plantaciones del Estado de México, México. En 15 huertas monitoreadas, el promedio en mortalidad de árboles fue 9.7, 15.3 y 20.3% y el área afectada fue 23.2, 24.7 y 28.3% durante 2009, 2010 y 2011, respectivamente. Los portainjertos empleados ('Nemaguard' y 'Criollo de la Goleta') en la región fueron susceptibles a la enfermedad. Las especies de *Armillaria* se identificaron mediante la secuenciación de dos regiones de ADN ribosomal (5.8S partial-ITS2-LSU D-dominios y 3' LSU parcial-IGS1) y el gen del factor de elongación-1 α (*tef-1 α*), las secuencias de ADN se compararon con las especies de *Armillaria* en el GenBank y se realizaron análisis filogenético. El análisis de 49 aislamientos reveló que cinco (10.2%) tuvieron una relación cercana con *A. mellea*, ocho (16.3%) con *A. gallica* y 36 no mostraron similitud cercana con secuencias de *Armillaria* en el GenBank; por lo tanto, estos son considerados como una especie no descrita, denominada en esta tesis como *A. mexicana*. La cual es morfológica y molecularmente diferente de las especies de *Armillaria* reportadas en América del Norte y Sur. La identificación precisa de las especies de *Armillaria* en las huertas de durazno de esta región es un primer paso en el desarrollo de prácticas de manejo

para esta enfermedad, como portainjertos resistentes. La inoculación artificial con semillas de encino (*Quercus* sp.) infectadas con *A. mexicana* (representada por el aislamiento MEX85) y *A. mellea* (representada por MEX100) en portainjertos establecidos en invernadero y campo, evidenció diferencias en severidad. Esto puede ser atribuido a variación en la patogenicidad y virulencia entre los aislamientos inoculados, también sugiere diferencias en resistencia de los portainjertos evaluados. Ambas especies infectaron a 'Nemaguard' y 'criollos de la Goleta' (portainjerto regional) en condiciones de invernadero. Durante el periodo de evaluación, la cepa de *A. mellea* no provocó infección en un ciruelo proveniente de viveros del estado de Veracruz, en ambas condiciones experimentales. El aislamiento de *A. mexicana* indujo valores altos de severidad en los portainjertos evaluados, siendo los más susceptibles 'Nemaguard' y segregantes de *Prunus mume*.

Palabras clave: Filogenia, identificación de especies, portainjertos, patogenicidad, enfermedades de raíz

Etiology, spatial-temporal patterns and phylogenetic analyses of *Armillaria* spp., in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.] trees in the south of the State of Mexico, Mexico.

Rubén Damián Elías Román, Dr. e-mail: edamian@colpos.mx

Abstract

Armillaria root disease is causing extensive mortality of peach trees within orchards in the State of Mexico, Mexico. Within 15 monitored orchards, average tree mortality was 9.7, 15.3, and 20.3% and disease-impacted area was 23.2, 24.7, and 28.3% during 2009, 2010, and 2011, respectively. Local rootstocks ('Nemaguard' and 'Criollo of La Goleta') used in the region were susceptible to the disease. Pathogenic *Armillaria* spp. were identified by DNA sequencing of two rDNA regions (partial 5.8S-ITS2-LSU D-domains and partial 3' LSU-IGS1) and the translation elongation factor-1 α (*tef-1 α*) gene, these ADN sequences were compared with *Armillaria* species on the GenBank accompanied by phylogenetic analyses. Analysis of 49 *Armillaria* isolates revealed that five isolates (10.2%) were a close match with *A. mellea*, eight isolates (16.3%) were a close match *A. gallica*, and 36 isolates (73.5%) showed no close similarity to *Armillaria* sequences in GenBank; therefore, these are described as a new species named in this thesis as *A. mexicana*. This species is morphological and phylogenetically distinct from other North and South American *Armillaria* spp. Accurate identification of *Armillaria* pathogens in peach orchards is a critical first step toward developing disease management practices, such as resistant rootstock. Artificial inoculation with infected oak (*Quercus* sp.) acorns with *A. mexicana*

(represented by MEX85) and *A. mellea* (represented by MEX100) on rootstocks in greenhouse and field conditions showed differences in severity. This may be the result of isolate's pathogenicity and virulence variations, also suggest differences in resistance among the rootstocks tested. In greenhouse conditions both *Armillaria* species inoculated infected to 'Nemaguard' and 'Criollo de Goleta' (a local rootstocks used in the region). During the evaluation period, the *A. mellea* isolate no induce infection in a plum from Veracruz State. The *A. mexicana* isolate induced the greatest severity values in all rootstocks tested, but 'Nemaguard' and *Prunus mume* seedlings were more susceptibility than others.

Keywords: Phylogeny, Species identification, rootstocks, pathogenicity, *Armillaria* root disease

CONTENIDO

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL-----	1
1.1 REVISIÓN DE LITERATURA-----	3
1.1.1 Patógenos de raíz en árboles de durazno-----	3
1.1.2 Otros organismos asociados con la muerte de árboles de durazno-----	3
1.1.3 Estrategias de manejo para <i>Armillaria</i> -----	4
1.1.4 Distribución espacial y temporal de la mortalidad de árboles causada por <i>Armillaria</i> spp.-----	9
1.1.5 LITERATURA CITADA-----	12

CAPÍTULO II

Incidencia y análisis filogenético de <i>Armillaria</i> spp., asociado a la pudrición de raíces del durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] en el Estado de México, México-----	18
Resumen-----	18
Abstract-----	19
2.1 INTRODUCCIÓN-----	20
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS-----	22
2.2.1 Área de estudio-----	22
2.2.2 Muestreo y aislamiento de <i>Armillaria</i> en huertas de durazno-----	23
2.2.3 Incidencia de la enfermedad-----	23
2.2.4 Amplificación y secuenciación de ADN-----	24

2.2.5 Comparación de secuencias de ADN y análisis filogenético-----	26
2.3 RESULTADOS-----	28
2.3.1 Detección de <i>Armillaria</i> spp., en árboles de durazno y aislamientos obtenidos-----	28
2.3.2 Incidencia de la enfermedad (%)-----	29
2.3.3 Análisis de secuencias de ADN-----	30
2.3.4 Análisis filogenético-----	32
2.4 DISCUSIÓN-----	36
2.5 LITERATURA CITADA-----	41
CAPÍTULO III	
<i>Armillaria mexicana</i> , una especie nueva de la región centro de México-----	63
Resumen-----	63
Abstract-----	63
INTRODUCCIÓN-----	64
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS-----	66
3.2.1 Aislamientos empleados-----	66
3.2.2 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN-----	66
3.2.3 Comparación de secuencias de ADN y análisis filogenético-----	67
3.2.4 Análisis morfológico de basidiomas-----	68
3.3 RESULTADOS-----	69
3.3.1 Análisis de las secuencias de ADN-----	69
3.3.2 Análisis filogenético-----	70

3.3.3	Taxonomía-----	71
3.3.4	Habitat-----	73
3.4	DISCUSIÓN-----	73
3.5	LITERATURA CITADA-----	77
CAPÍTULO IV		
	Patogenicidad de <i>Armillaria mexicana</i> y <i>A. mellea</i> en diferentes portainjertos de durazno-----	87
	Resumen-----	87
	Abstract-----	87
4.1	INTRODUCCIÓN-----	88
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS-----	89
4.2.1	Sitios Experimentales-----	89
4.2.2	Aislamientos empleados y preparación de inóculo-----	90
4.2.3	Material Vegetal-----	91
4.2.4	Ensayo de patogenicidad-----	91
4.2.5	Evaluación de resultados y variables evaluadas-----	92
4.3	RESULTADOS-----	95
4.3.1	Experimento en invernadero-----	95
4.3.2	Experimentos en sitios naturalmente infestados con <i>Armillaria</i> spp.---	96
4.4	DISCUSIÓN-----	98
4.6	LITERATURA CITADA-----	100
	CONCLUSIONES GENERALES-----	102

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Fig. 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de <i>Armillaria</i> spp., en el Estado de México, México-----	49
Fig. 2. Síntomas y signos de <i>Armillaria</i> spp., en árboles de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch]. (A-1) Árbol sano, (A-2) árbol sintomático y (A-3) árbol muerto (B) Basidiomas de <i>A. mellea</i> (C) Colonización micelial subcortical con patrón en abanico en raíz de durazno (D) Rizomorfo sobre una raíz de durazno y (E) Rizomorfos obtenidos por incubación en cámara húmeda a partir de un tallo y raíces infectadas de durazno-----	50
Fig. 3. Incidencia acumulada (%) asociada con la pudrición de raíces por <i>Armillaria</i> spp., en huertas de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] en tres municipios del Estado de México, México. (\pm error típico). Nota: únicamente las huertas 1, 4, 8, 10, 11 y 13 se evaluaron en el 2009-----	51
Fig. 4. Porcentaje acumulado de mortalidad observado del 2009 al 2011 en 15 huertas comerciales de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] en tres municipios del Estado de México. Nota: únicamente las huertas 1, 4, 8 10, 11 y 13 se evaluaron en 2009-----	52
Fig. 5. Porcentaje acumulado de área afectada asociado con la pudrición de raíces por <i>Armillaria</i> spp., del 2009 al 2011 en 15 huertas comerciales de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] en tres municipios del Estado de México, México. Nota: únicamente las huertas 1, 4, 8 10, 11 y 13 se evaluaron en 2009-----	52

Fig. 6. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 1, establecida en 2007, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México-----	53
Fig. 7. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 2, establecida en 2006, localizada en San Andrés, Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México-----	54
Fig. 8. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 3, establecida en 2001, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México-----	54
Fig. 9. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 4, establecida en 1997, localizada en Cochisquila, Coatepec Harinas, Estado de México, México-----	55
Fig. 10. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 5, establecida en 2006, localizada en San Andrés, Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México-----	55
Fig. 11. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 6, establecida en 2001, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México-----	56
Fig. 12. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 7, establecida en 2000, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México-----	56

Fig. 13. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch] número 8, establecida en 1991, localizada en Cochisquila, Coatepec Harinas, Estado de México, México-----	57
Fig. 14. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 9, establecida en 2002, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México-----	57
Fig. 15. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 10, establecida en 2002, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México-----	58
Fig. 16. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 11, establecida en 1999, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México-----	58
Fig. 17. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 12, establecida en 1996, localizada en Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México-----	59
Fig. 18. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 13, establecida en 1999, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México-----	59
Fig. 19. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 14, establecida en 2003, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México-----	60
Fig. 20. Huerta de durazno [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.] número 15, establecida en 2001, localizada en San Andrés, Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México-----	60

Fig. 21. Árbol bootstrap consenso por regla de mayoría de 50% generado de las secuencias de la subunidad grande del ribosoma (LSU: Dominios D1-D3 unidos con el extremo 3' de LSU). Los valores de soporte bootstrap y la probabilidad posterior se muestran arriba de los nodos. Los números de accesión del GenBank de los aislamientos de *Armillaria* spp., de México se muestran en el Cuadro 2. Los números de accesión e información de los aislamientos de las especies de USA y Canadá empleadas en este análisis fueron descritas por Kim *et al.* (2006)----- 61

Fig. 22. Árbol bootstrap consenso por regla de mayoría de 50% generado de las secuencias del factor de elongación (*tef-1 α*). Los valores de soporte bootstrap y la probabilidad posterior se muestran arriba de los nodos. Los números de accesión del GenBank de los aislamientos de *Armillaria* de México se muestran en el Cuadro 2. Los números de accesión e información de los aislamientos de las especies de USA y Canadá empleadas en este análisis fueron descritas por Ross-Davis *et al.* (2012)---- 62

CAPÍTULO III

Fig. 23. Árbol bootstrap consenso del 50% generado con el método Neighbour-Joining con las secuencias del factor de elongación (*tef-1 α*) de los aislamientos de *A. mexicana* y de otras secuencias del GenBank. Los valores de soporte bootstrap se muestran arriba de los nodos----- 83

Fig. 24. *Armillaria mexicana* asociada con la muerte de árboles en huertas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] del Estado de México, México: (A) Holotipo MEX88 basidiomas maduros, anillo membranoso con estrías (B) MEX85 basidiomas jóvenes, se aprecian los píleos umbonados de color café claro en el centro y café oscuro en el margen----- 84

Fig. 25. *Armillaria mexicana* holotipo MEX88: (A) Basidiosporas elípticas (B) Queilocistidio sin fíbula (C) Células del estípote sin fíbulas (D) Basidio sin fíbula. Rizomorfos de *Armillaria mexicana*, en medio de agar al 1.5% + extracto de malta al 2%: (E) MEX81 (F) MEX60----- 85

Fig. 26. *Armillaria mellea* MEX100: (A) Ontogenia del basidioma de *A. mellea*, con píleos hemisféricos de color amarillo en estadios juveniles y estípote atenuado en la base. (B) Anillo membranoso sin estrías. (C) Basidios sin fíbulas (D) Basidiosporas elípticas y Basidio clavado (E) Corte longitudinal de células sin fíbulas en el estípote----- 86

CAPÍTULO IV

Fig. 27. Escala de severidad (1 a 5) en plantas de *Prunus* spp., infectadas por *Armillaria*. Donde: 1= árbol sano. 2= árbol no sintomático, sin raíces muertas pero con una o más raíces que presentan colonización micelial por *Armillaria* con patrón en abanico. 3 (a,b)= árbol con o sin gomosis en el cuello, raíz primaria o secundarias muertas con presencia de micelio subcortical con patrón de abanico, presencia/ausencia de rizomorfos adheridos en raíces. 4 (a,b,c)= árbol con colonización micelial subcortical con patrón de abanico o xilema con necrosis a nivel del cuello o corona, una o más raíces infectadas con *Armillaria*, presencia/ausencia de rizomorfos adheridos a raíces, con o sin síntomas (gomosis, follaje clorótico). 5= árbol muerto.----- 94

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Mortalidad acumulada y área afectada acumulada asociadas con la pudrición de raíces por *Armillaria* spp., de 2009 a 2011 en 15 huertas comerciales de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] de tres municipios del Estado de México, México----- 47

Cuadro 2. Aislamientos de *Armillaria* spp., obtenidos de huertas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en Estado de México, México y empleados en el presente estudio----- 48

CAPÍTULO IV

Cuadro 3. Frecuencia de la severidad de dos especies de *Armillaria* en tres portainjertos para durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en condiciones de invernadero, 20 meses de la inoculación----- 96

Cuadro 4. Frecuencia de la severidad de *A. mexicana* en tres portainjertos para durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] establecidos en una huerta comercial naturalmente infestada en Coatepec Harinas, Estado de México, México----- 97

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México se cultivan alrededor de 45,000 ha de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] (SIAP, 2010), pero en los últimos años la superficie establecida con este frutal ha disminuido en varios estados de la República por diversas causas (COMEDURAZNO, comunicación personal, julio 13, 2012). Por ejemplo, debido a sequía, heladas recurrentes y granizadas en Zacatecas y Chihuahua; por cambio al cultivo del aguacate en Michoacán y por muerte de árboles debido a limitantes parasitarias en huertas del Estado de México y Morelos.

Los síntomas que manifiestan los árboles de durazno en Morelos y Estado de México consisten en follaje clorótico, gomosis en el tallo, muerte de árboles en manchones y son similares a los ocasionados por la pudrición de raíces por hongos patógenos (Browne y Mircetich, 1995; Cambra y Palazón, 2000; Tuset, 2000; Cox *et al.*, 2005). Aunque en varias partes del mundo han citado la pudrición de raíces por *Armillaria* spp., en huertas de frutales (Homer, 1992; Rizzo *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2005; Pertot *et al.*, 2008; Prodorutti *et al.*, 2009), los reportes de esta enfermedad en México son limitados. En Morelos, México, se asoció la presencia de *A. gallica* con la mortalidad de árboles de ciruelo (*Prunus salicina*) sobre portainjertos de duraznos (Alvarado-Rosales, 2007) y muerte de árboles de durazno cercana al 100%, atribuida a *Armillaria* sp. (Fucikovsky, 2009). En áreas cercanas al volcán de Paricutín, en Michoacán, México, algunos productores han abandonado huertos de durazno debido a la incidencia alta de *Armillaria* sp. (Coria-Avalos *et al.*, 2005). En el Estado de México las huertas tienen vida corta, aproximadamente 10 años, debido a la

presencia de árboles que manifiestan síntomas similares a los reportados por *Armillaria* spp. (Coria-Avalos *et al.*, 2005; Cox *et al.*, 2005). Sin embargo, la etiología, incidencia y distribución de la enfermedad no se han determinado previamente. Por esta razón los objetivos del presente trabajo fueron: i) Determinar la incidencia y el patrón de distribución de la muerte de árboles de durazno durante 2009 a 2011 en huertas de Coatepec Harinas, Temascaltepec y Almoloya de Alquisiras, Estado de México. ii) Identificar las especies de *Armillaria* asociadas con este problema. iii) Evaluar portainjertos para durazno que muestren algún grado de resistencia al principal agente causal de la muerte de árboles. iv) Generar las bases para un manejo integrado más eficiente de la muerte de árboles de durazno en esa región de México.

1.1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.1 Patógenos de raíz en árboles de durazno

Las enfermedades de la raíz y cuello de árboles de durazno pueden ser ocasionadas por hongos y pseudohongos, sobresaliendo *Phytophthora* spp. (Browne y Mircetich, 1995; Tuset, 2000), *Rosellinia necatrix* (López, 2000) y varias especies de *Armillaria*. En plantaciones de durazno en Georgia, Estados Unidos de América (EUA), la enfermedad es causada principalmente por *A. tabescens* y en menor grado por *A. mellea* (Schnabel *et al.*, 2005); en el estado de Morelos, México, se ha reportado *A. gallica* ocasionando mortalidad alta en plantas de ciruelo sobre portainjertos de durazno (Alvarado-Rosales, 2007). También, la pudrición de raíces en durazno puede ser causada por *Verticillium dahliae* (Cambra y Palazón, 2000) y *Phymatotrichum omnivorum* (pudrición texana) (Lyda, 1995), entre otros.

1.1.2 Otros organismos asociados con la muerte de árboles de durazno

En el sureste de EUA la muerte prematura del durazno (MPD) se ha relacionado a bajas temperaturas, canchros por *Pseudomonas syringae* y *Mesocriconema xenoplax* (Raski) Loof & de Grisse [= *Criconemoides xenoplax* (Raski) Loof & de Grissel] (Beckman y Nyczepir, 2004). En otro estudio, en huertas con problemas de muerte de árboles de durazno en Morelos, México, se identificó a *P. syringae* pv. *syringae* en el 96% de los huertos muestreados, pero *Mesocriconema xenoplax*, que predispone a los árboles a MPD y *Criconema mutabile*, asociado al complejo del cancro bacteriano fueron aislados en seis y cinco huertos respectivamente (Luna-Guerrero *et al.*, 2011). Estos autores concluyeron que aunque en esa región de México no son comunes los daños por heladas, prácticas de

manejo como la época de poda de fructificación pueden predisponer a los árboles a muerte prematura o cancro bacteriano.

1.1.3 Estrategias de Manejo para *Armillaria*

El manejo de las enfermedades de raíz de etiología fungosa y en particular de la pudrición de raíces por *Armillaria*, puede ser complicado debido a que los organismos involucrados pueden pervivir por décadas en el suelo o material orgánico en descomposición; además, producen estructuras de resistencia difíciles de eliminar con fungicidas, debido a que la mayoría de estos productos químicos no pueden penetrar los estratos más inferiores del suelo donde la fuente de inóculo está presente (West, 2000; Cox *et al.*, 2005). Otro factor que dificulta el manejo de enfermedades con origen en el suelo es que, por lo general, los síntomas aéreos son producidos cuando los patógenos ya han dañado gran parte del sistema radical y la recuperación de los árboles, generalmente es difícil (García-Espinosa, 2010). Adicionalmente, aún cuando la implementación de prácticas como rotación de cultivos puede tener relativa consistencia para algunas enfermedades con origen en el suelo, por ejemplo pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivora*) (Streets, 1937) esta tiene poco efecto en reducir el inóculo de *Armillaria* spp. (Cox y Scherm, 2006).

La adopción de algunas de las siguientes estrategias de manejo puede reducir la incidencia de pudrición de raíces por *Armillaria*:

1.1.3.1 Usar plantas certificada libre de patógenos

Es aconsejable el empleo de plantas de viveros certificados, que correspondan con la variedad recomendada para la región, con buena condición fitosanitaria y cultivados en sustrato libres o supresivos a organismos patógenos del suelo (Beckman, 2007; García-Espinosa, 2010).

1.1.3.2 Mejorar el drenaje del suelo para evitar exceso de humedad

En sitios con daños históricos por *Armillaria* se recomienda minimizar el agobio hídrico de los árboles como el causado por exceso de humedad en el suelo o del área cercana al cuello del árbol mediante surcos o montículos altos antes de establecer la huerta (Beckman, 2007).

1.1.3.3 Reducción de inóculo

Para replantar huertas de durazno y kiwi (*Actinidia deliciosa*) en un sitio con antecedentes de daños por *Armillaria* se recomienda la remoción de árboles muertos, subsoleo profundo, colecta y eliminación de raíces infectadas por extracción manual y quema (Homer, 1991; Cox *et al.*, 2005; Beckman, 2007). En huertas establecidas puede ser viable eliminar árboles sintomáticos y muertos por *Armillaria* spp., así como los árboles aparentemente sanos, potencialmente infectados, ubicados alrededor del centro de infección (Cox *et al.*, 2005).

1.1.3.4 Portainjertos para durazno tolerantes a *Armillaria*

El uso de especies menos susceptibles al ataque de *Armillaria* es otra opción que puede contemplarse. Sin embargo, estudios previos plantean la posibilidad de

variación en la virulencia dentro o en especies de *Armillaria* (Beckman *et al.*, 1998; Beckman y Pusey, 2001). Por lo anterior, es importante identificar a la especie principal de *Armillaria* presente en cada región, confirmar su patogenicidad y evaluar portainjertos en busca de tolerancia. Estudios realizados en huertas de durazno donde *A. tabescens* es la principal especie responsable de la mortalidad de árboles de durazno indicaron que una de las líneas de ciruelos derivados de materiales nativos de América del Norte es una fuente importante de resistencia a esta enfermedad (Beckman *et al.*, 1998) como el portainjerto 'Sharpe' (Beckman *et al.*, 2008).

1.1.3.5 Control químico

El control químico de *Armillaria* tiene severas limitantes relacionadas con la capacidad de los productos para alcanzar al inóculo que frecuentemente se encuentra situado a varios metros de profundidad o presente en el interior de restos de madera; además, el hongo puede sobrevivir por décadas dentro de tocones gruesos y los rizomorfos tienen la capacidad de crecer a través del suelo, lejos de la fuente original de inóculo (West, 2000). La aplicación de varios productos químicos ha mostrado reducir temporalmente la incidencia de *Armillaria* en algunas huertas de durazno del sureste de USA (Adaskaveg *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2005), pero ninguno de estos productos ha proporcionado un nivel de control adecuado que permita mantener la producción de durazno en huertas replantadas con antecedentes de esta enfermedad (Schnabel *et al.*, 2011); a estos problemas se agrega el alto costo de los productos y las regulaciones que involucran su empleo (Cox y Scherm, 2006).

1.1.3.6 Agentes de biocontrol

Trichoderma spp., pueden proteger a las plantas de enfermedades foliares y de otras enfermedades con origen en el suelo (Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004). Sin embargo, la aplicación bianual de *T. asperellum* y *T. gamsii* alrededor de los tallos de árboles de durazno durante tres años en huertas con alto nivel de inóculo de *A. tabescens* no redujeron la mortalidad de árboles por esta enfermedad (Schanabel *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos por Schanabel *et al.* (2011) pudieran estar relacionados con la dificultad que tiene este agente de biocontrol en alcanzar y penetrar los tejidos infectados por *Armillaria* que sirven como inóculo, o por una capacidad limitada de *Trichoderma* de mantenerse en el nivel poblacional necesario para control del hongo (Cox y Scherm, 2006). Por otra parte, Cox y Scherm (2006) indicaron que *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* y *Xylaria hypoxylon* causaron reacciones de interferencia sobre las hifas y micelio, así como reducción en el crecimiento de *Armillaria* dentro y sobre la corteza de *Populus* sp.; estos autores plantearon, con base en su relación antagónica con *Armillaria*, su empleo como agentes de biocontrol en huertas de durazno que contengan árboles sintomáticos o muertos por este hongo para disminuir la colonización del patógeno en el sistema de raíces y posterior dispersión de la enfermedad hacia árboles adyacentes.

1.1.3.7 Otras opciones culturales de manejo

La elevación de la corona o del cuello de los árboles de durazno sobre la superficie del suelo ha disminuido la mortalidad por *A. tabescens*, alcanzando valores de 0 y 10% de mortalidad a cinco años del establecimiento en dos huertas, en comparación con parcelas con árboles plantados normalmente (donde la ubicación

del cuello de las plantas con relación a la superficie del sustrato o suelo es aproximadamente la misma en los contenedores en vivero y los árboles en campo) que obtuvieron 30 y 70% de mortalidad (Schnabel *et al.*, 2012). Los resultados de este método en reducir la mortalidad de los árboles de durazno se relacionan a que el micelio de *A. tabescens* no avanza sobre el nivel del suelo en el tallo (Cox *et al.*, 2005), por lo anterior los árboles son plantados en campo aproximadamente 40 cm por encima de lo normal; empleando contenedores sin fondo, o de lo contrario, con bolsas rotas en la parte basal para permitir el crecimiento de las raíces hacia el suelo, después de unos ocho meses, se retira completamente el contenedor y expone la corona y raíces principales sobre el nivel del suelo, lo cual evita o disminuye la probabilidad que *Armillaria* infecte la corona del árbol y provoque la muerte de los árboles (Schnabel *et al.*, 2012).

En huertas donde los centros de infección de *Armillaria* están formados por pocos árboles se recomienda su aislamiento por medio de zanjas para evitar el contacto de raíces con árboles sanos (Homer, 1991). Sin embargo, este método puede resultar muy laborioso cuando los centros de infección son grandes (Cox y Scherm, 2006).

La aplicación de fungicidas en el suelo adyacente a los árboles infectados con un sistema radical ampliamente colonizado por *Armillaria* tuvo resultados poco promisorios en evitar la muerte de las plantas o erradicar el hongo; y aunque la inyección de fungicida dentro de árboles sintomáticos redujo la mortalidad durante dos años (Adaskaveg *et al.*, 1999), el empleo de estas dos prácticas es poco probable en huertas comerciales de durazno (Cox *et al.*, 2005; Cox y Scherm, 2006).

1.1.4 Distribución espacial y temporal de la mortalidad de árboles causada por *Armillaria* spp.

Varias especies del género *Armillaria* causan mortalidad de árboles en bosques nativos, plantaciones forestales y huertas frutales alrededor del mundo (Hood *et al.*, 1991). Esta enfermedad se manifiesta de manera discontinua, principalmente en sitios definidos en manchones o centros de infección compuestos de árboles muertos y sintomáticos; los cuales pueden abarcar tamaño y forma variable dependiendo del patrón de distribución de los residuos infectados por el hongo de plantaciones previas, edad del centro de infección, disponibilidad de fuentes de carbono, etc. (Kile, 1983; Hood *et al.*, 1991; Schmitt y Tatum, 2008). En el Parque Nacional de Malheur, Oregon, USA., se ha reportado un centro de infección que abarca 965.1 ha; causado por un genotipo de *A. solidipes* (= *A. ostoyae*) el cual se ha dispersado de árboles enfermos a sanos por rizomorfos y/o contacto de raíces infectadas (Schmitt y Tatum, 2008). Pero en otras regiones como los bosques nativos del centro de México y Zimbabue no es común la presencia de centros de infección masivos de *Armillaria* (Mwenje *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2007). Al respecto Kile *et al.* (1991) indicaron que la expresión de esta enfermedad, como ocurre con otras enfermedades de plantas, es influenciada por la patogenicidad de la especie de *Armillaria*, resistencia del hospedero y factores ambientales; pero la interacción de estos factores en condiciones de bosques nativos ha sido poco estudiada. Sin embargo, las epidemias por *Armillaria* pueden resultar cuando el balance entre patogenicidad y resistencia del hospedero es alterado por factores de estrés o perturbación del hábitat natural (Kile *et al.*, 1991).

