



Armillaria gallica asociado a la pudrición de raíz del aguacate en Michoacán

Jeny Michua-Cedillo¹ Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario BioLab, 60080, Uruapan, Mich. **Daniel Téliz-Ortíz**², **Salvador Ochoa-Ascencio**³, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH, 60170 Uruapan, Michoacán, **María