En un estudio efectuado en peral (*Pyrus communis* y *P. betulaefolia*) en California, USA., la enfermedad se presentó en manchones y se aislaron de 4 a 5 genotipos de *A. mellea* por huerta (Rizzo *et al.*, 1998). Estos autores sugieren que previo al establecimiento de las huertas la enfermedad no se encontraba distribuida ampliamente en ese sitio; también indicaron que el número variable de genotipos aislados involucró la diseminación del hongo por basidiosporas y su posterior dispersión vía rizomorfos. En huertas de vid (*Vitis vinifera*), la mortalidad de plantas por *A. mellea* también mostró una distribución discontinua y la presencia de varios genotipos (Pertot *et al.*, 2008), donde cada uno inicialmente puede estar presente en un centro de infección individual pero pueden unirse con el tiempo con otro centro de infección vecino (Kile, 1983).

En plantaciones de coníferas se ha reportado que la mortalidad por *A. ostoyae* inició aproximadamente cinco años después de la plantación, cerca de tocones colonizados por el hongo de plantaciones previas; posteriormente, la enfermedad se incrementó anualmente en 1.0 % en una huerta y en 0.4% en otra; y los 35 años de su establecimiento alcanzaron una mortalidad de 30 y 11%, respectivamente (Morrinson, 2011). En otro estudio, la mortalidad de coníferas inició cerca de las fuentes de inóculo primario (tocones infectados presentes en el terreno antes de la plantación de la huerta), pero a partir del tercer año del establecimiento de la huerta, el inóculo secundario (árboles muertos recientemente o anualmente) llegó a ser la principal forma de inóculo de nuevas infecciones (Lung-Escarmant y Guyon, 2004).

El patrón espacial de mortalidad en las plantaciones forestales reportadas por Morrison (2011) y Lung-Escarmant y Guyon (2004) fue similar al observado por Homer (1992) en plantaciones de kiwi atribuido al ataque de *A. novae-zelandiae*, el

cual inició en más del 90% de las huertas, alrededor de residuos infectados de *Salix matsudana*; posteriormente, la enfermedad se dispersó a través de las huertas en un promedio de 4 m por año.

En plantaciones de frutales caducifolios (*P. persica* y *P. salicina*) en Zimbabue, África la infección por *Armillaria* sp., mostró incidencia alta y evidencia de diseminación principalmente hacia árboles adyacentes sobre las hileras; en contraste, en bosques nativos la mortalidad por esta enfermedad se observó comúnmente en árboles aislados (Mwenje *et al.*, 1998). Estos mismos autores indicaron que la incidencia asociada con *Armillaria* sp. en un huerto de durazno (1.5 ha) de 20 años de edad fue del 60% y en una de ciruelo (2.0 ha) entre 15-20 años de establecida fue del 80% de incidencia. Por otra parte, Beckman (2007) y Cox *et al.* (2005) señalaron que en huertas de durazno del sureste de USA la mortalidad por *A. tabescens* se extiende entre plantas por contacto de raíces; desde un sitio inicial en las hileras y posteriormente a hileras adyacentes.

En huertas de ciruelo sobre portainjertos de durazno en Morelos, México, Alvarado-Rosales (2007) reportó que la mortalidad de árboles atribuido a *A. gallica* tuvo un patrón espacial similar al reportado para *Armillaria* spp., (Homer, 1992; Mwenje *et al.*, 1998; Beckman, 2007). Otros estudios relacionados con *Armillaria* sp., en huertas de durazno en México muestran mortalidad cercana al 100% de los árboles (Coria-Avalos *et al.*, 2005; Fucikovsky, 2009).

1.1.5 LITERATURA CITADA

- Adaskaveg, J. E., H. Förster, L. Wade, D. F. Thompson, and J. H. Connell. 1999. Efficacy of sodium tetrathiocarbonate and propiconazole in managing *Armillaria* root rot of almond on peach rootstock. *Plant Disease* 83: 240-246.
- Alvarado-Rosales, D. 2007. Pudrición de raíz por *Armillaria*/ *Armillaria* root rot. *Armillaria* (Fr.) Staude. (Agaricales, Marasmiaceae). *In*: Cibrián-Tovar., D., D. Alvarado y S. E. García D. (eds). *Enfermedades Forestales en México*. Mundi-Prensa. UACH, Chapingo, México. pp: 211-215.
- Beckman, T.G., W.R. Okie, A.P. Nyczepir, P.L. Pusey, and C.C. Reilly. 1998. Relative susceptibility of peach and plum germoplasm to *Armillaria* root rot. *HortScience* 33: 1062-1065.
- Beckman, 2001. Field testing peach rootstocks for resistance to *Armillaria* root rot. *HortScience* 36: 101-103.
- Beckman, T. G., and A. P. Nyczepir. 2004. Peach tree shortlife. *In*: Horton, D., and D. Johnson (eds). *Southeastern Peach Growers Handbook*. University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences. Cooperative Extension Service, Athens. pp: 199-205.
- Beckman, T.G. 2007. Manejo de la muerte prematura y pudrición de raíz causada por *Armillaria* en huertos de durazno. *In*: Rodríguez Alcázar, R., R. D. Elías R., S. Pérez G., M. R. Fernández M., G. Reyes J. (eds). *Memoria de conferencias del III Congreso Nacional del Sistema Producto Durazno, 6-8 de diciembre 2007, Ixtapan de la Sal, México*. pp: 28-41.

- Beckman, T. G., J. X. Chaparro, and W. B. Sherman. 2008. 'Sharpe', a clonal plum rootstock for peach. *HortScience* 43: 2236-2237.
- Browne, G. T., and S. M. Mircetich. 1995. Phytophthora root and crown rots. *In*: Ogawa, J.M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, J. K. Uyemoto (eds). *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press. pp: 38-40.
- Cambra, M. y C. Palazón. 2000. Podredumbre blanca de la raíz causada por *Armillaria mellea*. *In*: E. Montesinos, P. Melgarejo, M. Cambra y J. Pinochet (Eds). *Enfermedades de los Frutales de Pepita y de Hueso*. Mundi-Prensa, España. pp:81-84.
- Cannon, P., N. B. Klopfenstein, M.-S. Kim, J. W. Hanna, R. Medel y D. Alvarado R. 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. *In*: McWilliams, M., P. Palacios (comps). *Proceedings of the 55th Western International Forest Disease Work Conference*. Sedona, AZ, USA. Salem, OR, USA: Oregon Dept. of Forestry. Octubre 15-19, 2007. pp: 28-39.
- Coria-Avalos, V.M., J. L. Morales G. y J. J. Alcántar R. 2005. Enfermedades del durazno *Prunus persica* (L.) Batsch. en Michoacán. Toledo-Bustos, R. (ed). *Campo Experimental Uruapan*. CIRPAC. INIFAP. México. 22p.
- Cox, K., H. Scherm, and T. Beckman. 2005. *Armillaria* root and crown rot. *In*: Horton, D. y D. Johnson (eds). *Southeastern Peach Growers Handbook*. Athens, GA, USA: Cooperative Extension Service, University of Georgia. pp: 162-166.

- Cox, K.D., and H. Scherm. 2006. Interaction dynamics between saprobic lignicolous fungi and *Armillaria* in controlled environments: Exploring the potential for competitive exclusion of *Armillaria* on peach. *Biological Control* 37: 291–300.
- Fucikovsky, 2009. El problema de *Armillaria* en durazno. *In*: Equihua-Martinez, A., E. Estrada V., J. A. Acuña S. y M. P. Cháirez G. (eds). Memoria del XV simposium nacional de parasitología forestal. Oaxaca, Oaxaca. pp: 229. www.uaeh.edu.mx/sistema_investigacion/funciones/bajarArchivo_web.php?producto=2951&archivo=8.pdf. (consulta, 7 marzo de 2013).
- García-Espinosa, R. 2010. Agroecología y Enfermedades de la Raíz en cultivos agrícolas. Colegio de Postgraduados. México, D.F. 130 p.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Vieterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Hood, I. A., D. B. Redfern, and G. Kile, G. 1991. *Armillaria* in planted host. *In*: Shaw, C. G., and G. A. Kile (eds). *Armillaria Root Disease*. USDA Agricultural Handbook No 691, Washington DC, USA. pp: 122-149.
- Homer, I.J. 1992. Epidemiology of *Armillaria* root rot of Kiwifruit. *Acta Horticulturae (ISHS)* 297: 573-578.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current Concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.

- Kile, G. A. 1983. *Armillaria* Root Rot in Eucalypt Forests: Aggravated Endemic Disease. *Pacific Science* 37: 459-464.
- Kile, G. A., G. I. McDonald, and J. W. Byler. 1991. Ecology and disease in natural forest. *In*: Shaw, C. G., and G. A. Kile (eds). *Armillaria* Root Disease. USDA Agricultural Handbook No 691, Washington DC, USA. pp: 102-121.
- López H., C. 2000. Podredumbre blanca de la raíz causada por *Rosellinia necatrix*. *In*: Montesinos, P. Melgarejo, M. Cambra y J. Pinichet (eds). *Enfermedades de los Frutales de Pepita y de Hueso*. Mundi-Prensa, España. pp: 79-81.
- Luna-Guerrero, A. Y., R. Montes B., M. F. Talavera R., H. E. Flores M. y L. Bravo L. 2011. Estudio preliminar de los factores bióticos y abióticos asociados a la muerte del duraznero en el Estado de Morelos, México. *Nematropica* 41: 254-262.
- Lung-Escarmant, B., and D. Guyon. 2004. Temporal and spatial dynamics of primary and secondary infection by *Armillaria ostoyae* in a *Pinus pinaster* plantation. *Phytopathology* 94: 125-131.
- Lyda, S. D. 1995. Phymatotrichum root rot. *In*: Ogawa, J.M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, and J. K. Uyemoto (eds). *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press. pp:41-42.
- Morrinson, 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., J. P. Ride, and R. B. Pearce. 1998. Distribution of Zimbabwean *Armillaria* groups and their pathogenicity on cassava. *Plant Pathology* 47: 623-634.

- Pertot, I., D. Gobbin, F. De Luca, and D. Prodorutti. 2008. Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. *Crop Protection* 27: 1061-1070.
- Prodorutti, D., T. Vanblaere, D. Gobbin, A. Pellegrini, C. Gessler, and I. Pertot. 2009. Genetic diversity of *Armillaria* spp. infecting highbush blueberry in northern Italy (Trentino region). *Phytopathology* 99: 651-658.
- Rizzo, D.M., E. C. Whiting, and R. B. Elkins. 1998. Spatial distribution of *Armillaria mellea* in pear orchards. *Plant Disease* 82: 1226-1231.
- Schmitt, C. L., and M. L. Tatum. 2008. The Malheur National Forest location of the world's largest living organism [The humongous fungus]. USDA Forest Service, Pacific Northwest Region. 8p.
- SIAP, 2010. Cierre de la producción por cultivo. SAGARPA. www.siap.gob.mx/index.php/agricultura/produccion-anual/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo.html. (consulta 27 junio de 2012).
- Schnabel, G., J. S. Ash, and P. K. Bryson. 2005. Identification and characterization of *Armillaria tabescens* from the southeastern United States. *Mycological Research* 109: 1208-1222.
- Schnabel, G., A. P. Rollins, and G. W. Henderson. 2011. Field evaluation of *Trichoderma* spp. for control of *Armillaria* root rot of peach. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2011-1129-01-RS.

Schnabel, G., P. Agudelo, G. W. Henderson, and P. A. Rollins. 2012. Aboveground root collar excavation of peach trees for *Armillaria* root rot management. *Plant Disease* 96: 681-686.

Streets, R.B. 1937. *Phymatotrichum* (Cotton or Texas) root rot in Arizona. *Ariz. Agric. Exp. Stn. Technical Bulletin* 71: 299-410.

Tuset, J. 2000. Podredumbres del cuello y de la raíz causadas por *Phytophthora* spp. *In: Montesinos, E., P. Melgarejo, M. Cambra y J. Pinochet (eds). Enfermedades de los Frutales de Pepita y de Hueso. Mundi-Prensa, España. pp: 77-78.*

West, J. 2000. Chemical control of *Armillaria*. *In: Fox, R. T. V. (ed). Armillaria Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus. Intercept. U. K. pp: 173-182.*

CAPÍTULO II

Incidencia y análisis filogenético de *Armillaria* spp., asociado a la pudrición de raíces del durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en el Estado de México, México.

Resumen

Se determinó la incidencia de mortalidad de árboles de durazno atribuida a la pudrición de raíces por *Armillaria* durante 2009 a 2011, en 15 huertas en el Estado de México, México. La incidencia se incrementó anualmente y alcanzó valores promedio de 9.7, 15.3 y 20.3% en mortalidad de árboles y de 23.2, 24.7 y 28.3% en área afectada, durante 2009, 2010 y 2011 respectivamente. Los cultivares 'Nemaguard' y 'Criollo de La Goleta', empleados en la región, fueron susceptibles a la enfermedad. Para identificar las especies de *Armillaria* aisladas de los árboles de durazno infectados, dos regiones de ADN ribosomal nuclear (5.8S parcial-ITS2-LSU dominios-D y el extremo 3' LSU-IGS) y el gen del factor de elongación-1 (*tef-1 α*) fueron secuenciadas y comparadas con secuencias de especies de *Armillaria* conocidas. Los análisis de 49 aislamientos de *Armillaria* revelaron que cinco aislamientos (10.2%) tuvieron una relación cercana con *A. mellea* y ocho (16.3%) con *A. gallica*. Las secuencias de ADN de los 36 aislamientos remanentes (73.5%) no mostraron similitud cercana con las de *Armillaria* en el GenBank, por lo que posiblemente representa una especie de *Armillaria* no descrita que fue la más ampliamente distribuida en la región de estudio. Los análisis filogenéticos separados de la región de LSU (dominios D1-D3 unidos con el extremo 3' de LSU) y *tef-1 α*

mostraron que la especie no descrita es distinta de otras *Armillaria* spp. reportadas en América del Norte.

Abstract

Incidence of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] tree mortality attributed to *Armillaria* root disease was assessed from 2009 to 2011 in 15 orchards in the State of Mexico, Mexico. Incidence increased gradually every year of assessment, reaching average values of 9.7, 15.3, and 20.3% in tree mortality and 23.2, 24.7, and 28.3% of disease-impacted area of the orchards during 2009, 2010, and 2011, respectively. The cultivars 'Nemaguard' and 'Criollo of La Goleta', used as rootstocks in the region, were susceptible to the disease. To identify species of *Armillaria* isolated from infected peach trees, two nuclear rDNA regions (partial 5.8S-ITS2-LSU D-domains and partial 3' LSU-IGS1) and translation elongation factor-1 α (*tef-1 α*) gene were sequenced and compared with sequences of known *Armillaria* species. DNA sequence analysis from 49 *Armillaria* isolates revealed that five isolates (10.2%) were a close match with *A. mellea* and eight isolates (16.3%) were a close match with *A. gallica*. DNA sequences from the remaining 36 isolates (73.5%) showed no close similarity to *Armillaria* sequences in GenBank, and apparently represent an undescribed *Armillaria* species. This undescribed species was the most widely distributed in the region of study. Separate phylogenetic analyses of the LSU region (D1-D3 domains concatenated with the partial 3' end) and *tef-1 α* region show that the undescribed species is quite distinct from other *Armillaria* spp., reported in North America.

2.1 INTRODUCCIÓN

En México, el durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] es cultivado en aproximadamente 45,000 ha, principalmente en Michoacán, Estado de México, Morelos y Puebla; los cuales aportan el 65% de la producción nacional (SIAP, 2010). Las huertas de durazno en estos estados han sido establecidas predominantemente en áreas deforestadas. En el Estado de México, muchas huertas presentan árboles muertos y moribundos, los síntomas iniciales de la enfermedad incluyen hojas cloróticas, gomosis en el tronco y grupos de árboles muertos. La incidencia y el patrón de dispersión de esta enfermedad, o posibles agentes causales no han sido reportados previamente. Síntomas similares han sido asociados con la pudrición de raíces causada por diferentes especies de *Armillaria* en kiwi (*Actinidia deliciosa*), peral (*Pyrus communis* y *P. betulaefolia*), durazno, vid (*Vitis vinifera*), arándano (*Vaccinium corymbosum*) cultivados en diversas regiones del mundo como Nueva Zelanda, Estados Unidos de América del Norte (USA) e Italia (Homer, 1992; Rizzo *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2005; Pertot *et al.*, 2008; Prodorutti *et al.*, 2009). En huertas de durazno, en Georgia, USA, la enfermedad es causada principalmente por *A. tabescens* y en menor grado por *A. mellea* (Schnabel *et al.*, 2005). En Michigan, la muerte de árboles de cerezo (*Prunus cerasus*) y durazno fue asociada con *A. solidipes* (reportada previamente como *A. ostoyae*) y en menor grado por *A. mellea* (Proffer *et al.*, 1987). Estas especies de *Armillaria* se han reportado en árboles forestales en varias regiones de México. En Chihuahua, México, la presencia de *A. solidipes* se asoció con la mortalidad de *Pseudotsuga menziesii* y *Abies durangensis* (Shaw, 1989). Al este del Estado de México y noreste de Morelos, *A. gallica* se

identificó en pino (*Pinus* spp.) y encino (*Quercus* spp.), mientras que *A. mellea* ha sido detectada en bosques de pino-encino al noroeste de Veracruz (Alvarado-Rosales y Blanchette, 1994). También, *A. tabescens* fue reportada en araucaria (*Araucaria araucana*) en Veracruz (Kim *et al.*, 2010).

En un estudio previo, basado en el concepto de especie biológica, la identificación de *Armillaria* spp., de árboles forestales del centro de México mostró que algunos aislamientos del estado de Puebla fueron incompatibles con cultivos derivados de basidiosporas de *A. mellea*, *A. tabescens*, *A. solipides*, *A. gallica* y *A. cepistipes* (Alvarado-Rosales y Blanchette, 1994; Alvarado-Rosales, 2007). Estas pruebas de incompatibilidad plantean la posibilidad que al menos una de las especies de *Armillaria* encontradas en México es diferente de las previamente mencionadas. Aunque *A. gallica* ha sido asociada con la mortalidad de ciruelos (*Prunus salicina*) injertados sobre portainjertos de durazno en el estado de Morelos (Alvarado-Rosales, 2007), la distribución e identificación de especies de *Armillaria* no se ha determinado en gran parte de las huertas de frutales en México.

Debido a que la patogenicidad varía ampliamente entre las diferentes especies de *Armillaria*, es de importancia la identificación precisa para implementar estrategias efectivas de manejo (Ross-Davis *et al.*, 2012). Sin embargo, *Armillaria* spp., comúnmente se encuentran en estado vegetativo ya que los basidiomas son formados esporádicamente. Incluso, si estos son encontrados, los de especies relacionadas estrechamente pueden ser difícil de distinguir basándose en su morfología (Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012). Las técnicas moleculares que se basan en diferentes regiones de ADN ribosomal, como el espacio transcrito interno (ITS), espacio intergénico (IGS), subunidad grande

(LSU) del ribosoma (rDNA) (Anderson y Stasovski, 1992; Kim *et al.*, 2006), o el gen del factor de elongación 1 alfa (*tef-1 α*) (Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012), han demostrado utilidad para validar la identificación de especies de *Armillaria* de América del Norte.

Con el propósito de generar una estrategia de manejo para la pudrición de raíces por *Armillaria* en huertas de durazno del Estado México, se plantearon los siguientes objetivos: 1) Determinar la incidencia de mortalidad en árboles de durazno de 15 huertas del sur del Estado de México durante 2009 a 2011. 2) Identificar el complejo de *Armillaria* spp., asociadas con la enfermedad mediante la obtención de secuencias de ADN nuclear de diferentes regiones (5.8 parcial-ITS2-LSU dominios D1-D3 y el extremo 3' de LSU-IGS1) y el gen *tef-1 α* de aislamientos representativos para su comparación con las secuencias depositadas en el GenBank y análisis filogenético.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio

Huertas de durazno en Coatepec Harinas, Temascaltepec y Almoloya de Alquisiras, que constituyen la principal región productora de este frutal en el Estado de México, se emplearon como sitios de estudio (Fig. 1). Se seleccionaron 19 huertas (0.2-1.7 ha) con presencia de árboles muertos. Se registró el año de establecimiento de la plantación y tipo de portainjerto (Cuadro 1).

2.2.2 Muestreo y aislamiento de *Armillaria* en huertas de durazno

Se revisó el tejido subcortical de la base de los tallos (corona o cuello) y raíces secundarias de al menos el 50% de los árboles dentro de manchones de plantas muertas y sintomáticas en cada huerta en busca de signos de *Armillaria* (basidiocarpos, rizomorfos y colonización micelial con patrón en abanico; Fig. 2). El hongo fue aislado de raíces infectadas y de rizomorfos mediante el procedimiento descrito por Harrington *et al.* (1992) en medio de cultivo BDS (Benomyl-Dicloran-Estreptomicina; Worrall, 1991) e incubados en oscuridad por 3-5 semanas a 20 a 26°C.

2.2.3 Incidencia de la enfermedad

Se realizaron las siguientes acciones: i) Durante junio-julio (periodo lluvioso) de 2009, 2010 y 2011, se censó la incidencia de árboles muertos y sintomáticos por huerto. La severidad fue medida con una escala similar a la reportada por Amiri y Schnabel (2012), con categorías modificadas de 1 a 3, donde, 1= árbol sano; 2= árbol sintomático con follaje clorótico y gomosis en la base del tallo; 3= árbol muerto. ii) Se estimó el porcentaje de área afectada en cada huerta empleando el número y ubicación (UTM, WGS-84, zona 14N), obtenidas mediante un receptor GPS eTrex[®] (Garmin International Inc., Olathe, KS, USA) de árboles afectados durante 2009, 2010 y 2011. La ubicación se codificó en un archivo *shapefile* tipo puntos, con los atributos de severidad asociados a cada árbol, empleando ArcGis[®] (ver. 9.3; Environmental Systems Research Institute, Inc., Olathe, KS, USA). Para estimar la superficie afectada, en la capa vectorial generada se trazó un área buffer alrededor

del punto correspondiente a cada árbol o conjunto de árboles afectados. El ancho de buffers fue definido como la distancia promedio entre plantas en cada huerto. Una vez generados, se estimó la proporción de área afectada por la enfermedad en cada huerta. En 2009 se registró la mortalidad y superficie afectada en seis huertas, pero en 2010 y 2011 se amplió la evaluación en 13 huertas adicionales; sumando un total de 19 huertas evaluadas.

2.2.4 Amplificación y secuenciación de ADN

Para la extracción de ADN, los aislamientos de *Armillaria* fueron subcultivados sobre filtros de nylon estériles sobrepuestos en medio malta-agar al 3% (3% extracto de malta, 3% dextrosa, 1.0% peptona, 1.5% agar) en cajas Petri mantenidas en oscuridad aproximadamente a 22°C por tres semanas. Posteriormente, el micelio se colectó por raspado del papel filtro y molió en una solución buffer utilizando un FastPrep[®]. El ADN se purificó empleando DNeasy Plant Mini Kit[®] (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo protocolo del fabricante. La cantidad y calidad del ADN fue verificado con un espectrofotómetro NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). La mezcla de reacción para la PCR contuvo aproximadamente 100 ng de ADN template, 2.5 U Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), buffer de reacción, 4 mM de MgCl₂, 200 μM dNTPs y 0.5 μM de cada primer en un volumen total de 50 μl.

La amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 (en lo sucesivo denominado ITS), 5.8S parcial-ITS2-LSU parcial que abarcó los dominios o regiones D1-D3 (en lo sucesivo denominado 5.8-ITS2-LSU) y extremo 3' de LSU-IGS1 se realizó mediante

los protocolos de Kim *et al.* (2006). Para la región ITS, se emplearon los primers ITS-1F e ITS-4 (White *et al.*, 1990; Gardes y Bruns, 1993) y condiciones de PCR de 94 °C por 2 min 30 s, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min y 72 °C por 1 min 30 s, finalmente 72 °C por 10 min. Para la amplificación de 5.8S-ITS2-LSU se emplearon los iniciadores 5.8SR y LR7 (Montalvo *et al.*, 2000) y condiciones de PCR de 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 2 min y finalmente 72 °C por 5 min. Para la amplificación de la región que abarca el extremo 3' de LSU - IGS1, se emplearon los primers LR12R y O-1 (Veldman *et al.*, 1981; Duchesne y Anderson, 1990) y condiciones de PCR de 95 °C por 1 min 30 s, 35 ciclos de 95 °C por 1 min 30 s, 60 °C por 40 s y 72 °C por 2 min y finalmente 72 °C por 10 min. La amplificación de *tef-1α* se realizó mediante el protocolo indicado por Ross-Davis *et al.* (2012) pero los primers fueron reemplazados por ARMEF-F3A (5' CGT GAY TTY ATC AAG AAC ATG 3') y ARMEF-R (5' TAC CCG TTC GGC GAT CAA TCT 3') diseñados por J.W. Hanna (USDA Forest Service, RMRS) y condiciones de PCR de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 57 °C por 30 s y 72°C por 1 min y 30 s; finalmente 72 °C por 7 min.

Las secuencias se determinaron en dos direcciones con un equipo ABI Prism[®] 3700 DNA Sequencer en el Biotechnology Center de la Universidad de Wisconsin, (Madison, WI, USA). Los mismos primers empleados para la amplificación inicial de ITS, extremo 3' de LSU-IGS1 y *tef-1α* fueron utilizados para secuenciación, mientras que los iniciadores LR0R, LR15 y LR5 (Montalvo *et al.*, 2000) se emplearon para secuenciar la región 5.8S-ITS2-LSU.

2.2.5 Comparación de secuencias de ADN y análisis filogenético

Las secuencias se editaron y alinearon manualmente con Bioedit[®] (ver. 7.1.3; Ibis Biosciences, Inc., Carlsbad, CA, USA; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Los sitios polimórficos se codificaron empleando los códigos de la IUPAC para nucleótidos ambiguos. Las secuencias de 5.8S-ITS2-LSU, extremo 3' de LSU-IGS1 y *tef-1 α* de aislamientos de *Armillaria* spp. obtenidos de árboles de durazno infectados en el Estado de México se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante búsqueda de nucleótidos con BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para los análisis filogenéticos, se emplearon las secuencias de varias regiones (extremo 3' de LSU, IGS1 y *tef-1 α*) de las diez especies de *Armillaria* previamente reportadas en América del Norte (Kim *et al.*, 2006; Ross-Davis *et al.*, 2012), adecuadamente caracterizadas y con similitud potencial con los aislamientos de *Armillaria* del Estado de México.

Las secuencias de las regiones LSU (dominios D1-D3 concatenado con el extremo 3' de LSU) y el *tef-1 α* se analizaron con el método de Máxima Parsimonia en el programa Phylogenetic Analysis Using Parsimony, PAUP* (ver. 4.0b10; Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA) e inferencia Bayesiana usando el programa MrBayes (ver. 3.1.2; Huelsenbeck y Ronquist, 2007). En ambos análisis se incorporaron los eventos de inserción o pérdida de nucleótidos (gaps) usando el

método simple de codificación propuesto por Simmons y Ochoterena (2000), implementado en el software SeqState[®] (ver. 1.4.1; Müller, 2005).

Los análisis de Máxima parsimonia para LSU y *tef-1 α* fueron realizados con los siguientes ajustes: búsqueda heurística, MaxTrees (número de árboles almacenados) con aumento automático. Se aplicó el método bootstrap, también con búsqueda heurística y 1000 repeticiones, y el procedimiento TBR (tree-bisection-reconnection). Los árboles de partida fueron obtenidos usando stepwise con la adición aleatoria de 10 secuencias.

Para el análisis Bayesiano, de las regiones LSU y *tef-1 α* , se eligió el mejor modelo de sustitución nucleotídica basado en el criterio AIC (Akaike Information Criterion) obtenidos mediante el programa JmodelTest (ver. 0.1.1; Posada, 2008). Para LSU, JmodelTest seleccionó el modelo GTR+G (nst=6 rates=gamma; Rodriguez *et al.*, 1990) y para *tef-1 α* el modelo GTR+I+G (nst=6; Rodriguez *et al.*, 1990). El modelo F81-like (nst=1; Felsenstein, 1981) se asignó a los caracteres binarios que representan las pérdidas/inserciones de nucleótidos dentro de cada alineamiento de ambos análisis (LSU e *tef-1 α*).

Para ambas regiones (LSU y *tef-1 α*), se analizaron cuatro cadenas con 3×10^6 generaciones y generaron dos archivos con 30,001 árboles; los primeros 7,500 de cada archivo se descartaron mediante la opción “burnin” y el resto (45,002) se analizaron en PAUP* (Swofford, 2002) para elaborar el árbol de consenso estricto por regla de mayoría del 75% para LSU y *tef-1 α* .

Los análisis filogenéticos para las regiones ITS e IGS1 se iniciaron pero no pudieron completarse debido a alineamientos ambiguos (ver Resultados y Discusión).

Para LSU se utilizó como especie fuera de grupo a *Flamulina velutides* (número de accesoión en el GenBank HQ660197) y para la región del *tef-1α* a *Pleurotus ostreatus* (AY883432), basándose en la similaridad con secuencias de *A. tabescens*.

Las secuencias editadas de 5.8S-ITS2-LSU dominios-D, extremo 3' de LSU-IGS1 y *tef-1α* fueron depositadas en el GenBank (Cuadro 2), y las de LSU (dominios D1-D3 concatenados con el extremo 3' de LSU) y *tef-1α* empleadas para generar el árbol bootstrap consenso por regla de mayoría de 50% se depositaron en TreeBase (www.trebase.org; estudio número 13552).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Detección de *Armillaria* spp., en árboles de durazno y aislamientos obtenidos

En 15 (78.9%) de las 19 huertas de durazno evaluadas se observaron síntomas y signos típicos de *Armillaria* (Fig. 2) y se obtuvieron 49 aislamientos. La mortalidad y área afectada asociadas a pudrición de raíces por *Armillaria* spp., se presentan en el Cuadro 1.

2.3.2 Incidencia de la enfermedad (%)

La muerte de árboles se asoció con la presencia de *Armillaria* spp., en la mayoría de los árboles evaluados (Fig. 2). La incidencia se incrementó anualmente durante 2009-2011 y alcanzó valores máximos promedio de 20.3% en mortalidad y de 28.3% en área afectada (Fig. 3). En cada huerta, la mortalidad se incrementó gradualmente durante el periodo de evaluación (Fig. 4).

La mortalidad acumulada tuvo una variación amplia anual; en 2011, fluctuó del 3.1-59.2% (Cuadro 1; Fig. 4). Las huertas # 1, 2 y 5, con árboles menores de cinco años de edad tuvieron mortalidad más baja que las huertas con árboles mayores de ocho años (denominadas huertas # 7 a 15). En 2011, la mortalidad acumulada en huertas de durazno de 4 a 5 años de edad fue en promedio del 5%; en cambio, nueve huertas con más de siete años de establecidas promediaron el 30.1%. Sin embargo, la tendencia en mortalidad por huerta respecto a la fecha de plantación fue inconsistente. Por ejemplo, las huertas # 3, 4 y 6 con más de diez años de edad, tuvieron un valor promedio en esta variable de 6.4% en 2011, similar al 5.0% de las huertas de 4 a 5 años de edad.

La enfermedad afectó árboles establecidos sobre 'Nemaguard' y duraznos 'Criollos' regionales, que constituyen los únicos portainjertos empleados en el Estado de México. Durante 2009, 2010 y 2011 la mortalidad en huertas plantadas con 'Nemaguard' alcanzó valores promedio del 12.9, 13.9 y 18.9%, respectivamente; y en huertos con portainjertos 'Criollos' regionales fue del 8.1, 16.5 y 21.6% (Cuadro 1). En el periodo 2009-2011, la mortalidad alcanzó valores promedio de 15.4% y 15.2% en huertas con los portainjertos 'Criollo' y 'Nemaguard', respectivamente.

En 2011, el área ocupada por árboles afectados en 15 huertas fue del 6.9-65.7% (Cuadro 1; Fig. 5). La enfermedad se presentó en grupos de árboles en manchones localizados dentro o en orillas de los huertos; en cada periodo de evaluación se expandió y aparecieron nuevos árboles muertos y sintomáticos en la periferia de los registrados en años anteriores (Figs. 6-20).

2.3.3 Análisis de secuencias de ADN

Con base en el alineamiento de 49 secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1, se detectaron tres grupos distintos (Cuadro 2). El primero (Grupo 1) estuvo constituido por cinco aislamientos (10.2%) obtenidos de las huertas # 10 y 11 en Coatepec Harinas. Las secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1 de los aislamientos del Grupo 1 (representados por MEX72, MEX74 y MEX100) fueron 98-100% similares entre ellas y tuvieron 97% de similitud con *A. mellea* (número de accesión AY509188, basado en 95% de cobertura) de USA. El segundo (Grupo 2) estuvo constituido por ocho aislamientos (16.3%), colectados de las huertas # 9, 12 y 14, localizadas en los tres municipios. Las secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1 de los aislamientos del Grupo 2, representados por MEX55, MEX61, MEX77 y MEX90, fueron 99-100% similares entre sí y tuvieron 99% de similitud con *A. gallica* (AY509173), *A. sinapina* (AY509168) y *A. calvescens* (AY509163), basándose en 98% de cobertura. El tercero (Grupo 3) comprendió 36 secuencias (73.4%) colectadas de diez huertas (# 1 a 8, 13 y 15) pertenecientes a hongos aislados de los tres municipios bajo estudio. Las secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1 del Grupo 3 (representadas por MEX40, MEX43, MEX46, MEX47, MEX57 y MEX60) fueron 99.0-100% idénticas entre sí. Con base en el 32% de cobertura que incluye el

extremo 3' de LSU, las secuencias de los aislamientos del Grupo 3 tuvieron 94-95% de similitud con *Armillaria* sp. (AB510832), *A. cepistipes* (AB510825) y *A. gallica* (JN657431). Sin embargo, las secuencias de la región IGS1 (excluyendo el extremo 3' de LSU) de los aislamientos del Grupo 3 no tuvieron similitud >5% con ninguna secuencia en el GenBank (noviembre de 2012).

Las secuencias de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) de aislamientos representativos del Grupo 3 fueron complejas debido a la heterogeneidad intragenómica. Por ejemplo, las secuencias ITS de este grupo poseen varias inserciones de tamaño variable. Debido a que estas fueron usualmente ambiguas (datos no mostrados), no se emplearon para comparaciones de similitud.

Las comparaciones de las secuencias de la región 5.8S-ITS2-LSU también revelaron tres grupos que correspondieron a los mismos tres grupos definidos por las secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1. El Grupo 1 estuvo definido por las secuencias de cuatro aislamientos (representado por MEX72, MEX74 y MEX100). Con base en 100% de cobertura, las secuencias del Grupo 1 tuvieron 98% de similitud con *A. mellea* (AY213584). El Grupo 2 quedó formado por cuatro aislamientos (representado por MEX55, MEX61, MEX77 y MEX90). Con base en 100% de cobertura, las secuencias del Grupo 2 fueron 99% similares con *A. gallica* (AY213569), *A. calvescens* (AY213559) y *A. sinapina* (AY213563). El Grupo 3 estuvo constituido por 13 aislamientos (representado por MEX40, MEX43, MEX46, MEX47, MEX57 y MEX60). Las secuencias de la región 5.8S-ITS2-LSU del Grupo 3 no tuvieron similitud alta con ninguna secuencia en el GenBank y la especie más cercana para las secuencias del Grupo 3 fue *A. mellea* de USA (AY213584,

AY213586, AY213587) y México (MEX72, MEX74 y MEX100) con 93% de similitud basado en 80-86% de cobertura (Cuadro 2).

El análisis de las secuencias del *tef-1 α* mostró los siguientes resultados: i) Los aislamientos del Grupo 1 (representado por MEX74 y MEX100) tuvieron 99% de similitud y 100 de cobertura con *A. mellea* (JF313137), ii) Los aislamientos del Grupo 2 (representados por MEX55, MEX61 y MEX90) se identificaron como *A. gallica* basado en 99% de similitud y 100% de cobertura con *A. gallica* (FJ313125); y iii) Los aislamientos del Grupo 3 (representados por MEX40, MEX47 y MEX60) no coincidieron con valores altos de similitud con alguna secuencia en el GenBank pero mostraron 91% de similitud y 100% de cobertura con la secuencia de *tef-1 α* de *A. mellea* (JF313137).

Las comparaciones mediante GenBank Blasts de las secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1, 5.8S-ITS2-LSU y *tef-1 α* de los aislamientos obtenidos en las huertas de durazno identificaron los mismos tres grupos filogenéticos de especies de *Armillaria*. El Grupo 1 tuvo relación cercana con *A. mellea*, el Grupo 2 tuvo relación cercana con *A. gallica* y el Grupo 3 no coincidió estrechamente con secuencias disponibles en el GenBank.

2.3.4 Análisis filogenético

Las secuencias de IGS1 (excluyendo la región del extremo 3' de LSU) de *A. mellea*, *A. tabescens* y de los aislamientos MEX40, MEX43, MEX46, MEX47, MEX57 y MEX60 (*Armillaria* sp.) no pudieron alinearse sin ambigüedad entre ellas ni con las otras especies; por lo tanto, estas especies fueron excluidas de los datos de IGS1.

Sin embargo, se realizó un análisis filogenético empleando el método de Máxima Parsimonia basado en la región IGS1 de las especies estrechamente relacionadas. En este análisis, los aislamientos del Grupo 2 del Estado de México se agruparon dentro de un clado que contuvo los aislamientos de *A. gallica* y especies relacionadas con valores altos de soporte (100%, 100%). Este clado agrupó tres subclados, uno de los cuales (93%, 100%) abarcó los aislamientos del Grupo 2 (MEX55, MEX61, MEX77 y MEX90) y un aislamiento de *A. gallica* (ST23). El segundo estuvo separado en un aislamiento de *A. sinapina* (ST12) con 55% de soporte bootstrap y otro grupo (75%, 100%) que incluyó los aislamientos de *A. calvescens* (ST3, ST17) y uno de *A. gallica* (ST22). El tercero (68%, 97%) incluyó únicamente los aislamientos de *A. altimontana* (=NABSX, Brazeo *et al.*, 2012). Los aislamientos de *A. gallica* (M70), *A. sinapina* (ST13, M50), *A. cepistipes* (M110, S20 y W113) y *A. calvescens* (ST18) no se separaron dentro del clado de *A. gallica* (datos no mostrados).

Se analizaron 40 secuencias de LSU (dominios D1-D3 concatenados con el extremo 3' del gen), cada una con 1094 caracteres, las cuales tuvieron 49 sitios variables y 85 sitios informativos para el análisis de parsimonia. La búsqueda heurística dio como resultado 600 árboles con una longitud de 180 pasos, con índices de consistencia (CI) de 0.906 y de retención (RI) de 0.952. En el árbol bootstrap consenso (50%) que resultó de este análisis empleando a *Flamulina velutipes* como fuera de grupo (Fig. 21) se reportan los valores de probabilidad posterior del análisis Bayesiano obtenidos del árbol consenso estricto por regla de mayoría del 75%. El análisis de parsimonia agrupó a las especies de *Armillaria* en tres clados principales (Fig. 21). i) Un clado (100% soporte bootstrap y 100% de

probabilidad posterior) representado únicamente por los aislamientos del Grupo 3 (MEX40, MEX47 y MEX60) que correspondieron a la especie aislada más frecuentemente en los huertos de durazno del Estado de México (Fig. 21). Los aislamientos del Grupo 3 no pudieron identificarse empleando las secuencias de LSU, lo que indica que los aislamientos ubicados dentro de este clado bien definido representan una especie de *Armillaria* probablemente no descrita. ii) Un segundo clado (100%, 100%) compuesto por dos subclados, uno de estos (100%, 100%) formado por *A. mellea* de USA y otro (96%, 86%) que contuvo a los aislamientos del Grupo 1 (MEX72, MEX74 y MEX100) del Estado de México. iii) Un tercero, formado por dos subclados, uno (94%, 99%) constituido por *A. tabescens* y el otro (77% de soporte bootstrap) incluyó ocho especies de *Armillaria* de América del Norte (Fig. 21). En este clado más grande se ubicaron los aislamientos de *Armillaria* del Grupo 2 (MEX55, MEX61 y MEX90); a su vez, estos aislamientos no se separaron de *A. altimontana* (=NABSX), *A. cepistipes*, *A. calvescens*, *A. sinapina* y *A. gallica* de EUA y Canadá. Sin embargo, este clado más grande incluyó dos subclados. Uno contuvo los tres aislamientos de *A. nabsnona* con 59% de soporte bootstrap y otro (60%, 92%) incluyó *A. solidipes* y *A. gemina* (Fig. 21).

Los datos de *tef-1 α* consistieron de 39 secuencias con 919 caracteres, de los cuales 97 sitios fueron variables y 217 informativos para el análisis de parsimonia. La búsqueda heurística dio como resultado 900 árboles con una longitud de 632 pasos, un CI de 0.815 y RI de 0.887. En el árbol bootstrap consenso (50%) creado a partir del análisis parsimonia (Fig. 22) se reportan los valores de probabilidad posterior del análisis Bayesiano, obtenidos del árbol consenso estricto por regla de mayoría del

75%. El análisis de parsimonia agrupó a las especies de *Armillaria* en dos clados principales. El primero constituido sólo con *A. tabescens* (100%, 100%) y el segundo comprendió diez especies de *Armillaria* (95% de soporte bootstrap) dividido en dos subclados. El primero de estos incluyó al Grupo 3 (MEX40, MEX47 y MEX60), una *Armillaria* sp., no identificada (100%, 100%) y *A. mellea* (100%, 94%) las cuales fueron bien separadas en dos subclados diferentes. El de *A. mellea* contuvo al menos dos grupos, uno de los cuales separó a los aislamientos del Grupo 1 (MEX74 y MEX100). El segundo subclado principal (82%, 79%) quedó formado por *A. solidipes*, *A. gemina*, *A. sinapina*, *A. cepistipes*, *A. nabsnona*, *A. altimontana* (NABSX), *A. calvescens* y *A. gallica* (Fig. 22). Los aislamientos que representan a cada especie se agruparon en subclados bien definidos, con excepción de un aislamiento de *A. gallica* (M70) obtenido en Canadá. Dentro de este segundo subclado, *A. solidipes* y *A. gemina* fueron agrupadas como subclados hermanos (99%, 99%) y *A. sinapina* formó uno independiente (100%, 100%). Otro grupo (63%, 89%) dentro de este segundo subclado estuvo formado por clados bien definidos que representan *A. cepistipes*, *A. nabsnona*, *A. altimontana* (NABSX), *A. calvescens* y a un aislamiento de *A. gallica* (M70) como un organismo separado. Otro subclado (97%, 95%) estuvo formado por los aislamientos remanentes de *A. gallica* y los aislamientos del Grupo 2 (MEX55, MEX61 y MEX90) agrupados como un subgrupo del subclado de *A. gallica* (98%, 100%). Por lo tanto, el análisis filogenético basado en *tef-1 α* fue efectivo en separar o distinguir las especies biológicas de *Armillaria* actualmente reconocidas en América del Norte e indica que los aislamientos del

Grupo 3 obtenidos de las huertas de durazno representan una probable especie no descrita.

2.4 DISCUSIÓN

El incremento anual en la mortalidad y área afectada asociada con árboles infectados por *Armillaria* spp., en la mayoría de las huertas evaluadas evidencian que estos hongos son los principales agentes patogénicos de la muerte de árboles de durazno en esta región de México. Los aislamientos de *Armillaria* sp., (Grupo 3) fueron obtenidos del 75% de los diagnósticos realizados, por lo que se considera la especie más distribuida causante de la enfermedad. La variación amplia en la mortalidad entre huertas podría atribuirse a diferencias en patogenicidad entre las especies de *Armillaria* identificadas. Una variación significativa en patogenicidad entre especies de *Armillaria* se ha documentado en *Prunus* spp. (Cox *et al.*, 2005). Sin embargo, otros factores pudieron contribuir en la mortalidad diferencial de árboles de durazno, como la densidad de inóculo (Lung-Escarmant y Guyon, 2004) o tolerancia entre portainjertos o genotipos de durazno (Beckman *et al.*, 1998). Por ejemplo, en huertas infestadas por *A. tabescens*, 'Nemaguard' fue uno de los materiales más susceptibles a esta enfermedad (Beckman *et al.*, 1998). En este estudio se observó que, el portainjerto 'Criollo' regional y 'Nemaguard' tendieron a mostrar valores promedio de mortalidad similares. Sin embargo, estos resultados pudieron ser influenciados por patrones de variación espacial en la presencia o densidad del patógeno y edad de las huertas. Además, los niveles de mortalidad en huertas que emplean portainjertos 'Criollos' pudo ser influenciada por la variación genética asociada con su propagación por semilla.

La mortalidad aumentó continuamente durante 2009 al 2011 en todas las huertas evaluadas y el incremento en el tamaño de los manchones o focos de infección también fue evidente (Cuadro 1; Figs. 6 a 20). El incremento anual en el área de los focos de infección de *Armillaria* generalmente es atribuido a la dispersión del hongo por contacto de raíces infectadas y/o rizomorfos; aspecto favorecido por las distancias cortas de plantación, lo cual es común en las huertas de durazno del Estado de México donde la distancia promedio es de 3.1 m entre plantas x 4.3 m entre hileras. La abundancia de rizomorfos observada durante la colecta de muestras en la mayoría de las huertas apoya la importancia de estas estructuras en la dispersión de *Armillaria*. Se ha documentado que *A. mellea* se dispersa principalmente por rizomorfos en huertas de pera (Rizzo *et al.*, 1998). Por otra parte, los focos de infección por *Armillaria* spp., compuestos por varios árboles se han reportado en huertas de durazno, kiwi, arándano, etc., en Nueva Zelanda, USA, Italia entre otros países (Homer, 1992; Cox y Beckman, 2005; Prodorutti *et al.*, 2009).

La formación de focos de infección por *Armillaria* y la identificación de especies de este hongo asociadas con la enfermedad no se había documentado previamente en huertas de durazno del Estado de México. Estos centros de infección no son comúnmente observados en los bosques naturales del centro de México (Cannon *et al.*, 2008), lo cual sugiere que *Armillaria* existía pero no era predominante en los sitios previamente ocupados con especies forestales nativas. El monocultivo de una especie susceptible como el durazno (Beckman *et al.*, 1998), establecida en distancias de plantación reducidas probablemente facilite la dispersión de *Armillaria* spp., dentro de las huertas. Para mantener la productividad y longevidad de huertas de durazno en suelos infestados por este hongo, se sugieren la adopción de

prácticas culturales de manejo para disminuir su impacto, como reducir las fuentes de inóculo antes de la plantación o en huertas establecidas (Onsando *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 2005; Prodorutti *et al.*, 2009) y el desarrollo de portainjertos resistentes, entre otras medidas. Sin embargo, ninguna de estas u otras estrategias de manejo para esta enfermedad se ha implementado en la región, este estudio contribuirá a desarrollar estrategias apropiadas de manejo (como la búsqueda de portainjertos tolerantes) basadas en la virulencia de las especies de *Armillaria* identificadas.

Los análisis de las secuencias de ADN de 5.8S-ITS2-LSU, extremo 3' de LSU-IGS1 y *tef-1 α* sugieren que existen tres especies de *Armillaria* presentes en los huertos evaluados: i) Grupo 1 relacionado con *A. mellea*, ii) Grupo 2 relacionado con *A. gallica* y iii) Grupo 3, una especie de *Armillaria* probablemente no descrita cuyas secuencias no coincidieron con especies previamente reportadas en el GenBank. Las secuencias de ITS tuvieron poca utilidad para caracterizar los aislamientos de *Armillaria* de este estudio debido a heterogeneidad intragenómica (datos no mostrados), lo cual concordó con un estudio similar en *Laetiporus* spp. (Lindner y Banik, 2011). La variación intragenómica en especies de *Armillaria* spp., de América del Norte fue previamente observada por Kim *et al.* (2006).

Los análisis filogenéticos revelaron la presencia de un subclado dentro de *A. mellea* formado por los aislamientos del Estado de México. Los subgrupos dentro de *A. mellea* se han documentado también con aislamientos de USA, Europa y Asia (Coetzee *et al.*, 2000; Baumgartner *et al.*, 2011), lo cual sugiere un proceso de especiación (Coetzee *et al.*, 2000). Resultados similares se ilustran en el árbol filogenético basado en las secuencias de *tef-1 α* (Fig. 22) en el cual el clado de *A.*

gallica tuvo un subgrupo compuesto por los aislamientos del Grupo 2 de México (MEX55, MEX61 y MEX90). En este análisis, un genotipo de referencia de *A. gallica* (M90) no pudo ser identificado de manera precisa empleando las secuencias de *tef-1 α* ; esto coincidió con los resultados de Ross-Davis *et al.* (2012), quienes consideraron la posibilidad que *A. gallica* puede contener genotipos crípticos o especies. Aunque en América del Norte no se había demostrado de manera concluyente la presencia de un grupo genéticamente distinto dentro de *A. gallica* (Brazee *et al.*, 2011), las evidencias documentadas por Kim *et al.* (2006; 2012) y Ross-Davis *et al.* (2012) sugieren su existencia. Las secuencias del *tef-1 α* se han empleado para identificar aislamientos de *A. gallica*, aspecto no logrado con las secuencias de ITS, LSU e IGS1 (Anderson y Stasovski, 1992; Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012). Sin embargo, los aislamientos del Grupo 2 del Estado de México, agrupados dentro del subclado de *A. gallica*, también fueron separados con valores altos de soporte (93%, 100%) en el análisis filogenético de la región IGS1 de especies estrechamente relacionadas (datos no mostrados). El análisis de este y otros estudios previos evidencian que *A. gallica* comprende especies múltiples y que los aislamientos agrupados en el clado de esta especie obtenidos de huertas de durazno en el Estado de México pueden representar una especie críptica distinta dentro del complejo de especies de *A. gallica*. Estudios posteriores podrían ser necesarios para definir mejor las relaciones filogenéticas y taxonómicas dentro del complejo de especies de *A. mellea* y *A. gallica*.

Un estudio previo identificó la presencia de ambas especies en árboles forestales nativos de la región centro de México (Alvarado-Rosales y Blanchette, 1994), localizados a más de 70 km del área de estudio y demostró que algunos aislamientos obtenidos del estado de Puebla mostraron incompatibilidad con especies biológicas de *Armillaria* de América del Norte (NABS), lo cual sugiere que estos aislamientos son distintos de especies de *Armillaria* que fueron previamente reportadas en México (*A. solidipes*, *A. cepistipes*, *A. mellea*, *A. gallica* y *A. tabescens*) (Alvarado-Rosales, 2007; Kim et al., 2010). Por lo tanto, estas cepas incompatibles podrían ser otra o la misma especie de *Armillaria* no descrita (Grupo 3) frecuentemente aislada de los árboles de durazno en este estudio, para la cual no se encontró ninguna secuencia similar disponible en el GenBank. Aunque el GenBank no contiene secuencias de todas las especies de hongos patógenos reportados para durazno (Brock et al., 2009), las secuencias de especies de *Armillaria* reconocidas actualmente en América del Norte están representadas en el GenBank. Las características macro y micromorfológicas de esta especie no descrita y sus secuencias de ADN permitirán mejorar las bases o criterios para su descripción formal.

Una especie de *Armillaria* no descrita (cuyas secuencias 5.8S parcial-ITS2-LSU parcial, extremo 3' de LSU-IGS1, and *tef-1 α* fueron ampliamente diferentes a las secuencias de *Armillaria* disponibles en el GenBank) se aisló con mayor frecuencia de árboles sintomáticos y muertos en huertas de durazno en el sur del Estado de México que presentaron mortalidad anual significativa; además algunos aislamientos asociados con *A. gallica* y *A. mellea* se obtuvieron ocasionalmente. Debido a que

esta especie de *Armillaria* no descrita (Grupo 3) es significativamente diferente de las otras especies de *Armillaria* frecuentemente asociadas con la pudrición de raíces en huertas de durazno en USA y México (Beckman *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2005; Schnabel *et al.*, 2005; Alvarado-Rosales, 2007), podría requerirse el desarrollo de portainjertos específicos resistentes a esta especie no determinada. Los análisis filogenéticos de los aislamientos de *Armillaria* spp., obtenidos de este estudio contribuyen con información adicional sobre la diversidad de este hongo en América del Norte y confirma la utilidad de la regiones LSU, IGS1 y *tef-1α* en separar a la especie no identificada de *Armillaria*.

2.5 LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales, D. 2007. Pudrición de raíz por *Armillaria/ Armillaria* root rot. *Armillaria* (Fr.) Staude. (Agaricales, Marasmiaceae). *In*: Cibrián T., D., D. Alvarado R. y S. E. García D. (eds). Enfermedades Forestales en México. Mundi-Prensa. UACH, Chapingo, México. pp:211-215.
- Alvarado-Rosales, D., R. A. Blanchette. 1994. *Armillaria* species from forest of central Mexico. *Phytopathology* 84: 1106.
- Amiri, A., and G. Schnabel. 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.
- Anderson, J.B., and E. Stasovski. 1992. Molecular phylogeny of Northern Hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84: 506–516.

- Baumgartner, K., R. Travadon, J. Bruhn, and S. E. Bergemann. 2010. Contrasting patterns of genetic diversity and population structure of *Armillaria mellea* sensu stricto in the Eastern and western United States. *Phytopathology* 100: 708-718.
- Beckman, T. G., W. R. Okie, A. P. Nyczepir, P. L. Pusey, and C.C. Reilly. 1998. Relative susceptibility of peach and plum germplasm to *Armillaria* root rot. *HortScience* 33: 1062-1065.
- Brazeo, N.J., J. P. Hulvey, and R. L. Wick. 2011. Evaluation of partial *tef1*, *rpb2*, and *nLSU* sequences for identification of isolates representing *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. *Fungal Biology*. 115: 741-749.
- Brazeo, N.J.; B. Ortiz-Santana, M. T. Banik, and D. L. Lindner. 2012. *Armillaria altimontana*, a new species from the western interior of North America. *Mycologia* 104: 1200-1205.
- Brock, P.M., H. Döring, and M. I. Bidartondo. 2009. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytologist* 181: 719-724.
- Cannon, P., N. B. Klopfenstein, M.-S. Kim, J. W. Hanna, R. Medel, and D. Alvarado-Rosales. 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. McWilliams, M., and P. Palacios (comps.). Proceedings of the 55th Western International Forest Disease Work Conference. Sedona, AZ, USA. Salem, OR, USA: Oregon Dept. of Forestry. Octubre 15-19, 2007. pp: 28-39.

- Coetzee, M.P.A., B. D. Wingfield, T. C. Harrington, D. Dalevi, T. A. Coutinho, and M. J. Wingfield. 2000. Geographical diversity of *Armillaria mellea* s.s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia* 92: 105-113.
- Cox, K., H. Scherm, and T. Beckman. 2005. *Armillaria* Root and Crown Rot. *In*: Horton, D., and D. Johnson (eds). *Peach Growers Handbook*. Cooperative Extension Service, University of Georgia. pp:162–166.
- Duchesne, L.C., and J. B. Anderson. 1990. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*. *Mycological Research* 94: 266–269.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368–376.
- Gardes, M., and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Harrington, T.C., J. J. Worrall, F. A. Baker. 1992. *Armillaria*. *In*: Singleton, L. L., J. D. Mihail, C. M. Rush, M. N. St. Paul. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. USA. APS Press. pp: 81.
- Homer, I. J. 1992. Epidemiology of *Armillaria* root rot of Kiwifruit. *Acta Horticulturae (ISHS)* 297: 573-578.
- Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2007. MrBayes, version 3.1.2. Bayesian analysis of phylogeny. Application program distributed by the authors on the GNU General Public License, website <http://mrbayes.csit.fsu.edu>. (consulta enero 2013).

- Kim, M.-S., N. B. Klopfenstein, J. W. Hanna, G. I. McDonald. 2006. Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology* 36: 145-164.
- Kim, M.-S., N. B. Klopfenstein, J. W. Hanna, P. Cannon, R. Medel, A. López. 2010. First report of *Armillaria* root disease caused by *Armillaria tabescens* on *Araucaria araucana* in Veracruz, México. *Plant Disease* 94: 784.
- Kim, M.-S., J. E. Stewart, Y. Ota, J. W. Hanna, A. L. Ross-Davis, and N. B. Klopfenstein. 2012. Phylogenetic relationships among northern hemisphere *Armillaria* species based on the *tef-1 α* locus. *Phytopathology* 102 (S4): 63- 64.
- Lindner, D.L., and M. T. Banik. 2011. Intragenomic variation in the ITS rDNA obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in the genus *Laetiporus*. *Mycologia* 103: 731-740.
- Lung-Escarmant, B., D. Guyon. 2004. Temporal and spatial dynamics of primary and secondary infection by *Armillaria ostoyae* in a *Pinus pinaster* plantation. *Phytopathology* 94: 125-131.
- Moncalvo, J.M., F. M. Lutzoni, S. A. Rehner, J. Johnson, R. Vilgalys. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49: 278–305.
- Müller, K., 2005. Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Applied Bioinformatics* 4: 65-69.
- Onsando, J. M., P. M. Wargo, S. W. Waudu. 1997. Distribution, severity, and spread of *Armillaria* root disease in Kenya tea plantations. *Plant Disease* 81: 133-137.

- Pertot, I., D. Gobbin, F. De Luca, D. Prodorutti. 2008. Methods of assessing the incidence of *Armillaria root rot* across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. *Crop Protection* 27: 1061-1070.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology Evolution* 25: 1253-1256.
- Prodorutti, D., T. Vanblaere, D. Gobbin, A. Pellegrini, C. Gessler, and I. Pertot. 2009. Genetic diversity of *Armillaria* spp. infecting highbush blueberry in northern Italy (Trentino region). *Phytopathology* 99: 651-658.
- Proffer, T.J., A. L. Jones, and G. R. Ehret. 1987. Biological species of *Armillaria* isolated from sour cherry orchards in Michigan. *Phytopathology* 77: 941-943.
- Rizzo, D. M., E. C. Whiting, and R. B. Elkins. 1998. Spatial distribution of *Armillaria mellea* in pear orchards. *Plant Disease* 82: 1226-1231.
- Rodriguez, F., J. F. Oliver, A. Marín, J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501.
- Ross-Davis, A.L., J. W. Hanna, M.-S. Kim, and N. B. Klopfenstein. 2011. Advances toward DNA-based identification and phylogeny of North American *Armillaria* species using elongation factor-1 α gene. *Mycoscience* 53: 161-165.
- Schnabel, G., J. S. Ash, and P. K. Bryson. 2005. Identification and characterization of *Armillaria tabescens* from the southeastern United States. *Mycological Research* 109: 1208-1222.

- Shaw, C.G. 1989. *Armillaria ostoyae* associated with mortality of new hosts in Chihuahua, Mexico. *Plant Disease* 73: 775.
- SIAP, 2010. Cierre de la producción por cultivo. SAGARPA. www.siap.gob.mx/index.php/agricultura/produccion-anual/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo.html. (consulta, 27 junio de 2012).
- Simmons, M.P., and H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369-381.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP 4.0b10: *Phylogenetic analysis using parsimony*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Veldman, G.M., J. Klootwijk, V. C. de Regt, R. J. Planta, C. Branlant, A. Krol, and J. P. Ebel. 1981. The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. *Nucleic Acids Research* 9: 6935-6952.
- White, T.J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Analysis of phylogenic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal DNA genes. *In*: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press. pp: 315–322.
- Worrall, J.J. 1991. Media for selective isolation of hymenomycetes. *Mycologia* 83: 296-302.

Cuadro 1. Mortalidad acumulada y área afectada acumulada asociadas con la pudrición de raíces por *Armillaria* spp., de 2009 a 2011 en 15 huertas comerciales de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] de tres municipios del Estado de México, México.

Huerta #	Año de plantación	Portainjerto	Mortalidad acumulada (%)			Área acumulada afectada (%)		
			2009 ¹	2010	2011	2009	2010	2011
1	2007	'Criollo'	0.8	1.5	3.1	3.2	5.1	8.1
2	2006	'Criollo'	ND ²	2.4	3.8	ND	5.5	8.9
3	2001	'Nemaguard'	ND	3.4	3.9	ND	6.5	6.9
4	1997	'Nemaguard'	2.6	3.4	6.6	5.4	12.9	17.0
5	2006	'Criollo'	ND	5.8	8.0	ND	8.8	10.2
6	2001	'Nemaguard'	ND	7.2	8.7	ND	11.3	12.4
7	2000	'Nemaguard'	ND	10.6	16.7	ND	16.6	23.0
8	1991	'Criollo'	11.5	13.7	23.1	17.7	20.3	26.8
9	2002	'Nemaguard'	ND	14.6	18.0	ND	29.1	29.5
10	2002	'Criollo'	11.1	15.7	23.7	33.2	33.8	38.4
11	1999	'Criollo'	9.2	17.1	21.3	31.2	31.2	32.8
12	1996	'Criollo'	ND	23.9	30.8	ND	33.9	39.5
13	1999	'Nemaguard'	23.3	26.7	38.6	48.7	50.0	54.3
14	2003	'Nemaguard'	ND	31.3	39.9	ND	44.8	51.3
15	2001	'Criollo'	ND	52.0	59.2	ND	60.5	65.7

¹únicamente las huertas 1, 4, 8, 10, 11 y 13 fueron evaluadas en 2009. ²ND= No determinado

Cuadro 2. Aislamientos de *Armillaria* spp., obtenidos de huertas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en Estado de México, México y empleados en el presente estudio.

Especies	Aislamiento	No de accesión en el GenBank		<i>tef-1α</i> ³
		5.8S parcial-ITS2-LSU parcial ¹	LSU parcial-IGS1 ²	
<i>A. mellea</i>	MEX72	JX281806	JX281796	-
	MEX74	JX281807	JX281797	KC111011
	MEX100	JX281808	JX281798	KC111012
<i>A. gallica</i>	MEX55	JX281809	JX281799	KC111013
	MEX61	KC111006	KC111010	KC111014
	MEX77	JX281810	JX281800	-
	MEX90	JX281811	JX281801	KC111015
<i>Armillaria</i> sp.	MEX40	KC111002	KC111007	KC111016
	MEX43	JX281813	JX281802	-
	MEX46	JX281812	JX281803, JX281804	-
	MEX47	KC111003, KC111004	KC111008	KC111017
	MEX57	JX281814	JX281805	-
	MEX 60	KC111005	KC111009	KC111018

¹5.8S parcial- espacio transcrito interno 2 (ITS2)- subunidad grande del ribosoma (LSU) D- dominios

²Extremo 3' de la subunidad grande del ribosoma (LSU)- espacio intergénico 1 (IGS1)

³Factor de elongación-1 α

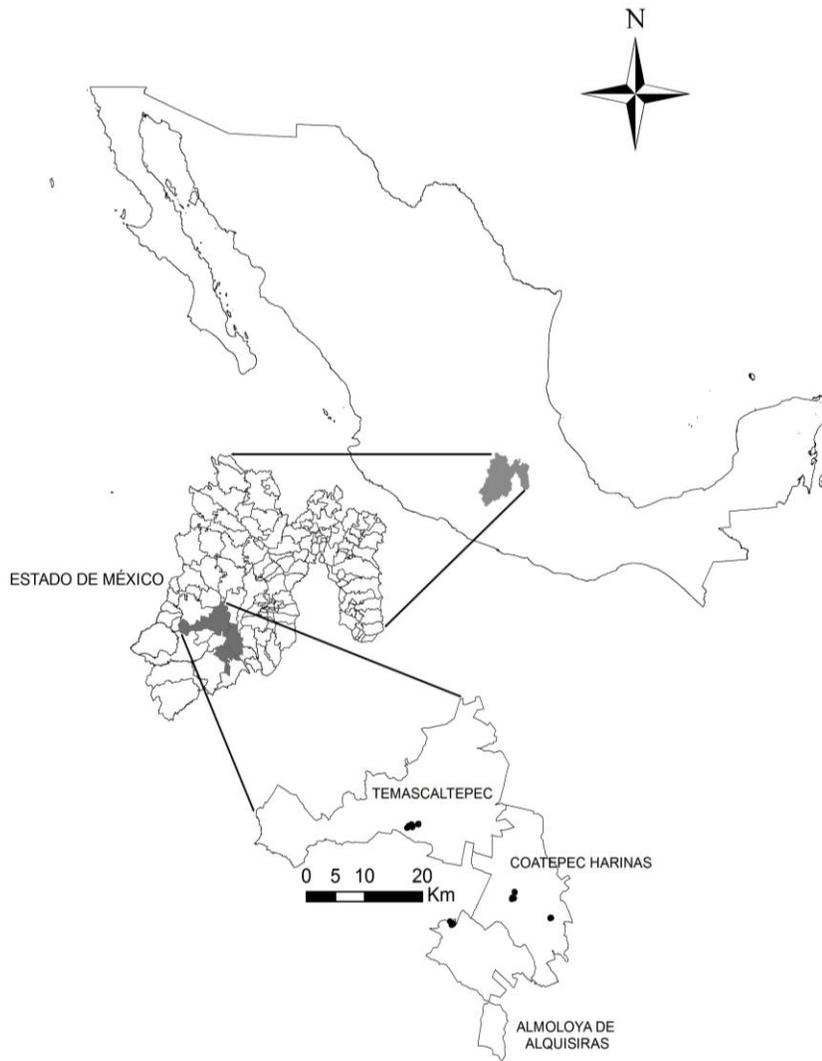


Fig. 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de *Armillaria* spp., en el Estado de México, México.



Fig. 2. Síntomas y signos de *Armillaria* spp., en árboles de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.]. (A-1) Árbol sano, (A-2) árbol sintomático y (A-3) árbol muerto (B) Basidiomas de *A. mellea* (C) Colonización micelial subcortical con patrón en abanico en raíz de durazno (D) Rizomorfo sobre una raíz de durazno y (E) Rizomorfos obtenidos por incubación en cámara húmeda a partir de un tallo y raíces infectadas de durazno.

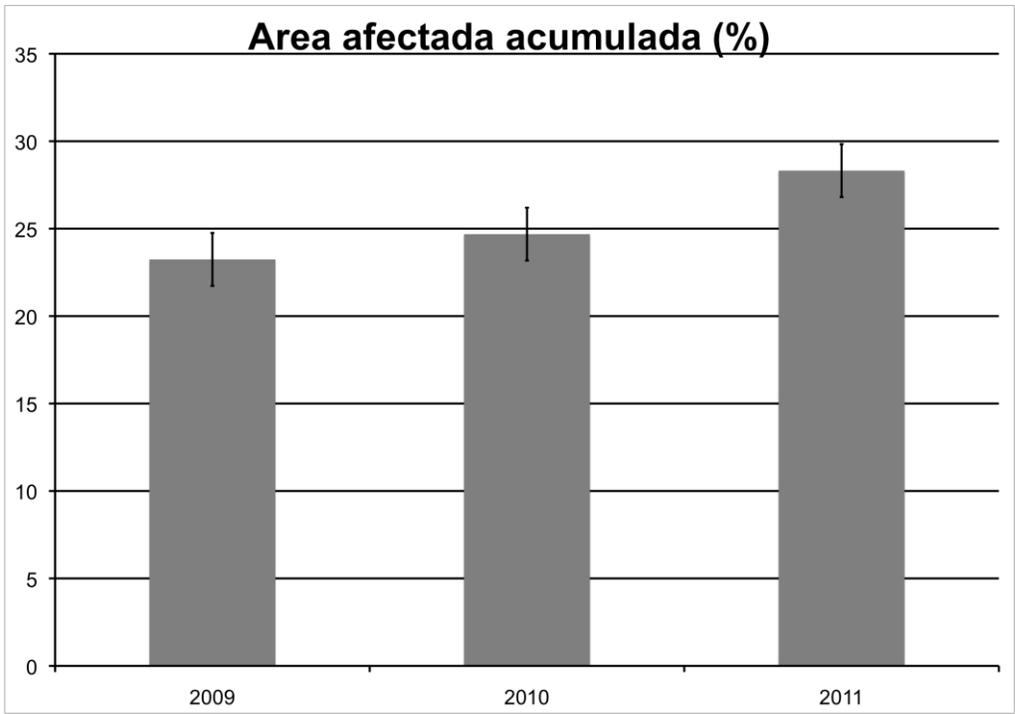
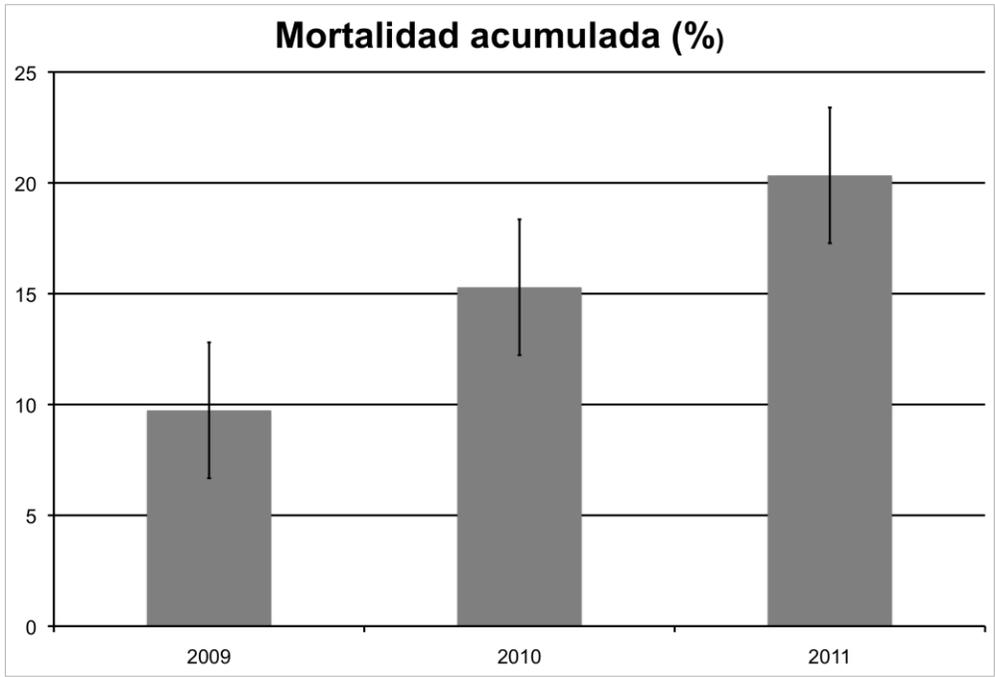


Fig. 3. Mortalidad y área afectada acumulada (%) asociada con la pudrición de raíces por *Armillaria* spp., en huertas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en tres municipios del Estado de México, México. (\pm error típico). Nota: únicamente las huertas 1, 4, 8, 10, 11 y 13 se evaluaron en el 2009.

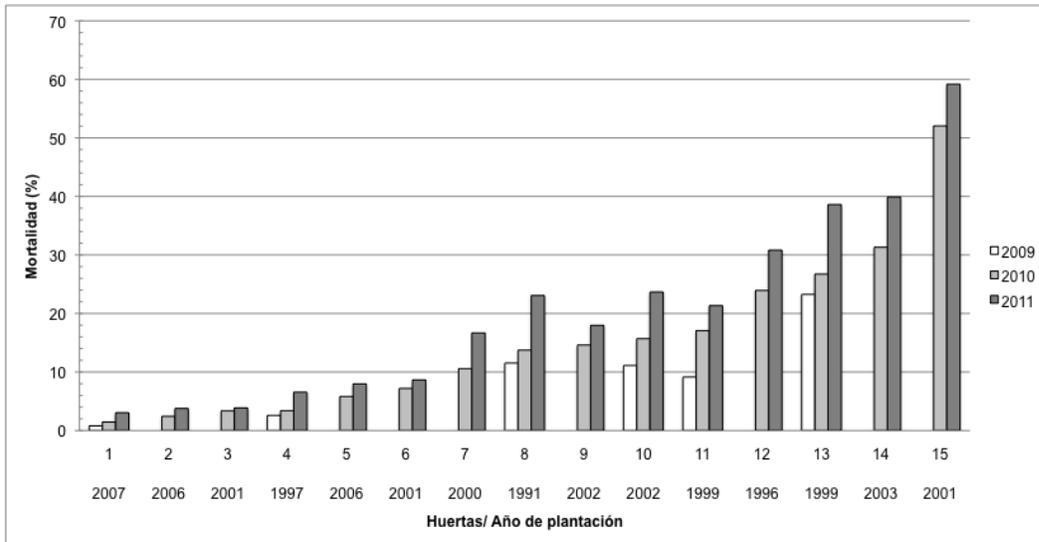


Fig. 4. Porcentaje acumulado de mortalidad observado del 2009 al 2011 en 15 huertas comerciales de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en tres municipios del Estado de México. Nota: únicamente las huertas 1, 4, 8 10, 11 y 13 se evaluaron en 2009.

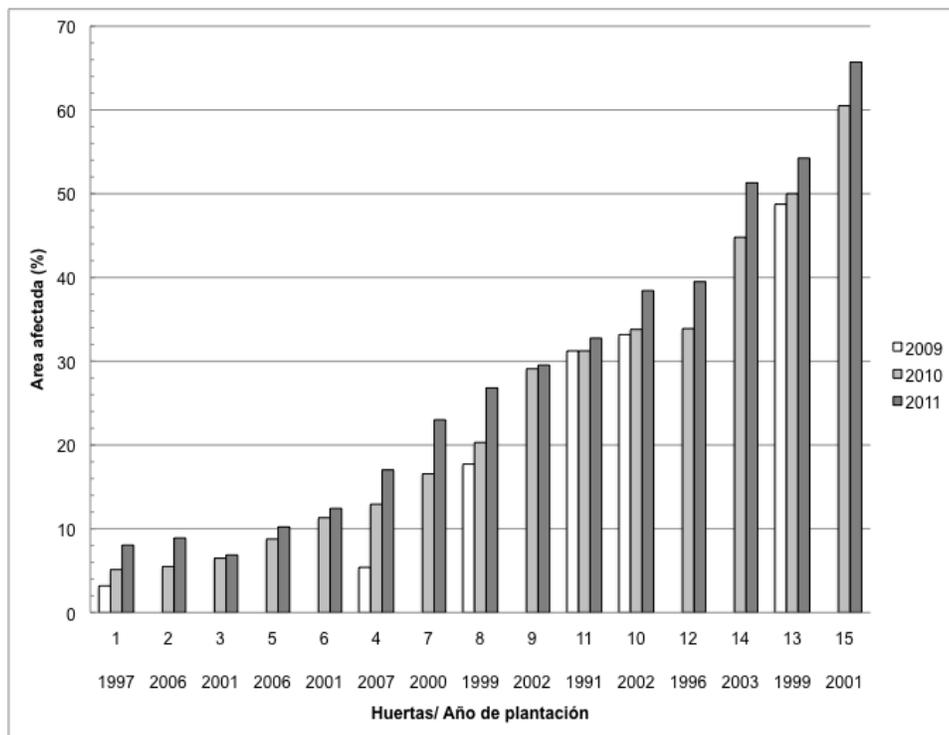


Fig. 5. Porcentaje acumulado de área afectada asociado con la pudrición de raíces por *Armillaria* spp., del 2009 al 2011 en 15 huertas comerciales de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en tres municipios del Estado de México, México. Nota: únicamente las huertas 1, 4, 8 10, 11 y 13 se evaluaron en 2009.

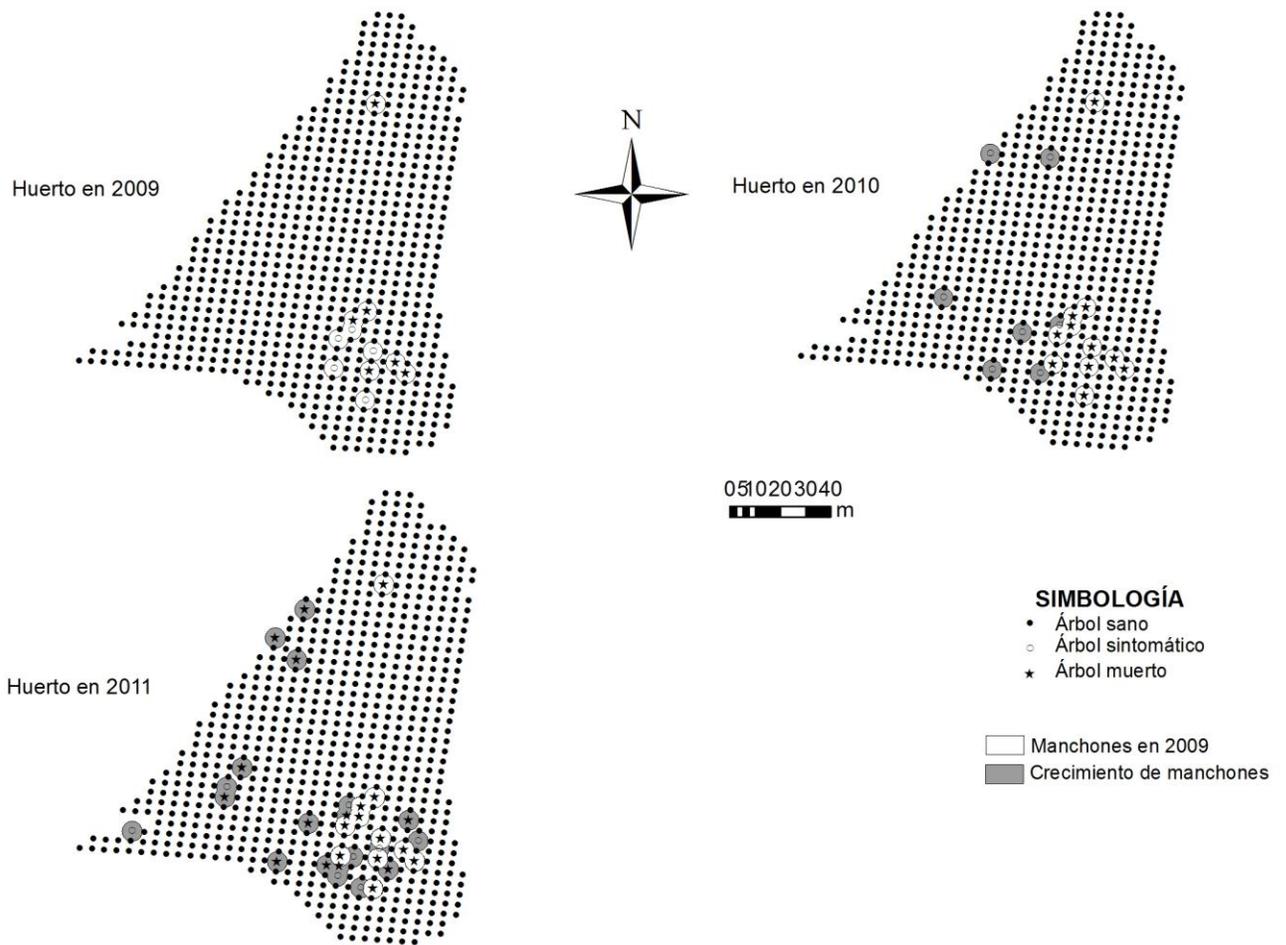


Fig. 6. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 1, establecida en 2007, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México.

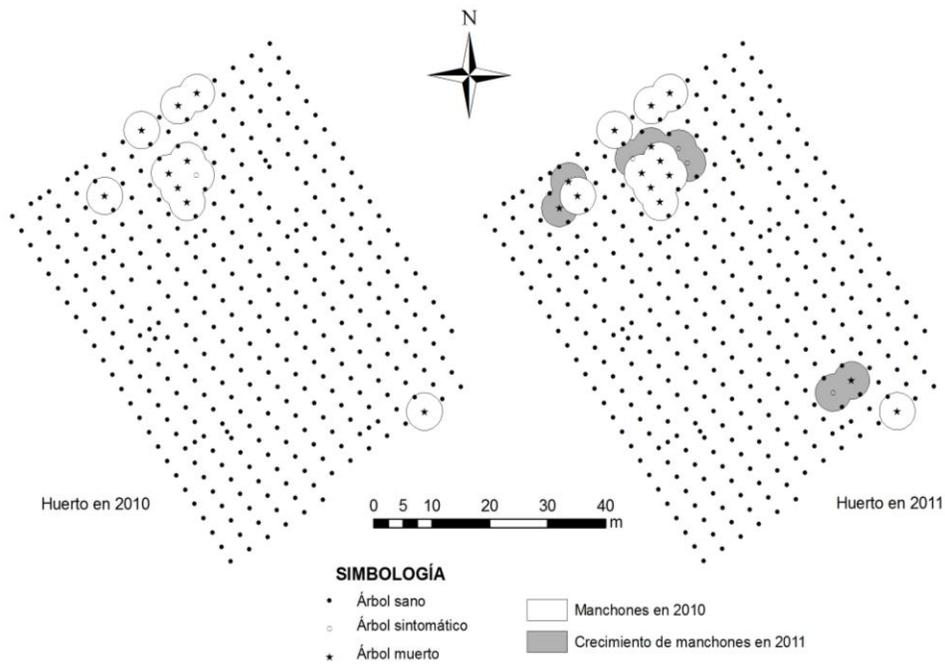


Fig. 7. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 2, establecida en 2006, localizada en San Andrés, Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México.

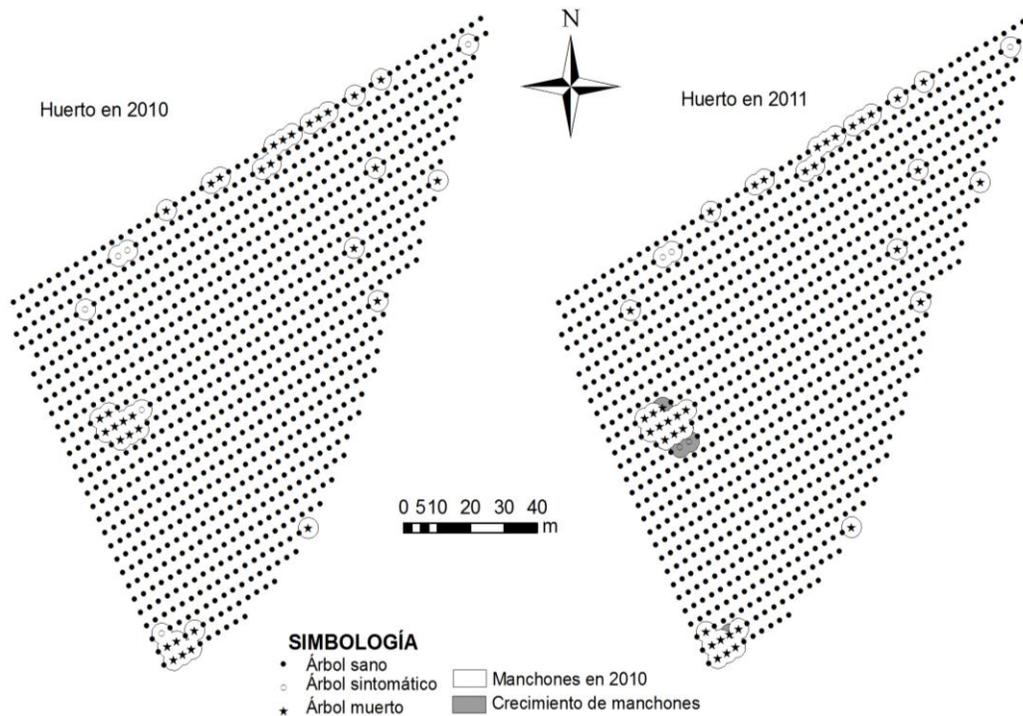


Fig. 8. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 3, establecida en 2001, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México.

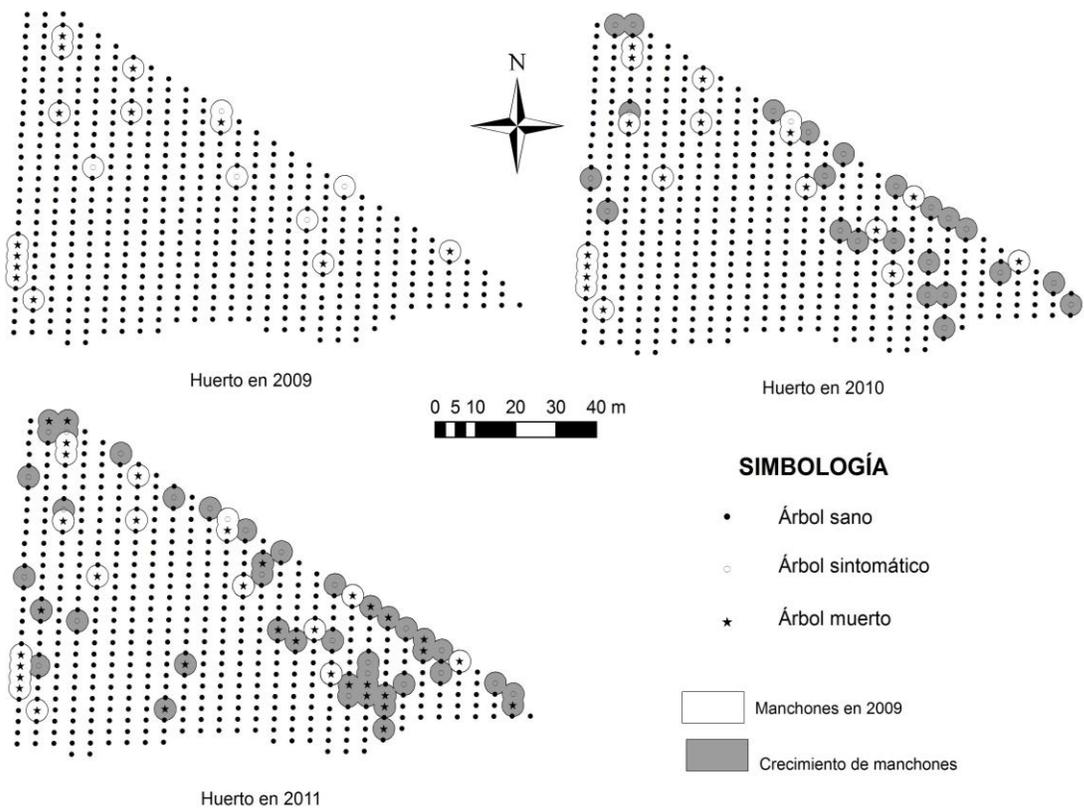


Fig. 9. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] número 4, establecida en 1997, localizada en Cochisquila, Coatepec Harinas, Estado de México, México.

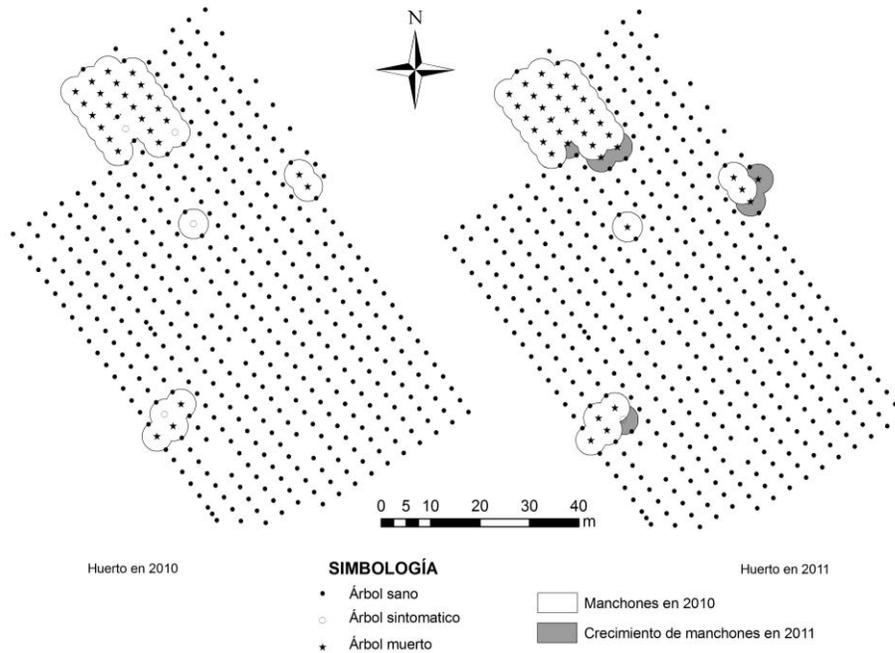


Fig. 10. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 5, establecida en 2006, localizada en San Andrés, Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México.

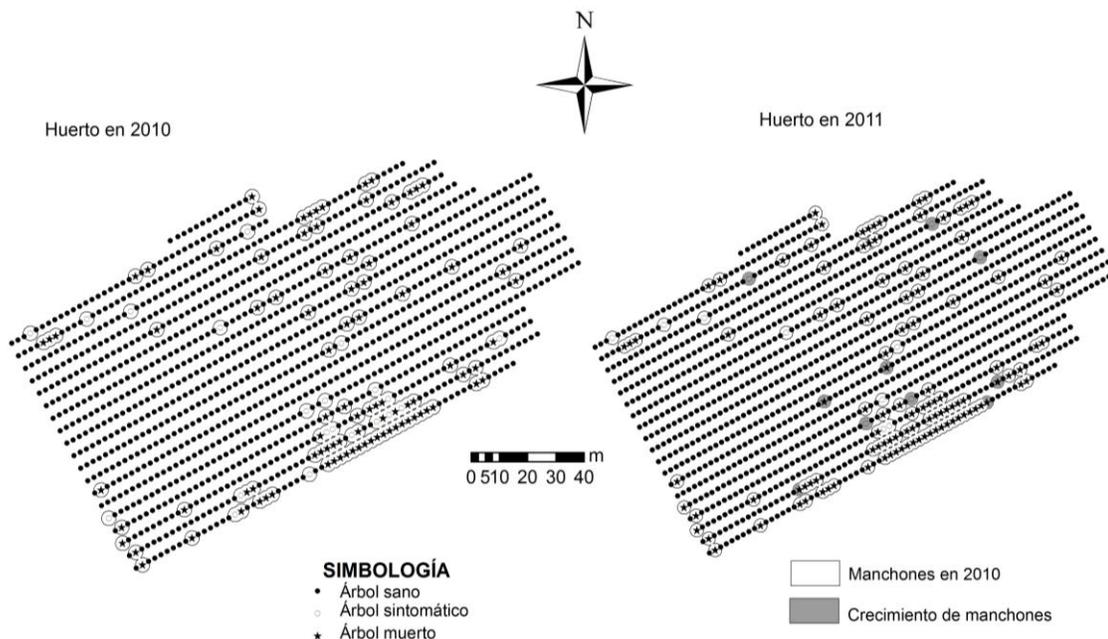


Fig. 11. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 6, establecida en 2001, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México.

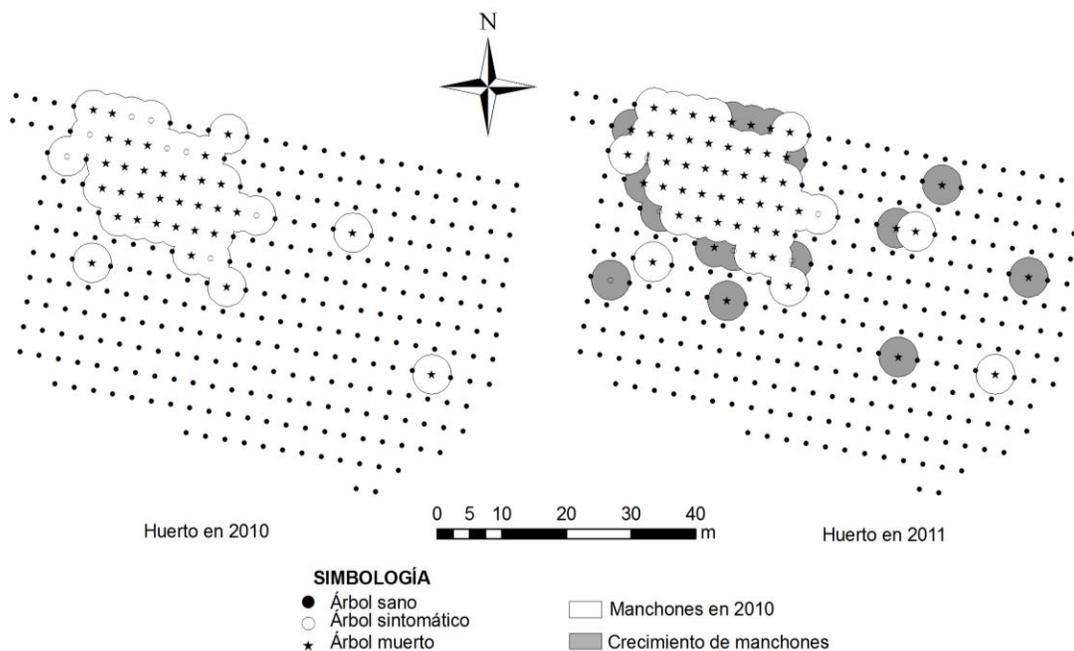


Fig. 12. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 7, establecida en 2000, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México.

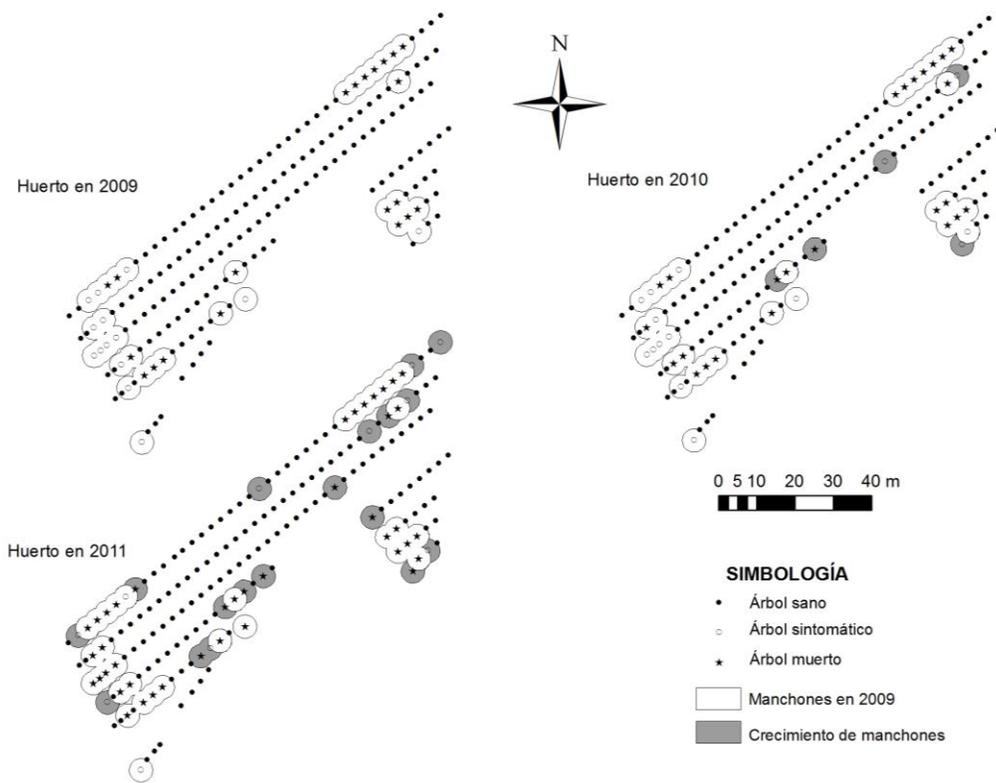


Fig. 13. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 8, establecida en 1991, localizada en Cochisquila, Coatepec Harinas, Estado de México, México.

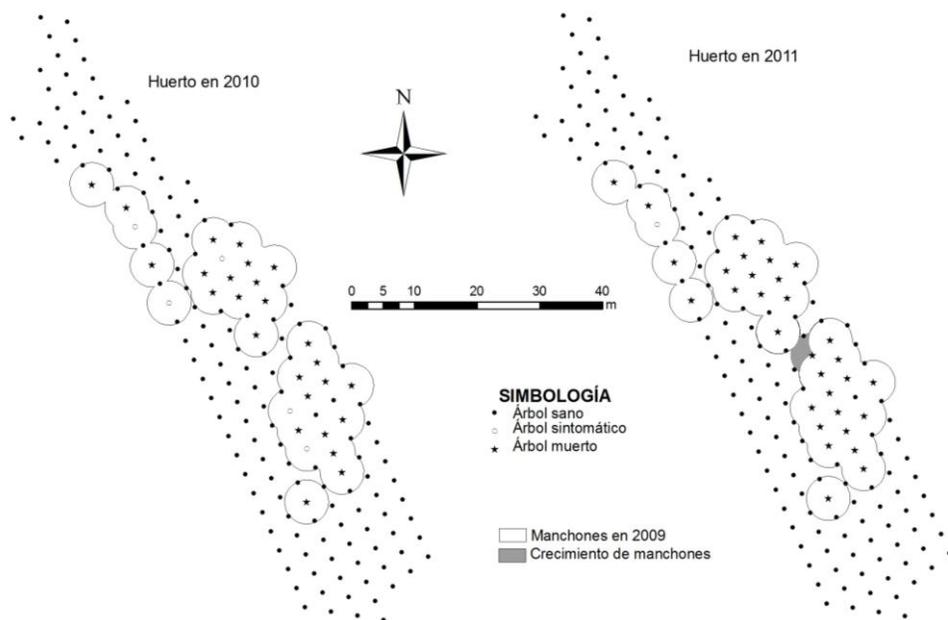


Fig. 14. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 9, establecida en 2002, localizada en San Andrés de los Gama, Temascaltepec, Estado de México, México.

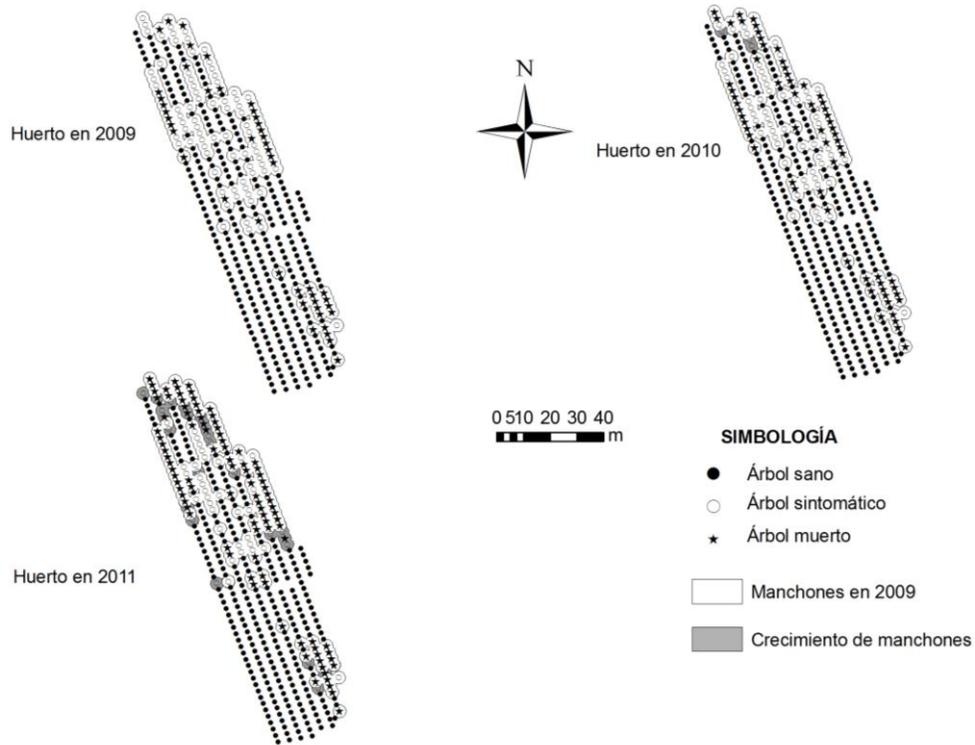


Fig. 15. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] número 10, establecida en 2002, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México.

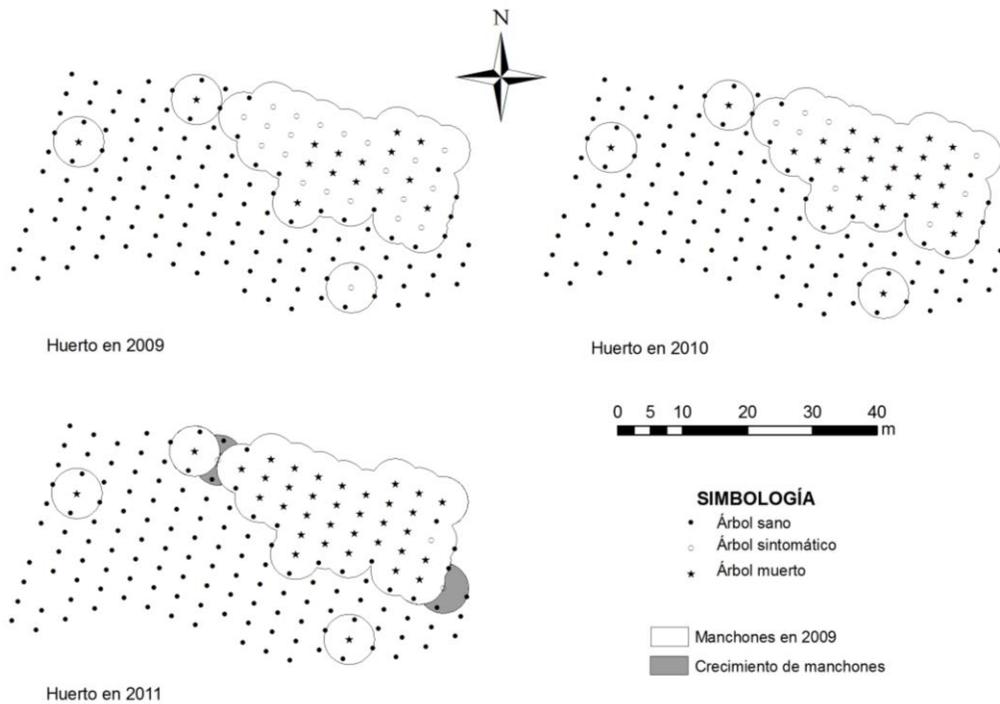


Fig. 16. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] número 11, establecida en 1999, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México.

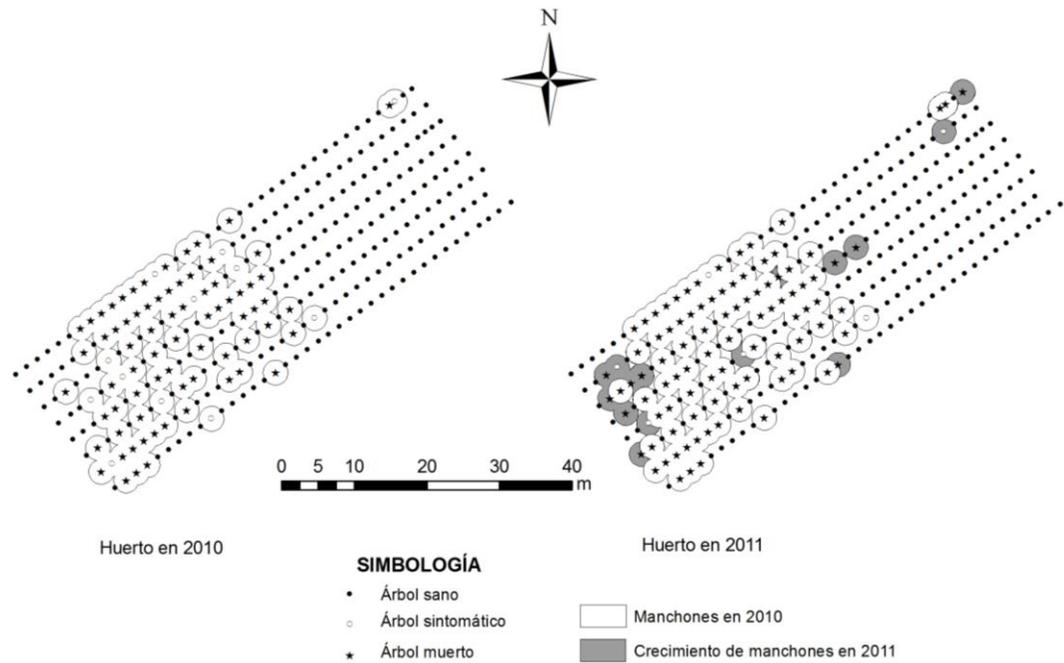


Fig. 17. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] número 12, establecida en 1996, localizada en Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México.

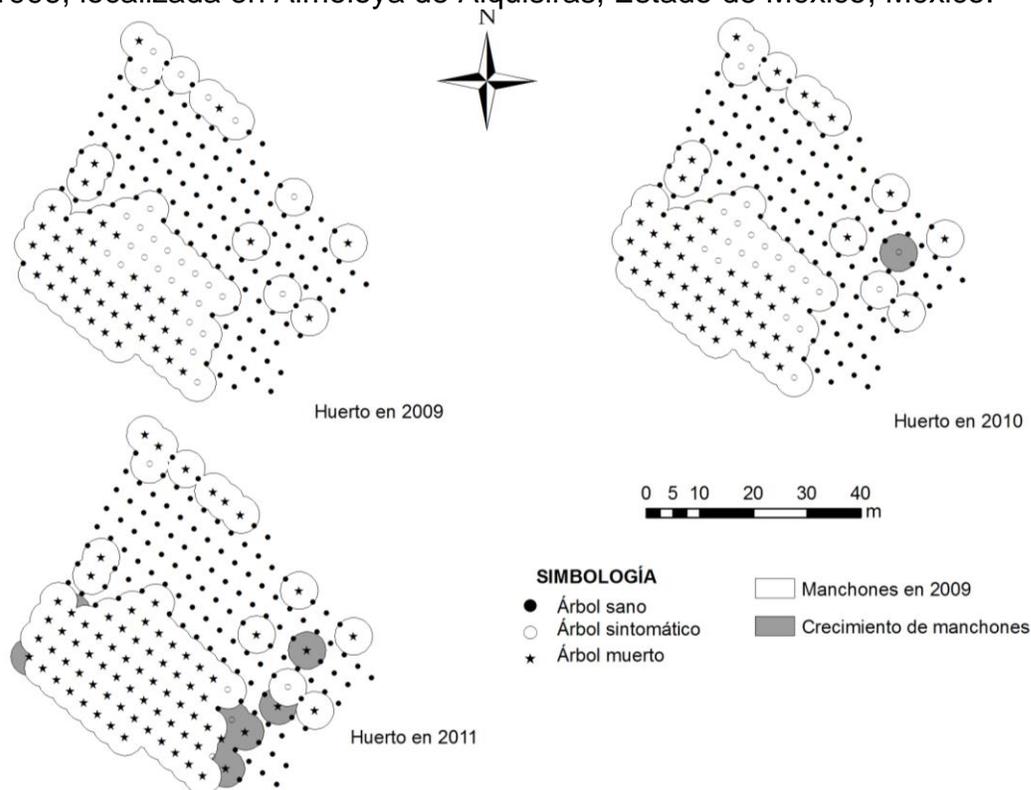


Fig. 18. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 13, establecida en 1999, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México.

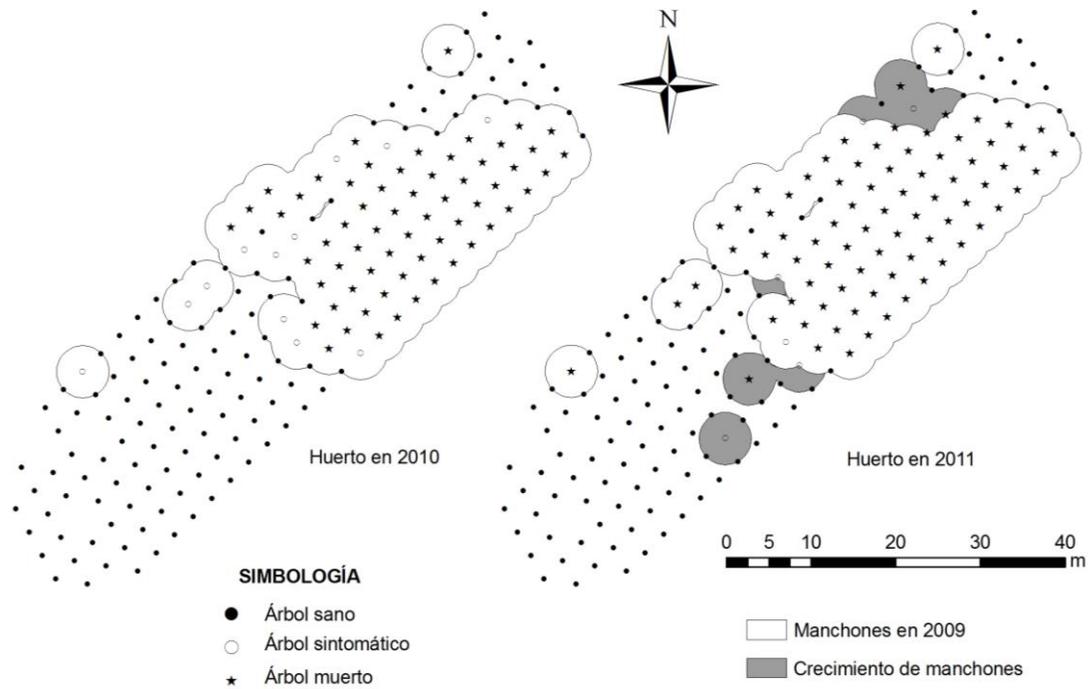


Fig. 19. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 14, establecida en 2003, localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México, México.

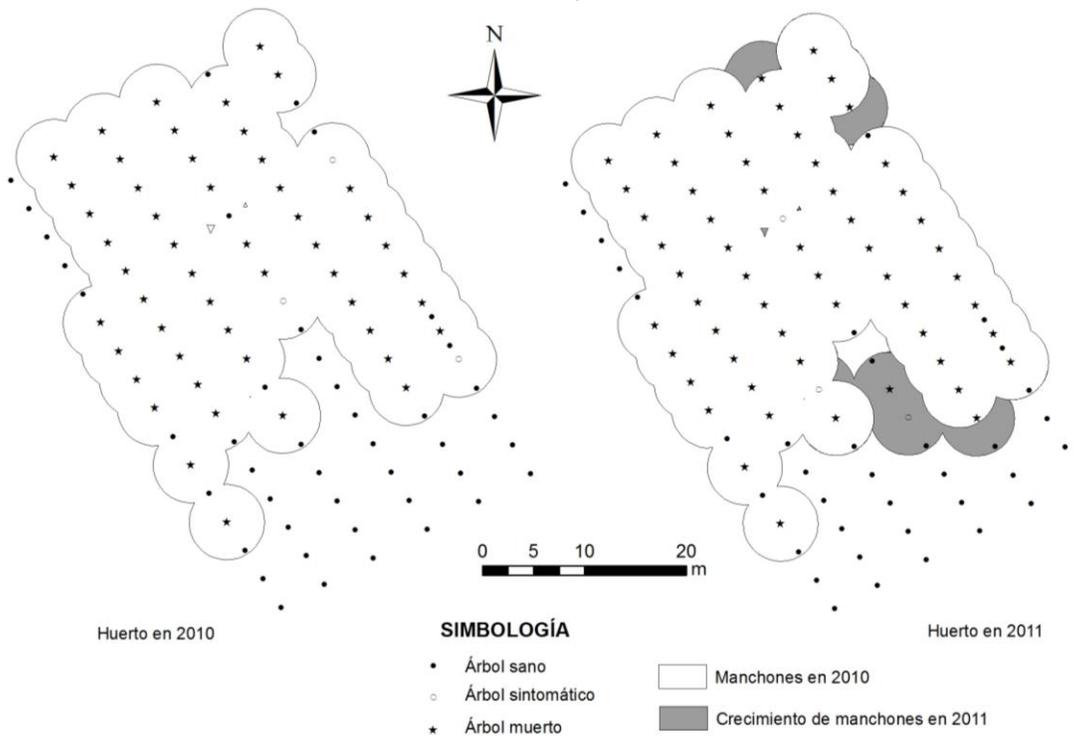


Fig. 20. Huerta de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] número 15, establecida en 2001, localizada en San Andrés, Almoloya de Alquisiras, Estado de México, México.

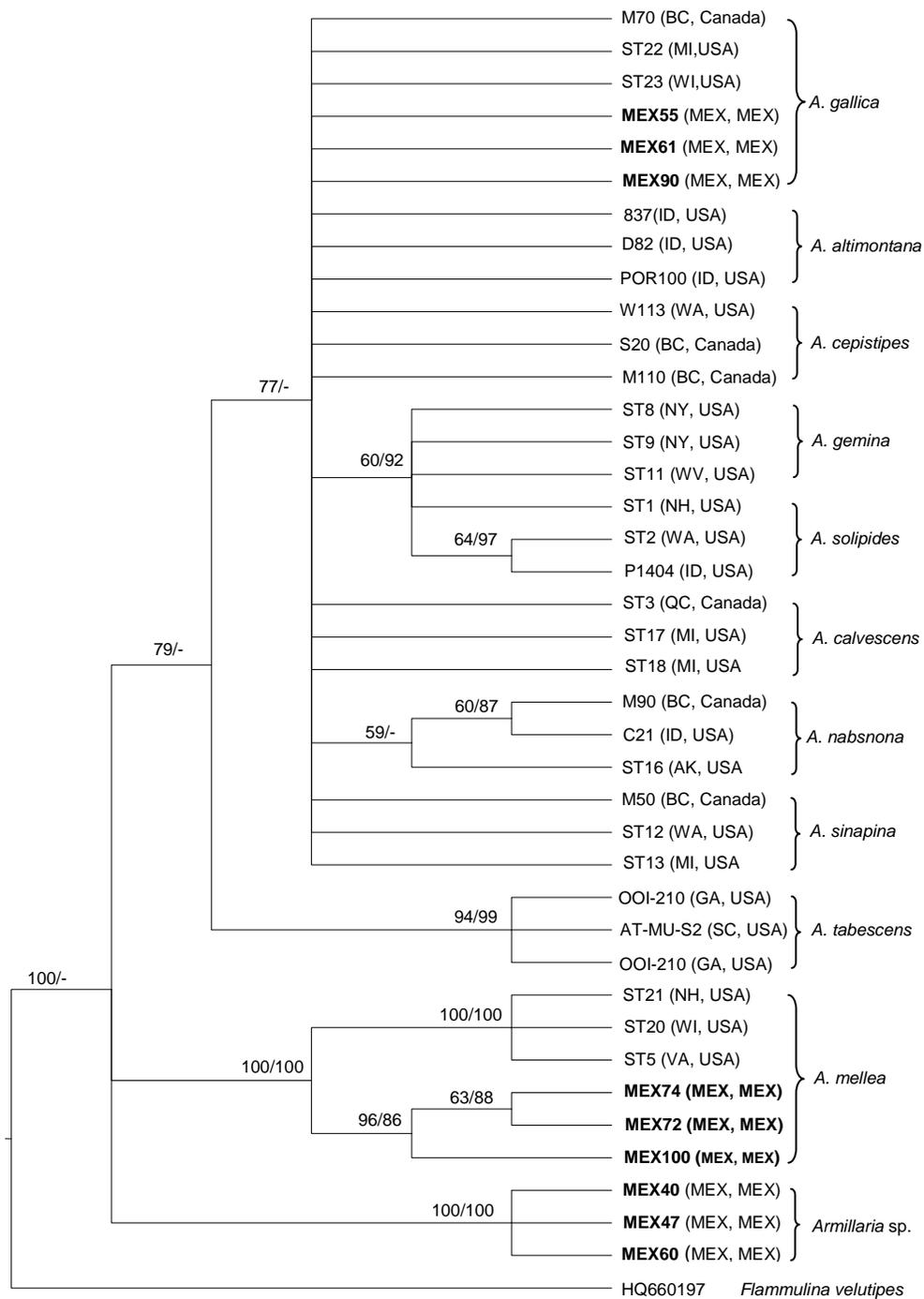


Fig. 21. Árbol bootstrap consenso por regla de mayoría de 50% generado de las secuencias de la subunidad grande del ribosoma (LSU: Dominios D1-D3 unidos con el extremo 3' de LSU). Los valores de soporte bootstrap y la probabilidad posterior se muestran arriba de los nodos. Los números de accesión del GenBank de los aislamientos de *Armillaria* spp., de México se muestran en el Cuadro 2. Los números de accesión e información de los aislamientos de las especies de USA y Canadá empleadas en este análisis fueron descritas por Kim *et al.* (2006).

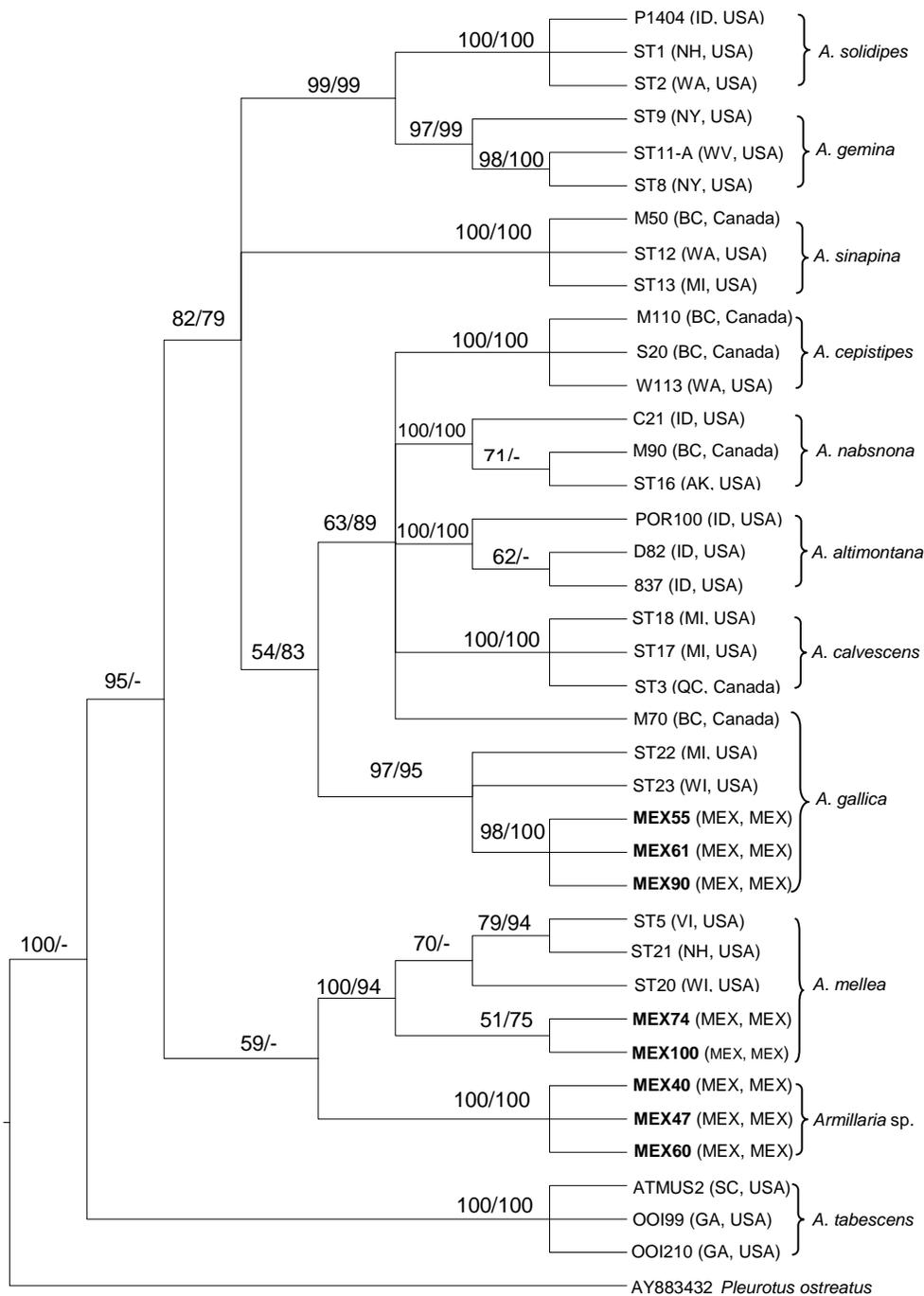


Fig. 22. Árbol bootstrap consenso por regla de mayoría de 50% generado de las secuencias del factor de elongación (*tef-1α*). Los valores de soporte bootstrap y la probabilidad posterior se muestran arriba de los nodos. Los números de accesión del GenBank de los aislamientos de *Armillaria* de México se muestran en el Cuadro 2. Los números de accesión e información de los aislamientos de las especies de USA y Canadá empleadas en este análisis fueron descritas por Ross-Davis *et al.* (2012).

CAPÍTULO III

***Armillaria mexicana*, una especie nueva de la región centro de México**

Resumen

Se describe a *Armillaria mexicana* como una nueva especie, asociada con la mortalidad de árboles de durazno en huertas del sur del Estado de México. Esta es morfológica y molecularmente distinta de otras especies de *Armillaria* reportadas en América del Norte y Sur. Se caracteriza por la ausencia de fíbulas en el basidioma; abundantes queilocistidios; esporas elípticas, hialinas, sin ornamentaciones; anillo membranáceo con estrías; pileo de color café con tono naranja; estípite cilíndrico de color café claro en la parte superior y café oscuro bajo el anillo. El análisis de las secuencias de dos regiones de ADN ribosómico (LSU D-domain, extremo 3' de LSU-IGS1) y del gen del factor de elongación-1 α (*tef-1 α*) mostró que *A. mexicana* es significativamente distinta a secuencias de otras especies de *Armillaria* disponibles en el GenBank. El análisis filogenético basado en *tef-1 α* ubicó los aislamientos de *A. mexicana* en un clado fuertemente soportado, separado de otras especies de *Armillaria* reportadas en África, América del Norte, Nueva Zelanda y Australia, entre otros.

Abstract

Armillaria mexicana is described as a new species associated with mortality of peach trees within orchards in the State of Mexico, Mexico. It is morphological and molecularly distinct from other *Armillaria* species reported in North and South

America. *A. mexicana* is characterized by absence of clamp connections in the basidioma; abundant cheilocystidia; basidiospores hyaline, ellipsoid, without any ornamentation; annulus membranous with striate; pileus surface brown with a shade of orange, stipe cylindrical, colour ranking from light brown at the apex and dark brown under the annulus. DNA sequence analysis of two rDNA regions (LSU D1-D3 domains, and 3' LSU-IGS1) and translation elongation factor-1 α (*tef-1 α*) gene showed that *A. mexicana* is significantly distinct from other *Armillaria* species reported in GenBank. Phylogenetic analysis of *tef-1 α* region show that *A. mexicana* isolates were contained in a strongly supported clade, which was separate from other *Armillaria* species reported in Africa, North America, New Zealand and Australia, among others.

3.1 INTRODUCCIÓN

El género *Armillaria* (Fr.) Staude, contiene aproximadamente 36 especies (Volk y Burdsall, 1995), muchas de las cuales tienen distribución geográfica restringida (Watling *et al.*, 1991; Volk *et al.*, 1996; Brazee *et al.*, 2012) y algunas se han considerado patógenos de árboles forestales y frutales (Hood *et al.*, 1991; Kile *et al.*, 1991). En EUA y Canadá, se han reconocido a diez especies de *Armillaria* y su identidad ha sido confirmada mediante morfología y empleando diferentes técnicas con base en los conceptos de especie biológica y especie filogenética (Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012; Brazee *et al.*, 2012). En México, algunos de los estudios relativos a *Armillaria* se encuentran en artículos relacionados con el comercio, etnobotánica y consumo de hongos, e indican la presencia, basándose en características macro y micromorfológicas de los basidiomas, de *A.*

mellea (Villareal y Pérez-Moreno, 1989; Montoya *et al.*, 2003), *A. tabescens* y *A. polymyces* (= *A. ostoyae*; Termorshuizen y Arnolds, 1987) (Villareal y Pérez-Moreno, 1989), *Armillaria* sp., (Montoya-Ezquivel *et al.*, 2001) y *A. borealis* (Pérez-Silva *et al.*, 2006). Sin embargo, la identificación de algunas especies de este género únicamente con criterios morfológicos puede ser difícil (Watling *et al.*, 1991) principalmente en especies estrechamente relacionadas (Brazee *et al.*, 2011). En otros estudios, la identificación de especies de *Armillaria* de México realizada mediante reacciones compatibles/incompatibles obtenidas del apareamiento con aislamientos haploides y diploides de USA, identificó la presencia de *A. solidipes* (citada como *A. ostoyae*; Shaw, 1989), *A. mellea*, *A. gallica*, *A. cepistipes* y una especie no determinada (Alvarado-Rosales y Blanchette, 1994; Alvarado-Rosales, 2007).

El diagnóstico de *Armillaria* con base en secuencias de ADN ha sido poco utilizado en México. Uno de estos reportes validó la identificación de *A. tabescens* mediante secuencias obtenidas de IGS1 y su comparación con las depositadas en GenBank (Kim *et al.*, 2010). Otro estudio reportó la muerte anual significativa de árboles de durazno en huertas del Estado de México asociada con diferentes especies de *Armillaria* identificadas mediante análisis de secuencias de ADN ribosomal y del factor de elongación (*tef-1 α*) (capítulo II de esta tesis) y la presencia de una probable especie de *Armillaria* no descrita, en la literatura nacional e internacional, de amplia distribución en huertas comerciales de durazno del sur del Estado de México.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar molecular y morfológicamente a una especie de *Armillaria* probablemente no descrita del Estado de México y proponerla como especie nueva.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Aislamientos empleados

Los basidiomas de *Armillaria* sp., fueron colectados de la base de tallos de tres árboles muertos de durazno que integraban focos de infección compuesto por varios árboles en dos huertas comerciales localizadas en la localidad de Cruz de Piedra, en Coatepec Harinas, Estado de México. Se seleccionó un basidioma representativo de cada muestra y en condiciones asépticas se tomaron porciones del contexto de cada hongo para obtener tres aislamientos diploides empleados para la descripción molecular. Los aislamientos se depositaron en la colección del RMRS, Servicio Forestal, USDA. Los basidiomas deshidratados se depositarán en el herbario del Instituto de Ecología (INECOL) en Xalapa, Veracruz.

3.2.2 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Para la extracción de ADN los aislamientos fueron subcultivados sobre filtros de nylon estériles sobrepuestos en el medio malta-agar al 3% (3% extracto de malta, 3% dextrosa, 1.0% peptona, 1.5% agar) en cajas Petri mantenidas aproximadamente a 22°C en la oscuridad por tres semanas. Posteriormente el micelio se raspó del papel filtro y se molió en una solución buffer empleando un FastPrep[®]. El ADN se purificó empleando DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad y calidad del ADN fue verificado empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). La mezcla de reacción para la PCR contuvo aproximadamente 100 ng de ADN template, 2.5 U Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), buffer de

reacción, 4 mM de MgCl₂, 200 μM dNTPs y 0.5 μM de cada primers en un volumen total de 50 μl. La amplificación de las regiones LSU dominios-D y extremo 3' de LSU-IGS1 se realizó mediante los protocolos de Kim *et al.* (2006). La amplificación de *tef-1α* se realizó utilizando los primers ARMEF-F3A (5' CGT GAY TTY ATC AAG AAC ATG 3') y ARMEF-R (5' TAC CCG TTC GGC GAT CAA TCT 3') diseñados por J.W. Hanna (USDA Forest Service, RMRS) mediante el protocolo descrito por Ross-Davis *et al.* (2012).

3.2.3 Comparación de secuencias de ADN y análisis filogenético

Las secuencias se editaron y alinearon manualmente con BioEdit[®] (ver. 7.1.3; Ibis Biosciences, Inc., Carlsbad, CA, USA; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Los sitios polimórficos se codificaron empleando los códigos de la IUPAC para nucleótidos ambiguos. Las secuencias de LSU D-dominios, extremo 3' de LSU-IGS1 y *tef-1α* de aislamientos de *Armillaria* spp., obtenidos de árboles de durazno infectados en el Estado de México se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante búsqueda de nucleótidos con BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para el análisis filogenético se emplearon las secuencias del *tef-1α* de los aislamientos MEX85, MEX87 y MEX88 y de otras especies de *Armillaria* previamente reportadas por Maphosa *et al.* (2006), Hasegawa *et al.* (2010), Ota *et al.* (2011), Mulholland *et al.* (2012) y Ross-Davis *et al.* (2012). Adicionalmente, se emplearon

secuencias de *A. puiggarii* (FJ618636: PPg85-63), *A. mellea* (EU434714:Napa186ssb) y *A. heimii* (FJ618651:PH87.24, FJ618644:K59). Como especie fuera de grupo se empleó a *Pleurotus ostreatus* (AY88343: AFTOL-ID 564) por su similitud con secuencias de *A. tabescens*. Las secuencias de *tef-1 α* se analizaron empleando neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) en el programa Phylogenetic Analysis Using Parsimony, PAUP* (ver. 4.0b10; Sinauer Associates, Inc.). El valor de las ramas del árbol consenso fue obtenido mediante un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones bootstrap (Felsenstein, 1985).

3.2.4 Análisis morfológico de basidiomas

La descripción macroscópica se realizó con basidiomas frescos, las dimensiones (longitud y diámetro) del píleo y estípite se realizaron con un vernier digital Truper[®]. Las estructuras microscópicas se observaron con un microscopio compuesto (Spencer[®]); a partir de secciones de basidiomas secos las cuales fueron rehidratados con KOH al 3% y montadas en rojo congo al 1%. De cada muestra (holotipos MEX87 y MEX88) se determinó (n=20) el tamaño (longitud y en ancho) de basidiosporas, basidios y queilocistidios, así como longitud de las células del estípite, pileipelis y contexto, con un micrómetro ocular. Adicionalmente, se incluyeron las características morfológicas de basidiomas cuyos aislamientos tuvieron valores altos de similitud con *A. mellea* s. str. (MEX74, MEX84 y MEX100; capítulo II).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análisis de las secuencias de ADN

Las secuencias del extremo 3' de LSU-IGS1 de los aislamientos MEX85, MEX87 y MEX88 mostraron 100% de similaridad basado en 100% de cobertura con MEX40 (KC111007), MEX43 (JX281802), MEX46 (JX281803, JX281804), MEX47 (KC111008) y MEX57 (JX281805, KC111009) que representan a *Armillaria* spp.,-RDER; una probable especie no descrita de México (capítulo II de esta tesis) designada como *A. mexicana*, una nueva especie asociada a la mortalidad de árboles de durazno. De la cual sus secuencias de la región IGS1 (excluyendo el extremo 3' de LSU) no tuvieron similaridad >5% con ninguna secuencia en el GenBank (noviembre de 2012). Con base, en el 32% de cobertura que incluye el extremo 3' de LSU, las secuencias de *A. mexicana* tuvieron 90-94% de similaridad con *A. singula* (D89926), *A. mellea* (AY509188) y *A. altimontana* (AY509181).

La región LSU-D dominios de *A. mexicana* (aislamiento MEX87) tuvo 99-100% de similaridad basado en 100% de cobertura con *Armillaria* sp.,-RDER (KC111002, JX281813, JX281812, KC111003, KC111004, JX281814, KC111005). Sin embargo, *A. mexicana* no coincidió con valores altos de similaridad con alguna de las diez especies de *Armillaria* actualmente reconocidas en América del Norte y la especie más cercana fue *A. mellea* de USA (AY213584, AY213586, AY213587) y México (JX281807, JX281806, JX281808) con 93% de similaridad basado en 100% de cobertura. Asimismo, tampoco coincidió con valores altos de similaridad con alguna de las especies de América Central y Sur del GenBank, alcanzando de 90-92% de similaridad con 87-100% de cobertura con las secuencias de *A. affinis* (JMER.126),

A. puiggarii (FJ618722), *A. montagnei* (FJ711623), *A. luteobubalina* (DQ338562, DQ338558), *A. sparrei* (FJ618750), etc.

Las comparaciones de las secuencias de la región *tef-1 α* de los aislamientos MEX85, MEX87 y MEX88 también revelaron similitud alta (100%) con las de *Armillaria* sp.,-RDER (KC111016, KC111017, KC111018).

3.3.2 Análisis filogenético

Las secuencias de IGS1 (excluyendo la región del extremo 3' de LSU) de *A. mexicana* no pudieron alinearse sin ambigüedad con otras especies de *Armillaria*; por lo tanto, el análisis filogenético de esta región no se realizó (ver Resultados y Discusión del capítulo II en esta tesis).

El análisis filogenético de la región LSU no se muestra en el presente estudio. Sin embargo, permitió separar los aislamientos de *A. mexicana* de las especies actualmente reportadas en América del Norte (resultados y discusión del capítulo II de esta tesis) y de las especies de América del Sur disponibles en GenBank (datos no mostrados).

El análisis filogenético de las secuencias del *tef-1 α* de las especies de *Armillaria* empleadas en el presente estudio reveló cinco clados principales (Fig. 23). El primero (74% de soporte bootstrap) contuvo los aislamientos que representan a las especies con estípites exanulados (*A. tabescens* y *A. ectypa*). El segundo (100% de soporte bootstrap) estuvo constituido únicamente por los aislamientos de *A. mexicana*. En el tercer clado principal (56% soporte bootstrap) se agruparon los aislamientos de especies reportadas en África (*Armillaria* sp., *A. fuscipes*, *A. heimii*),

América del Sur (*A. luteobubalina*), Nueva Zelanda (*A. limonea*, *A. novae-zelandia*), Australia (*A. hinnulea*, *A. fumosa*, *A. pallidula*, *A. novae-zelandia*), islas Guadalupe en las Antillas (*A. puiggarii*) y Kagoshima, en el sur de Japón (*Armillaria* sp.). El cuarto clado (100%) comprendió aislamientos de *A. mellea*, dividido en cinco subclados que representaron aislamientos de regiones diferentes del Hemisferio Norte. En el cuarto clado, los aislamientos MEX74, MEX84 y MEX100 del Estado de México formaron un subclado con 64% de soporte bootstrap. El quinto clado principal (55% soporte bootstrap) estuvo formado a su vez por dos subclados. En el primero (75%) se ubicaron *A. gallica*, *A. calvescens*, *A. altimontana*, *A. nabsnona*, *A. cepistipes* y *Armillaria* sp. (Nag.E). El segundo (71%) estuvo constituido por *A. gemina*, *A. borealis-X* (Muholland *et al.* 2012), *A. solidipes* (= *A. ostoyae*) de América del Norte y Europa en clados separados. Dentro de este quinto clado, *A. sinapina* de EUA y *A. borealis-Y* no se agruparon dentro de ninguno de los dos subclados.

3.3.3 Taxonomía

Armillaria mexicana sp. nov. (Figs. 24 y 25).

Basidioma cespitoso, aunque puede presentarse muy raramente solitario. Píleos umbonados cuando jóvenes y de convexo a plano hasta infundibuliforme ocasionalmente en ejemplares maduros, de 28.0-107.0 mm de diámetro en ejemplares maduros no deshidratados, de color café claro en el centro y café oscuro en el margen cuando jóvenes y café oscuro con tono naranja en ejemplares maduros (Fig. 24). Estípite central, cilíndrico, fibriloso, de color café claro en la parte superior y café oscuro con un ligero tono naranja bajo el anillo en ejemplares maduros, de 74.0 a 94.0 mm de largo x 5.0 mm a 8.0 mm de ancho en ejemplares frescos, ligeramente

escamoso, la base no presentó rizomorfos en el sitio de colecta, aunque estos se produjeron abundantemente *in vitro* (Fig. 25). Anillo presente, membranáceo con estrías, de color beige y de 5-7 mm de diámetro en ejemplares secos. Láminas decurrentes de color beige y borde liso. Lamélulas presentes.

Basidiosporas de 7-10 (-12) x 5-7 μm hialinas, elípticas, presentan pequeñas gúttulas en el interior, pared delgada, sin ornamentaciones. Basidios de (32-) 36-45 x 8-10(-11) μm , hialinos, clavados con 4 esterigmas, pared delgada, sin fíbulas. Queilocistidios de 20-40 (-46) x (3-) 4-7 (-8) (-11) μm hialinos, pared delgada, sin fíbulas. Pileipellis de 40-60 μm de ancho con hifas de 8-13 μm hialino a ligeramente amarillento, sin fíbulas. Contexto de 100-130 μm de ancho con hifas hialinas de 6-10 μm , sin fíbulas. Trama himenoforal regular y con hifas de 5-10 μm , hialinas, sin fíbulas. Hifas del estípite de 31-47 x 20-27 μm hialinas, ligeramente amarillentas, sin fíbulas.

Holotipos: Basidiomas de MEX87 y MEX88 fueron colectados por R.D. Elías-Román en 2011, en dos árboles de durazno muertos [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en una huerta comercial (N18°56'11.3" WO 99°49'07.9"), localizada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México y se depositaron en el herbario del INECOL en Xalapa, Veracruz (en proceso). Los aislamientos se depositaron en la colección de *Armillaria* spp., del USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Forestry Sciences Laboratory, Moscow, Idaho, USA.

3.3.4 Habitat

Gregaria, lignícola en la base de los tallos de árboles de durazno muertos en huertas comerciales establecidas en sitios previamente ocupados por especies forestales nativas de *Pinus-Quercus* del Estado de México, aproximadamente a 2200 msnm.

3.4 DISCUSIÓN

Se documentan las características de *A. mexicana* como nueva especie (no descrita con anterioridad) ampliamente distribuida y asociada con la mortalidad del durazno en huertas del sur del Estado de México, México (ver capítulo II). Algunas de las características morfológicas distintivas de esta especie son la ausencia de fíbulas en el basidioma; así como abundantes queilocistidios; anillo membranáceo con estrías; pileos umbonados cuando jóvenes y de convexo a plano hasta infundibuliforme al madurar, de color café con tono naranja en ejemplares maduros; estípite cilíndrico de color café claro en la parte superior y café oscuro bajo el anillo.

La carencia de fíbulas en la base de los basidios en *A. mexicana* la distingue de siete especies de *Armillaria* (*A. nabsnona*, *A. gallica*, *A. calvescens*, *A. cepistipes*, *A. sinapina*, *A. solidipes* y *A. gemina*) de un total de diez especies reportadas actualmente en América del Norte (Volk y Burdsall, 1995), las cuales presentan estas estructuras en algunos o en todos los basidios (Bérubé y Dessureault, 1988; Bérubé y Dessureault, 1989; Burdsall y Volk, 2008; Volk *et al.*, 1996).

No obstante, la ausencia de fíbulas en basidios y en cualquier parte del basidioma que caracterizan a *A. mexicana* la relaciona con *A. mellea* s. str. (Motta y Korhonen, 1986; Termorshuizen y Arnolds, 1987; Pegler, 2000). Sin embargo, ambas contrastan en la forma y coloración del estípite, coloración del píleo y estructura del anillo. El estípite de *A. mellea* es agudo o atenuado en la base (Wingfield *et al.*, 2010; Fig. 24-26), de color casi blanco en estadios juveniles tornándose amarillo a café u olivo en ejemplares maduros y el píleo es de color amarillo-ámbar cuando jóvenes tornándose amarillo claro con el tiempo (Motta y Korhonen, 1986; Termorshuizen y Arnolds, 1987). Las características previamente señaladas para *A. mellea*, así como píleos hemisféricos en estadios juveniles, anillo membranoso sin estrías y de apariencia algodonosa, basidios y células del estípite sin fíbulas, también fueron observados en basidiomas colectados en el Estado de México (Fig. 26) cuyas secuencias de ADN tuvieron similitud alta con aislamientos de *A. mellea* de USA (capítulo II de esta tesis).

La ausencia de escamas en el píleo y presencia de anillo en el estípite pueden distinguir a *A. mexicana* de otras dos especies de América del Norte. Específicamente, de *A. altimontana* que se caracteriza por tener escamas en el píleo (Brazee *et al.*, 2012) y *A. tabescens* que es la única especie exanulada reportada en América del Norte (Anderson y Stasovsky, 1992). También, las características del píleo en *A. mexicana* la pueden distinguir de *A. grisomellea* que tiene píleo ornamentado (Kile y Watling, 1983).

Los resultados de este estudio muestran que las diferencias entre *A. mexicana* y *A. mellea* son principalmente macromorfológicas, la ausencia de fíbulas en basidios no permite identificar ambas especies.

En América del Sur, *A. paulensis* es otro taxón con basidios sin fíbulas, y se caracteriza por coloración rosácea de lamelas y pigmentación del estípite que varía de rosáceo en la parte superior, café grisáceo bajo el anillo y oliváceo en la base (Lima *et al.*, 2008); filogenéticamente *A. paulensis* está relacionada estrechamente con *A. luteobubalina* (Pildain *et al.*, 2009). Por otra parte, Lima *et al.* (2008) indicaron que *A. paulensis* es morfológicamente similar con *A. melleorubens* reportada en Cuba, que tampoco presenta fíbulas y tiene esporas ornamentadas (Baroni, 1981); sin embargo, Baroni (1981) no mencionó la presencia de queilocistidios, ni tampoco la parte del basidioma donde se registró la ausencia de fíbulas en *A. melleorubens*. En Costa Rica, América Central, *A. affinis* es otra especie cuyos basidios carecen de fíbulas y se caracteriza por basidios de 24-26.8 x 5.5-7.2 μm de longitud, etc. (Singer, 1989). Las esporas no ornamentadas, abundantes queilocistidios, y basidios de (32-) 36-45 x 8-10(-11) μm presentes en *A. mexicana* pueden diferenciarla de *A. melleorubens* y *A. affinis*. Adicionalmente, la comparación de la región LSU de *A. mexicana* tuvo 92% de similaridad y 100% de cobertura con *A. affinis* reportada por Moncalvo *et al.* (2002). Por otra parte, *A. procera*, *A. tigrensis* y *A. yungensis*, reportadas en América del Sur, cuyas secuencias no se encuentran disponibles en el GenBank, poseen características contrastantes con *A. mexicana*. Específicamente, *A. tigrensis* tiene estípites bulbosos y basidios con o sin fíbulas; *A. yungensis* tiene basidios con 2-4 esterigmas y con fíbulas (Singer, 1970), *A. procera* tiene estípites a menudo subbulbosos y anillo membranáceo ornamentado. *A. viridiflava* es otra especie la cual ha sido asignada geográficamente en América del Sur (Volk y Burdsall, 1995). Sin embargo, Singer (1989) indicó su presencia en España y la describe con abundantes basidios con fíbulas; lo cual la distingue de *A. mexicana*.

La persistencia del anillo al secado o deshidratado es otra característica que difiere en algunos taxones de *Armillaria*. Por ejemplo, el anillo membranoso-escamoso de *A. montagnei* y *A. mexicana* persisten a tal condición, a diferencia de los anillos de *A. novae-zealandiae*, *A. umbrinobrunnea* y *A. sparrei* que se rompen o quedan remanentes al secarse (Pildain *et al.*, 2010).

Los análisis de las secuencias de ADN del extremo 3' de LSU-IGS1, LSU dominios-D y *tef-1 α* mostraron que *A. mexicana* es diferente de cualquiera de las especies de *Armillaria* disponibles en el GenBank y pueden emplearse para confirmar la identidad de esta especie nueva de México.

El análisis filogenético basado en las secuencias de *tef-1 α* mostró que *Armillaria* spp., se agruparon en cinco clados principales; uno de los cuales estuvo formado únicamente por los aislamientos de *A. mexicana*. Resultados similares en relación con la agrupación de los clados principales fueron obtenidos por Klopfenstein *et al.* (2012) empleando SplitsTree (Huson y Bryant, 2006). En ambos análisis, *A. mexicana* y *A. mellea* se ubicaron en clados distintos. El de *A. mellea* estuvo formado por diferentes subclados distinguidos por su origen geográfico, esta variación ha sido reportada previamente y sugiere que *A. mellea* puede contener especies diferentes o crípticas (Coetzee *et al.*, 2000).

Las características morfológicas y moleculares de *A. mexicana* permiten identificarla de las diez especies actualmente reconocidas en América del Norte y de otras 12 especies (*A. affinis*, *A. griseomellea*, *A. umbrinobrunnea*, *A. melleorubens*, *A. montagnei*, *A. novae-zealandiae*, *A. procera*; *A. puiggarii*, *A. sparrei*, *A. tigrensis*, *A. yugensis* y *A. paulensis*) que han sido reportadas en América Central y del Sur

(Volk y Burdsall, 1995; Lima *et al.*, 2008; Pildain *et al.*, 2010), pero que no han sido previamente descritas en América del Norte. Molecularmente, *A. mexicana* también difirió de los aislamientos de *Armillaria* spp. Nag E, *A. borealis* -X y Y, *A. mellea*, *Armillaria* sp., y *A. ectypa* reportadas en Europa y Asia.

3.5 LITERATURA CITADA

Alvarado-Rosales, D. 2007. Pudrición de raíz por *Armillaria*/ *Armillaria* root rot. *Armillaria* (Fr.) Staude. (Agaricales, Marasmiaceae). *In*: Cibrián T., D., D. Alvarado R. y S. E. García D. (eds). Enfermedades Forestales en México. Mundi-Prensa. UACH, Chapingo, México. pp: 211-215.

Alvarado-Rosales, D., and R. A. Blanchette. 1994. *Armillaria* species from forest of central Mexico. *Phytopathology* 84:1106.

Baroni, T. J. 1981. Collections in the Farlow Herbarium: new species of *Melanophyllum* and *Gastrocybe*, type studies on *Armillaria* and *Stropharia*. *Mycologia* 73: 181–197.

Burdsall, H. H., and T. J. Volk. 2008. *Armillaria solidipes*, an older name for the fungus called *Armillaria ostoyae*. *North American Fungi* 3: 261-267.

Bérubé, J. A., and M. Dessureault. 1988. Morphological characterization of *Armillaria ostoyae* and *Armillaria sinapina* sp.nov. *Canadian Journal of Botany* 66: 2027-2034.

Bérubé, J. A., and Dessureault M. 1989. Morphological Studies of the *Armillaria mellea* complex: Two new species: *A. gemina* and *A. calvescens*. *Mycologia* 81: 216-225.

- Brazee, N.J., J. P. Hulvey, and R. L. Wick. 2011. Evaluation of partial *tef1*, *rpb2*, and *nLSU* sequences for identification of isolates representing *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. *Fungal Biology* 115: 741-749.
- Brazee, J. N., B. Ortiz-Santana, M. T. Banik, and D. L. Lindner. 2012. *Armillaria altimontana*, a new species from the western interior of North America. *Mycologia* 104: 1200-5.
- Coetzee, M.P.A., B. D. Wingfield, T. C. Harrington, D. Dalevi, T. A. Coutinho, and M. J. Wingfield. 2000. Geographical diversity of *Armillaria mellea* s.s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia* 92: 105-113.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Hasegawa, E., Y. Ota, T. Hattori, and T. Kikuchi. 2010. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using elongation factor-1 alpha gene. *Mycologia*.102: 898-910.
- Hood, I, A.; D. B. Redfern, and G. A. Kile. 1991. *Armillaria* in planted host. *In*: Shaw, C. G., and G. A. Kile (eds). *Armillaria Root Disease*. USDA Agricultural Handbook No 691, Washington DC, USA. pp 122-139.
- Huson, D.H., and D. Bryant. 2006. [Application of phylogenetic networks in evolutionary studies](#). *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Kile, G. A., and R. Watling. 1983. *Armillaria* species from south-eastern Australia. *Transactions British Mycological Society* 81: 129-140.

- Kile, G. A., G. I. McDonald, and J. W. Byler. 1991. Ecology and disease in natural forest. *In*: Shaw, C. G., and G. A. Kile (eds). *Armillaria* root disease. USDA Agricultural Handbook No 691, Washington DC, USA. pp 102-121.
- Kim, M.-S., N. B. Klopfenstein, J. W. Hanna, and G. I. McDonald. 2006. Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology* 36: 145-164.
- Kim, M.-S., N. B. Klopfenstein, J. W. Hanna, P. Cannon, R. Medel, and A. López. 2010. First report of *Armillaria* root disease caused by *Armillaria tabescens* on *Araucaria araucana* in Veracruz, México. *Plant Disease* 94: 784.
- Klopfenstein, N. B., J. W. Hanna, A. L. Ross-Davis, J. E. Stewart, Y. Ota, R. Medel-Ortiz, A. López-Ramírez, R. D. Elías-Román, D. Alvarado-Rosales, and M.-S. Kim. 2012. *Armillaria* phylogeny based on *tef-1 α* sequences suggests ongoing divergent speciation within the boreal floristic Kingdom. *In*: Proceedings of the 60th Western International Forest Disease Work Conference. 8- 12 October 2012. Tahoe City, CA, USA. (póster en edición).
- Lima, M. L. A., T. Asai, and M. Capelari. 2008. *Armillaria paulensis*: a new South American species. *Mycological Research* 112: 1122-1128.
- Maphosa, L., B. D. Wingfield, M. P. A. Coetzee, E. Mwenje, and M. J. Wingfield. 2006. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 35: 513-520.

- Moncalvo, J.-M, R. Vilgalys, S. A. Redhead, J. E. Johnson, T. Y. James, M. C. Aime, V. Hofstetter, S. J. W. Verduin, E. Larsson, T. J. Baroni, R. G. Thorn, S. Jacobsson, H. Clemencon, and O. K. Miller Jr. 2002. One hundred and seventeen of clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400.
- Montoya-Esquivel, A., A. Estrada-Torres, A. Kong, and L. Juárez-Sánchez. 2001. Commercialization of wild mushrooms during market days of Tlaxcala, México. *Micologia Aplicada International* 13: 31-40.
- Montoya, A., O. Hernández-Totomoch, A. Estrada-Torres, A. Kong, and J. Caballero. 2003. Traditional knowledge about mushrooms in a Nahua community in the estate of Tlaxcala, México. *Mycologia* 95: 793-806.
- Motta, J. J., and K. Korhonen. 1986. A Note on *Armillaria mellea* and *Armillaria bulbosa* from the Middle Atlantic States. *Mycologia* 78: 471-474.
- Mulholland, V., G. A. MacAskill, B. E. Laue, H. Steele, D. Kenyon, and S. Green. 2012. Development and verification of a diagnostic assay based on EF-1 α for the identification of *Armillaria* species in Northern Europe. *Forest Pathology* 42: 229-238.
- Ota, Y.; M.-S. Kim, H. Neda, N. B. Klopfenstein, and E. Hasegawa. 2011. The phylogenetic position of an *Armillaria* species from Amami-Oshima, a subtropical island of Japan, based on elongation factor and ITS sequence. *Mycoscience* 52: 53-58.

- Pegler, D. N. 2000. Taxonomy, nomenclature and description of *Armillaria*. In: Fox, R. T. V. (ed). *Armillaria root rot: Biology and control of Honey fungus*. Intercept. U. K. pp 81-93.
- Perez-Silva, E., M. Esqueda, T. Herrera y M. Coronado. 2006. Nuevos registros de Agaricales de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 23-33.
- Pildain, M. B., M. P. A. Coetzee, M. Rajchenberg, R. H. Petersen, M. J. Wingfield, and B. D. Wingfield. 2009. Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes. *Mycological Progress* 8: 181-194.
- Pildain, M. B., M. P. A. Coetzee, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, and M. Rajchenberg. 2010. Taxonomy of *Armillaria* in the Patagonian forests of Argentina. *Mycologia* 102: 392-403.
- Ross-Davis, A.L., J. W. Hanna, M.-S. Kim, and N. B. Klopfenstein. 2011. Advances toward DNA-based identification and phylogeny of North American *Armillaria* species using elongation factor-1alpha gene. *Mycoscience* 53: 161-165.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Singer, R. 1970. A monograph of the subtribe Omphalinae. *Flora Neotropica Monograph No. 3 Omphalinae (Clitocybeae-Tricholomataceae-Basidiomycetes)* 3:1-84.
- Singer, R. 1989. New taxa and new combinations of Agaricales (Diagnoses fungorum novorum agaricalium IV) *Fieldiana (Bot.) New series* 21.

- Shaw, C.G. 1989. *Armillaria ostoyae* associated with mortality of new hosts in Chihuahua, Mexico. *Plant Disease* 73: 775.
- Termorshuizen, A. A. D., and E. E. F. Arnolds. 1987. On the nomenclature of the European species of the *Armillaria mellea* group. *Mycotaxon* 30: 101-116.
- Villareal, L. y J. Pérez-Moreno. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* 2: 77-114.
- Volk, T.J., and H. H. Burdsall. 1995. A nomenclatural study of *Armillaria* and *Armillariella* species (Basidiomycotina, Tricholomataceae). *Synopsis Fungorum* 8. Fungiflora. Oslo, Norway. 121 p.
- Volk, T. J., H. H. Burdsall, and M. T. Banik. 1996. *Armillaria nabsnona*, a new species from western North America. *Mycologia* 88: 484-491.
- Watling, R., G. A. Kile, and N. M. Gregory. 1982. The genus *Armillaria*-Nomenclature, typification, the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation. *Transactions British Mycological Society* 78: 271-285.
- Watling, R., G. A. Kile, and H. H. Burdsall. 1991. Nomenclature, taxonomy, and Identification. *In*: Shaw, C. G., and G. A. Kile (eds). *Armillaria Root Disease*. USDA Agricultural Handbook No 691, Washington, D.C. pp 1-9.
- Wingfield, M. J., M. P. A. Coetzee, P. W. Crous, D. Six, and B. D. Wingfield. Fungal phoenix rising from the ashes?. 2010. *International Mycological Association* 1: 149–153.

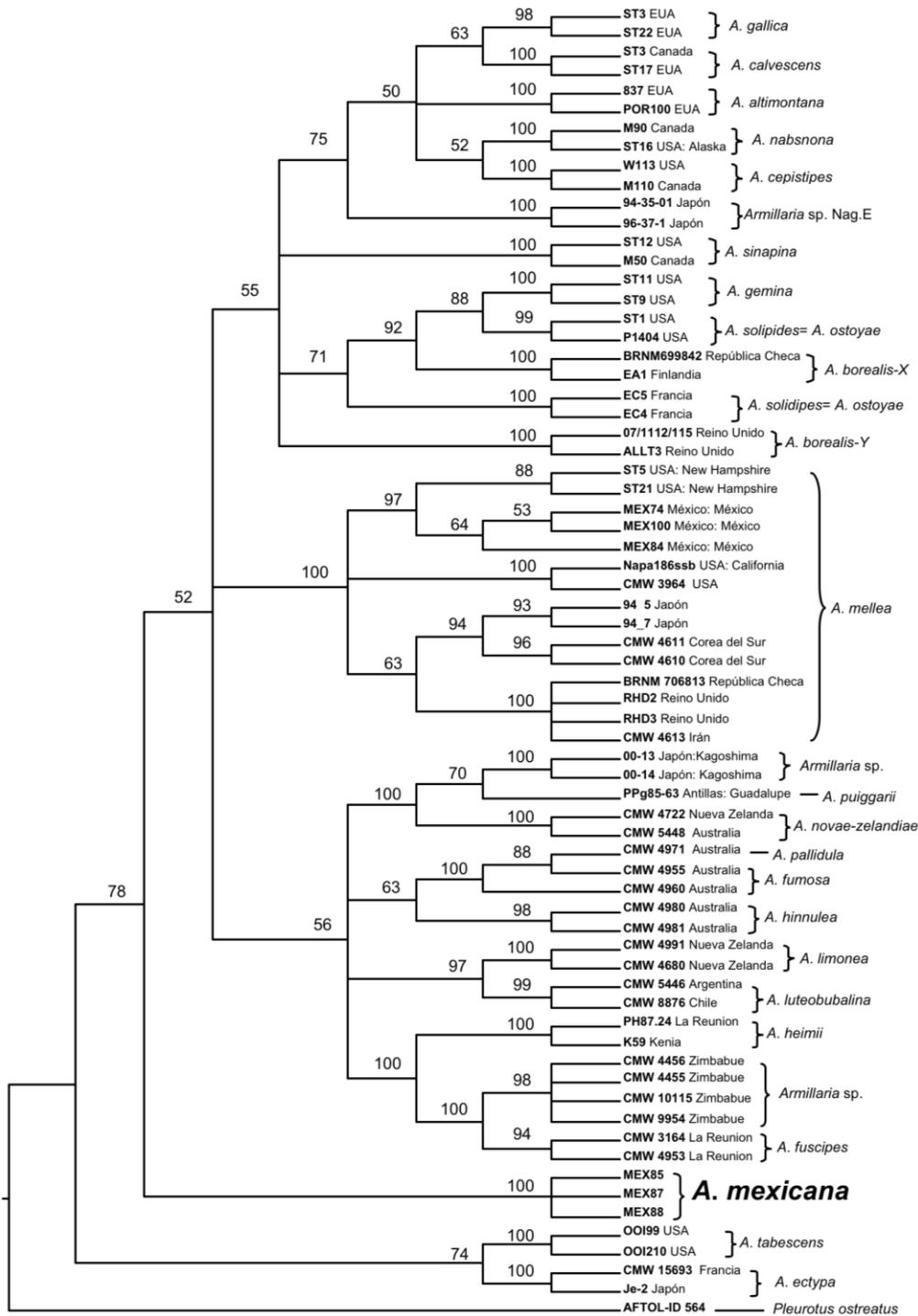


Fig. 23. Árbol bootstrap consenso del 50% generado con el método Neighbour-Joining con las secuencias del factor de elongación (*tef-1α*) de los aislamientos de *A. mexicana* y de otras secuencias del GenBank. Los valores de soporte bootstrap se muestran arriba de los nodos.



Fig. 24. *Armillaria mexicana* asociada con la muerte de árboles en huertas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] del Estado de México, México: (A) Holotipo MEX88 basidiomas maduros, anillo membranoso con estrías (B) MEX85 basidiomas jóvenes, se aprecian los píleos umbonados de color café claro en el centro y café oscuro en el margen.

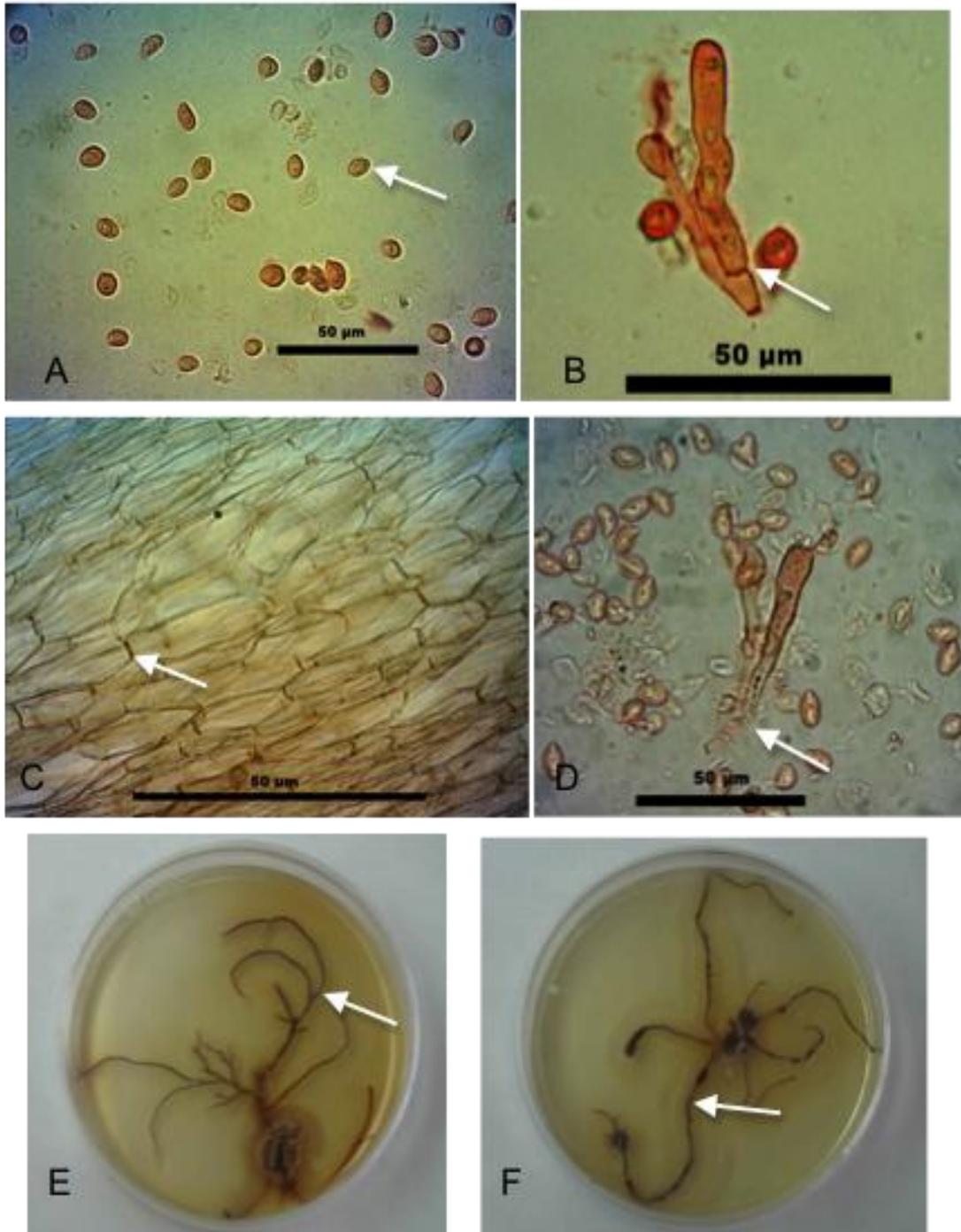


Fig. 25. *Armillaria mexicana* holotipo MEX88: (A) Basidiosporas elípticas (B) Queilocistidio sin fíbula (C) Células del estípite sin fíbulas (D) Basidio sin fíbula. Rizomorfos de *Armillaria mexicana*, en medio de agar al 1.5% + extracto de malta al 2%: (E) MEX81 (F) MEX60.

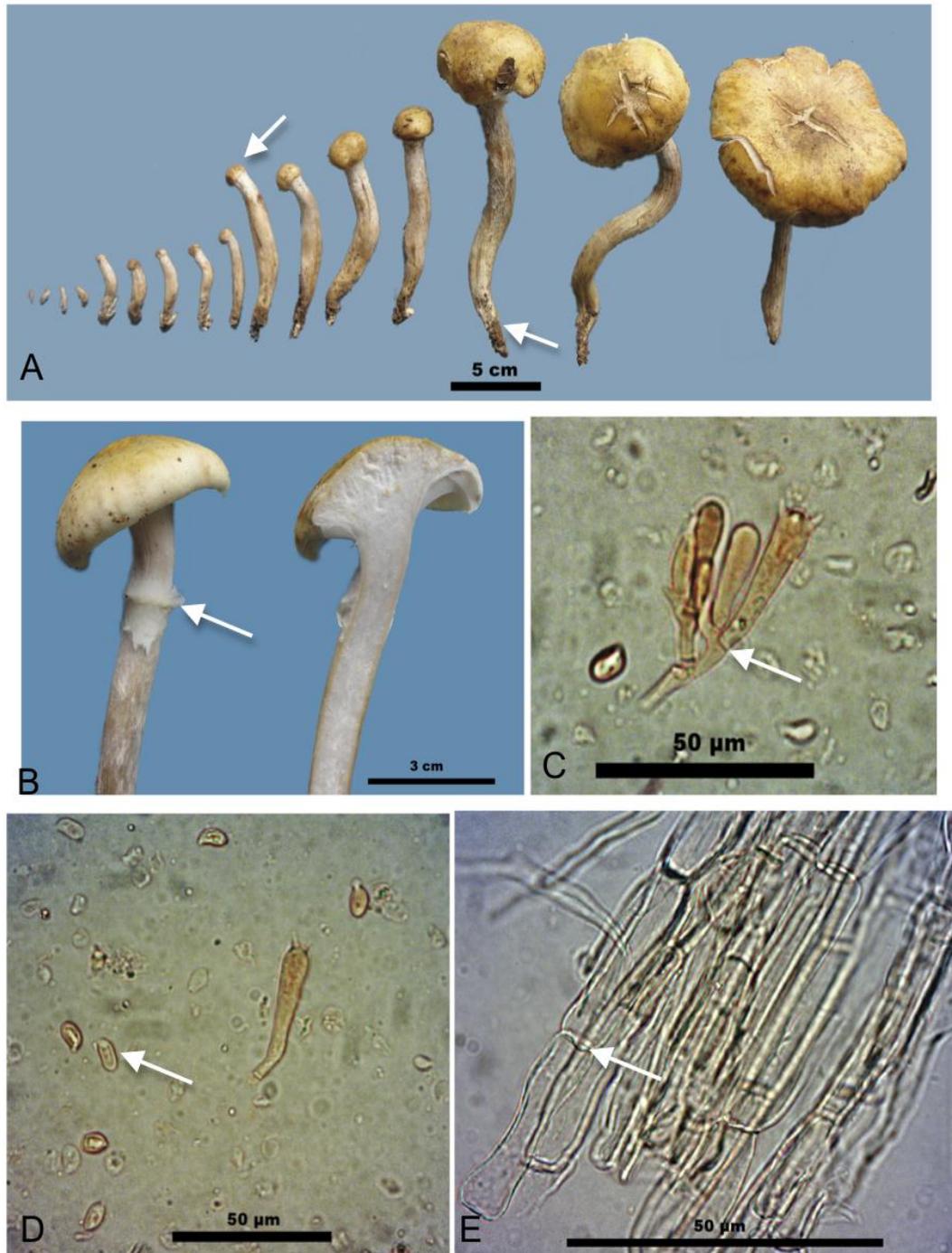


Fig. 26. *Armillaria mellea* MEX100: (A) Ontogenia del basidioma de *A. mellea*, con píleos hemisféricos de color amarillo en estadios juveniles y estípite atenuado en la base. (B) Anillo membranoso sin estrías. (C) Basidios sin fíbulas (D) Basidiosporas elípticas y Basidio clavado (E) Corte longitudinal de células sin fíbulas en el estípite.

CAPÍTULO IV

Patogenicidad de *Armillaria mexicana* y *A. mellea* en diferentes portainjertos de durazno

Resumen

A. mexicana se ha aislado con mayor frecuencia en huertas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] del sur del Estado de México que presentan una mortalidad anual significativa de árboles. Debido a que la patogenicidad puede variar entre especies de *Armillaria*, el objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad infectiva de dos aislamientos, uno de *A. mexicana* y otro de *A. mellea*, en cuatro portainjertos de durazno bajo condiciones de invernadero y campo. Los resultados mostraron diferencias en patogenicidad y virulencia de los aislamientos inoculados en las dos condiciones experimentales y sugieren diferencias en resistencia entre los portainjertos evaluados. Ambas especies infectaron a ‘Nemaguard’ y ‘criollos’ regionales, en condiciones de invernadero. Durante el periodo de evaluación, un ciruelo proveniente de viveros del estado de Veracruz no mostró infección a la cepa de *A. mellea*. El aislamiento de *A. mexicana* indujo valores altos de severidad en los portainjertos evaluados, siendo los más susceptibles ‘Nemaguard’ y segregantes de *P. mume*.

Abstract

A. mexicana frequently has been isolated from peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.] orchards in Mexico State that have a significant annual mortality of peach trees. Because pathogenicity can varied widely in *Armillaria* species, the goal of this

research was to determine the ability to incite disease of *A. mexicana* (represented by MEX85) and *A. mellea* (represented by MEX100) on four peach rootstocks in greenhouse and field conditions. The results showed differences in pathogenicity and virulence of *Armillaria* isolates inoculated on both experimental conditions also suggest variation in resistance among the rootstocks tested. In greenhouse conditions both *Armillaria* species inoculated infected to 'Nemaguard' and 'Criollo de Goleta'. During the evaluation period, the *A. mellea* isolate no induce infection in a plum from Veracruz state. The *A. mexicana* isolate induced the greatest severity values in all rootstocks tested, but 'Nemaguard' and *P. mume* seedlings were more susceptibility than others.

4.1 INTRODUCCIÓN

En el Sur del Estado de México la mortalidad de árboles de durazno en huertas comerciales se ha asociado principalmente con la presencia de tres especies de *Armillaria*, de las cuales una parece ser la más distribuida en esta región (capítulo II en esta tesis; Elías-Román *et al.*, 2011) y que en esta investigación denominamos *A. mexicana* (capítulo III en esta tesis). En otras áreas productoras con problemas de muerte de árboles de durazno, atribuidos al ataque de *Armillaria* spp., se han recomendado diversas estrategias de manejo para esta enfermedad (Cox *et al.*, 2005; Beckman, 2007), una de las cuales es el desarrollo de portainjertos resistentes (Guillaumin *et al.*, 1991; Beckman y Pusey, 2001; Beckman *et al.*, 2008).

Sin embargo, en México no se han implementado estrategias de manejo para esta enfermedad debido al desconocimiento del agente causal del problema, ni tampoco se encuentran disponibles a nivel comercial portainjertos específicos que

ofrezcan algún nivel de tolerancia en sitios infestados con *Armillaria* spp. Los portainjertos empleados en el sur del Estado de México son principalmente ‘criollos’ regionales y ‘Nemaguard’. Pero el uso de estos materiales no está técnicamente justificado en esta zona productora de México. Sin embargo, recientemente algunos productores de esta región han manifestado su preferencia hacia el establecimiento de portainjertos ‘criollos’, no obstante la mayoría de estos árboles provienen de semillas colectadas en huertos de traspatio o en huertas comerciales, lo cual ocasiona heterogeneidad en el vigor de los árboles y probablemente diferencias en la susceptibilidad a enfermedades como *Armillaria*.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue: Evaluar la patogenicidad de dos aislamientos de *Armillaria* en cuatro portainjertos de durazno.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Sitios experimentales

Se realizaron tres experimentos con diferentes portainjertos para durazno. Uno en condiciones de invernadero y otros dos en huertas comerciales de durazno, naturalmente infestadas una con *A. mexicana* y la otra con *A. mellea*.

El experimento en invernadero se estableció en el Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, para lo cual se emplearon contenedores fabricados con láminas de policarbonato, dos de estos con las siguientes dimensiones de 160 cm de longitud x 60 cm de ancho por 33 cm del alto y otro de 80 cm x 60 cm x 33 cm. El sustrato utilizado fue suelo no esterilizado proveniente de una huerta de durazno ubicada en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, México.

Las huertas naturalmente infestadas se localizan en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México.

4.2.2 Aislamientos empleados y preparación de inóculo

Se obtuvieron en laboratorio dos aislamientos diploides empleando cajas Petri con medio BDS (Benomyl-Dicloran-Estreptomicina; Worrall, 1991) y porciones del contexto de basidiomas de dos especies de *Armillaria* encontradas en árboles muertos pertenecientes a huertas comerciales de durazno en Cruz de Piedra, Coatepec Harinas, Estado de México. Uno de estos aislamientos (MEX100) correspondió con *A. mellea* según sus características morfológicas y análisis de las de las secuencias de ADN ribosomal (5.8S parcial-ITS2-LSU dominios-D y el extremo 3' LSU-IGS) y el gen del factor de elongación-1 (*tef-1 α*), el otro aislamiento (MEX85) se obtuvo de un basidioma de *Armillaria* sp., denominada en el presente estudio *A. mexicana* (ver capítulos II y III de esta tesis). Para incrementar el inóculo y establecer los experimentos se emplearon semillas de encino (*Quercus* sp.), como lo indicado por Beckman y Pusey (2001), las cuales fueron remojadas en agua por 12 hr, posteriormente alrededor de 100 semillas se depositaron en frascos de cristal, se les agregó 100 ml de agua destilada, después se esterilizaron por una hora. Al día siguiente en cada frasco conteniendo las semillas se depositó, en condiciones asépticas, un fragmento de la colonia de cada aislamiento de *Armillaria*. Cuando el hongo colonizó todas las semillas de encino en los frascos; se tomaron dos de estas para inocular los árboles de cada portainjerto.

4.2.3 Material vegetal

Para el experimento en condiciones de invernadero se emplearon tres portainjertos: 'Nemaguard' y duraznos 'criollos' de la Goleta (región ubicada al sur del Estado de México) propagados por semillas y un 'ciruelo' (*Prunus salicina*) proveniente de un vivero comercial del estado de Veracruz, establecido en una huerta propiedad del M. C. Rodolfo Muñoz en Tlaxcala, México. Este ciruelo (denominado como 'ciruelo de Tlaxcala') es compatible vegetativamente con durazno y fue propagado por estacas de tallo.

En campo se evaluaron tres portainjertos: 'criollos de la Goleta' y segregantes de chabacano japonés (*Prunus mume*), ambos propagados por semillas y el 'ciruelo de Tlaxcala' propagado por estacas de tallo.

Antes del establecimiento del experimento los portainjertos crecieron en contenedores plásticos de 30 cm de longitud x 15 cm de diámetro en condiciones de invernadero por alrededor de un año.

4.2.4 Ensayo de patogenicidad

En invernadero los portainjertos se transplantaron en tres contenedores (cajones) de policarbonato. En uno los árboles se inocularon con *A. mellea* (MEX100) y en otro con *A. mexicana* (MEX85), un tercer cajón fue destinado para los árboles no inoculados. Lo anterior resultó en nueve tratamientos (3 niveles de inóculo x 3 portainjertos). Por cada aislamiento (MEX85 y MEX100) se inocularon 21 árboles (siete repeticiones de cada portainjerto), teniendo un total de 42 plantas inoculadas y 14 árboles fueron empleados como testigos (no inoculados). Para la inoculación se emplearon dos semillas de encino infectadas con cada una de las especies de

Armillaria, las cuales se colocaron en contacto con la raíz principal o alguna secundaria de cada árbol, aproximadamente a 15 cm por abajo del cuello de la planta. No se realizó ninguna herida artificial en la zona de contacto del inóculo y raíz.

En campo se seleccionaron dos huertas; en la primera (N18°56'41.2" WO99°48'54") la especie predominante estuvo estrechamente relacionada con *A. mellea*, representada por el aislamiento MEX100 y en la segunda (N18°56'11.3" WO 99°49'07.9") la especie más distribuida fue *A. mexicana*, representada por el aislamiento MEX85.

En cada huerta, los materiales evaluados se plantaron alrededor de 40 cm de separación del tallo de árboles sintomáticos o muertos. Dos meses después del establecimiento los portainjertos se inocularon (para disminuir la probabilidad de que algunos portainjertos escaparan del inóculo natural), con dos semillas de encino infectadas con la especie de *Armillaria* predominante de cada huerta; para lo cual se utilizó un tubo metálico para abrir un orificio a un costado de los portainjertos.

De las plantas evaluadas con síntomas y signos del patógeno se realizaron reaislamientos para completar los postulados de Koch.

4.2.5 Evaluación de resultados y variables evaluadas

Los árboles de invernadero se evaluaron 20 meses después de la inoculación. Para lo cual se determinó la severidad de la infección por *Armillaria* spp., empleando una escala similar a la reportada por Metaliaj *et al.* (2006) con categorías modificadas de 1 a 5, (Fig. 27), donde:

1= árbol sano, con ningún signo aparente de infección por *Armillaria* spp.

2= árbol no sintomático (no presenta gomosis en cuello o corona de los árboles ni follaje clorótico), sin raíces muertas pero con una o más raíces que presentan colonización micelial por *Armillaria* con patrón en abanico.

3= árbol con o sin gomosis en el cuello, raíz primaria o secundarias muertas con presencia de micelio subcortical con patrón de abanico, presencia/ausencia de rizomorfos adheridos en raíces.

4= árbol con colonización micelial subcortical con patrón de abanico o xilema con necrosis a nivel del cuello o corona, una o más raíces muertas con colonización micelial por *Armillaria*, presencia/ausencia de rizomorfos adheridos a raíces, con o sin síntomas de infección (gomosis, follaje clorótico).

5= árbol muerto.

Con los valores obtenidos en cada unidad experimental se obtuvo un promedio ponderado por tratamiento, con la siguiente fórmula (Guzmán-Plazola *et al.*, 2004):
$$Pps = \frac{(5(Np5)) + (4(Np4)) + (3(Np3)) + (2(Np2)) + (1(Np1))}{Ntp}$$
 Donde: PPS= promedio ponderado de severidad, Np5= número de plantas con severidad 5, Np4=número de plantas con severidad 4, Np3= número de plantas con severidad 3, Np2= número de plantas con severidad 2, Np1= número de plantas con severidad 1, Ntp = número total de plantas evaluadas en cada experimento.

La severidad en campo, se evaluó 40 meses posteriores de la inoculación, empleando la escala de severidad mencionada (Fig. 27). Para lo cual se retiró el suelo alrededor del tallo hasta exponer raíces principales de cada árbol a una profundidad aproximadamente de 30 cm de la superficie del suelo, posteriormente se inspeccionó el tejido subcortical de la corona o cuello y raíces principales en busca de síntomas y signos asociados a *Armillaria*.



Fig. 27. Escala de severidad (1 a 5) en plantas de *Prunus* spp., infectadas por *Armillaria*. Donde: 1= árbol sano. 2= árbol no sintomático, sin raíces muertas pero con una o más raíces que presentan colonización micelial por *Armillaria* con patrón en abanico. 3 (a, b)= árbol con o sin gomosis en el cuello, raíz primaria o secundarias muertas con presencia de micelio subcortical con patrón de abanico, presencia/ausencia de rizomorfos adheridos en raíces. 4 (a,b,c)= árbol con colonización micelial subcortical con patrón de abanico o xilema con necrosis a nivel del cuello, una o más raíces infectadas por *Armillaria*, presencia/ausencia de rizomorfos adheridos a raíces, con o sin síntomas (gomosis, follaje clorótico). 5= árbol muerto.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Experimento en invernadero

En este experimento el aislamiento MEX100 que representa a *A. mellea* produjo infección en raíces de los portainjertos ‘Nemaguard’ y ‘criollos de la Goleta’, excepto en los ‘ciruelos de Tlaxcala’. Los materiales evaluados tuvieron un promedio ponderado de severidad (PPS) por la enfermedad de 2.1, 2.6 y 1.0, respectivamente (Cuadro 3). Aunque este aislamiento infectó dos de tres portainjertos evaluados, estos no mostraron síntomas visibles de infección (clorosis, gomosis en cuello). Por otra parte, el aislamiento MEX85 (*A. mexicana*) ocasionó infección en los tres portainjertos evaluados (‘criollos de la Goleta’, ‘ciruelo de Tlaxcala’ y ‘Nemaguard’), los cuales tuvieron un PPS de 2.7, 3.1 y 3.9, respectivamente, ocasionando exudación de goma en la zona del cuello en varios árboles. Los portainjertos más susceptibles a este aislamiento fueron ‘Nemaguard’ y ‘ciruelo de Tlaxcala’, en los cuales se detectó mayor frecuencia de árboles con categoría de severidad 4 que representa plantas con micelio subcortical con patrón en abanico a nivel del cuello, una o más raíces muertas con colonización micelial por *Armillaria*, etc. (Fig. 27-4a y b). Sin embargo, este aislamiento provocó únicamente la mortalidad de un árbol de ‘Nemaguard’ al momento de la evaluación (Cuadro 3).

Los árboles no inoculados no presentaron ningún síntoma visible de infección y tampoco tuvieron alguna raíz infectada por *Armillaria* spp.

Cuadro 3. Frecuencia de la severidad de dos especies de *Armillaria* en tres portainjertos para durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] en condiciones de invernadero, 20 meses de la inoculación.

Portainjertos	Especies de <i>Armillaria</i> inoculadas	Severidad					Promedio ponderado
		1	2	3	4	5	
'Nemaguard'	<i>A. mellea</i>	1	4	2	0	0	2.1
'Criollos de la Goleta'	<i>A. mellea</i>	0	3	4	0	0	2.6
'Ciruelo de Tlaxcala'	<i>A. mellea</i>	7	0	0	0	0	1.0
'Nemaguard'	<i>A. mexicana</i>	0	0	2	4	1	3.9
'Criollos' de la Goleta'	<i>A. mexicana</i>	2	1	1	3	0	2.7
'Ciruelo de Tlaxcala'	<i>A. mexicana</i>	2	0	0	5	0	3.1

4.3.2 Experimentos en sitios naturalmente infestados con *Armillaria* spp.

Los resultados obtenidos en huertas comerciales naturalmente infestadas con *A. mellea* y *A. mexicana* mostraron similitud con el experimento en invernadero. Los portainjertos inoculados con *A. mellea* (MEX100) no mostraron síntomas de la enfermedad y la excavación de las raíces principales no evidenció la presencia de infección (datos no mostrados).

En cambio, se detectó infección en el 81.0% (17/21) de los árboles inoculados con *A. mexicana* (aislamiento MEX85) en campo y se registraron diferencias en PPS en ciruelos, duraznos 'criollos' y chabacanos alcanzando 2.1, 3.0 y 4.3 respectivamente (Cuadro 4). Estos datos muestran que los segregantes de *P. mume* fueron los portainjertos más susceptibles a esta especie de *Armillaria*. Aunque cinco de los siete portainjertos 'criollos' se infectaron por este hongo dos árboles no

mostraron evidencia de alguna infección y sobresalieron por su altura y diámetro del tallo (datos no mostrados). Seis de los siete ciruelos evaluados se infectaron y alcanzaron un nivel de severidad de 2.1, pero no mostraron síntomas de infección (clorosis, gomosis).

Cuadro 4. Frecuencia de la severidad de *A. mexicana* en tres portainjertos para durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch.] establecidos en una huerta comercial naturalmente infestada en Coatepec Harinas, Estado de México, México.

Portainjertos	Severidad					Promedio ponderado
	1	2	3	4	5	
Duraznos 'criollos de la Goleta'	2	0	3	0	2	3.0
'Ciruelo de Tlaxcala'	2	2	3	0	0	2.1
Segregantes de <i>P. mume</i>	0	0	2	1	4	4.3

Los resultados del presente estudio evidenciaron diferencias en virulencia entre especies de *Armillaria* inoculadas. El aislamiento MEX85 que representó a *A. mexicana* provocó en los portainjertos evaluados mayor frecuencia de árboles con un nivel de severidad alto (categorías 4 y 5) y ocasionó en 'Nemaguard' y en los segregantes de *P. mume* los valores más altos en PPS, por lo tanto fueron considerados más susceptibles (Cuadros 3 y 4). Los datos en campo e invernadero mostraron que no todos los árboles que representaron a los portainjertos 'criollos de la Goleta' fueron infectados por *A. mexicana*; para descartar la posibilidad que las raíces de esos árboles no entraron en contacto con el inóculo natural o el que se colocó ex profeso haya perdido viabilidad, podría ser necesario evaluarlos por más

tiempo y propagarlos vegetativamente para establecer más replicas en sitios naturalmente infestados. *A. mexicana* infectó a los portainjertos denominados ‘ciruelos de Tlaxcala’ en campo e invernadero; en la huerta naturalmente infestada se observó comúnmente que los árboles enfermos produjeron raíces nuevas para sustituir la pérdida de las infectadas o muertas (Fig. 27-3a), pero en invernadero la enfermedad avanzó hasta nivel del cuello o corona de estos árboles (Fig. 27-4b).

4.4 DISCUSIÓN

En el presente estudio la variación en la severidad (PPS) entre los portainjertos es atribuida a diferencias en su resistencia a los dos aislamientos de *Armillaria* empleados, así como a la eficacia de estos en infectarlos. Reportes previos en sitios naturalmente infestados con *A. tabescens* han documentado variación en la mortalidad atribuida a diferencias en resistencia entre especies de *Prunus* (Beckman *et al.*, 1998; Beckman y Pusey, 2001; Beckman *et al.*, 2008). Estos autores también indicaron que en esas condiciones una línea de ciruelos nativos de América del Norte son una fuente de resistencia a esta enfermedad, como el portainjerto ‘Sharpe’ que podría emplearse en huertas infestadas para disminuir las pérdidas por esta enfermedad.

Por otra parte, Guillaumin *et al.* (1990) señalaron diferencias en tolerancia a *A. mellea* entre especies de *Prunus* y los portainjertos más tolerantes fueron los pertenecientes a *Prunus domestica*, *Prunus insititia* y *Prunus cerasifera* (Myrobalan) e híbridos con estas especies.

En los ciruelos evaluados en este estudio e inoculados en condiciones de invernadero y campo con *A. mellea* no se detectaron raíces infectadas. Sin embargo,

A. mexicana ocasionó infección en el 71.4% de estos portainjertos en ambos sitios experimentales; esta especie también provocó los valores más altos en severidad ponderada en los portainjertos ‘Nemaguard’ y segregantes de *P. mume*. Estos resultados sugieren diferencias en la patogenicidad y virulencia entre las especies de *Armillaria* evaluadas. En un estudio previo también se indicaron estas diferencias al analizar la mortalidad de ciruelos (‘Marianna 2624’, ‘Ishtara’ y ‘Myran’) considerados resistentes a *A. mellea* pero susceptibles en sitios infestados con *A. tabescens* (Beckman *et al.*, 2001).

Aunque *A. mellea* infectó dos de tres portainjertos evaluados en invernadero, esta no ocasionó valores altos de severidad (categorías 4 y 5). Lo anterior probablemente sea la causa por lo cual no se detectaron árboles infectados al excavar las raíces principales en alrededor del tallo en condiciones de campo. Al respecto se ha indicado que *A. tabescens* produce mortalidad en árboles de durazno a partir del cuarto año del establecimiento de la huerta y *A. mellea* induce 68.0% de mortalidad entre el quinto y décimo año (Chandler y Daniell, 1982).

Las diferencias observadas en severidad (PPS) sugieren variación en la patogenicidad y virulencia entre los aislamientos MEX85 y MEX100 que representan a *A. mexicana* y *A. mellea*, respectivamente, así como diferencias en resistencia entre portainjertos. *A. mexicana* infectó todos los materiales evaluados y fue más virulenta que *A. mellea*. No se descarta la presencia de resistencia en otras especies de *Prunus* o en la población de duraznos ‘criollos’ del Estado de México a *A. mexicana*. Los portainjertos ‘Nemaguard’ y ‘criollos de la Goleta’, ampliamente utilizados en la región, fueron susceptibles a las dos cepas inoculadas. El ‘ciruelo de Tlaxcala’ obtuvo los valores más bajos de severidad (PPS=1) cuando fue inoculado

en invernadero con la cepa de *A. mellea*, por lo tanto es candidato para futuras evaluaciones en sitios infestados por esta especie.

4.6 LITERATURA CITADA

Beckman, T.G., W.R. Okie, A.P. Nyczepir, P.L. Pusey, and C.C. Reilly. 1998. Relative susceptibility of peach and plum germoplasm to *Armillaria* root rot. HortScience 33: 1062-1065.

Beckman, T. G., and P. L. Pusey. 2001. Field testing peach rootstocks for resistance to *Armillaria* root rot. HortScience 36: 101-103.

Beckman, T.G. 2007. Manejo de la muerte prematura y pudrición de raíz causada por *Armillaria* en huertos de durazno. *In*: Rodríguez Alcázar, R., R. D. Elías R., S. Pérez G., M. R. Fernández M., G. Reyes J. (eds). Memoria de conferencias del III Congreso Nacional del Sistema Producto Durazno, 6-8 de diciembre 2007, Ixtapan de la Sal, México. pp: 28-41.

Beckman, T. G., J. X. Chaparro, and W. B. Sherman. 2008. 'Sharpe', a clonal plum rootstock for peach. HortScience 43: 2236-2237.

Chandler, W. A., and J. W. Daniell. 1982. Observations of long-term survival of *Clitocybe tabescens* and infection of peach trees. Research Report No 399. The University of Georgia College of Agriculture Experiment Stations.

Cox, K., H. Scherm y T. Beckman. 2005. *Armillaria* root and crown rot. *In*: Horton, D. y D. Johnson (eds). Southeastern Peach Growers Handbook. Athens, GA, USA: Cooperative Extension Service, University of Georgia. pp: 162–166.

Elías-Román, R. D., N. B. Klopfenstein, D. Alvarado-Rosales, M.-S. Kim, A. E. Case, S. M. Ashiglar, J. W. Hanna, A. L. Ross-Davis, R. A. Guzmán-Plazola. 2012. DNA-Based identification of *Armillaria* isolates from peach orchards in México State. *In*: S. Zeglen, and P. Palacios (comps). Proceedings of the 59th Annual Western International Forest Disease Work Conference. Leavenworth, WA, USA. October 10-14, 2011. pp: 159-160.

Metaliaj, R., G. Giovanni, and N. Luisi. 2006. Pathogenicity of *Armillaria* isolates inoculated on five *Quercus* species at different watering regimes *Phytopathologia Mediterranea* 45: 3-9.

Guillaumin, J.J., J. Pierson, and C. Grassely. 1991. The susceptibility to *Armillaria mellea* of different *Prunus* species used as stone fruit rootstocks. *Scientia Horticulturae* 46: 43-54.

Guzmán-Plazola, R. A., R. Gómez-Pauza, R. García-Espinosa y F. Gavi-Reyes. 2004. Distribución espacial de la pudrición radical del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burk.) Syd. y Hans. en la Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:246-258.

Worrall, J.J. 1991. Media for selective isolation of hymenomycetes. *Mycologia* 83: 296-302.

CONCLUSIONES GENERALES

En huertas comerciales de durazno del Estado de México que presentan una mortalidad anual significativa se detectó la presencia de tres especies de *Armillaria*. Una de estas es morfológica y molecularmente distinta de cualquiera de las especies de *Armillaria* reportadas en América del Norte y Sur, por lo cual es considerada como una especie no descrita. También, se obtuvieron en menor medida aislamientos relacionados con *A. mellea* y *A. gallica*.

La especie de *Armillaria* que no se pudo determinar esta distribuida ampliamente en las huertas del sur del Estado de México y es descrita como *A. mexicana* una especie nueva de México.

La enfermedad se distribuyó dentro de las huertas de durazno en sitios específicos o focos de infección compuestos de varios árboles muertos y sintomáticos. La mortalidad aumentó continuamente durante el periodo de evaluación y el tamaño de los focos de infección fue evidente. Se recomiendan algunas estrategias de manejo para disminuir la dispersión de la enfermedad dentro de las huertas.

La capacidad para inducir la enfermedad de dos aislamientos, uno de *A. mexicana* y otro de *A. mellea*, fue variable; aunque ambas especies infectaron a los portainjertos 'Nemaguard' y 'criollos de la Goleta'; el aislamiento de *A. mexicana* indujo los valores más altos de severidad en los portainjertos evaluados, siendo los más susceptibles 'Nemaguard' y segregantes de *P. mume*.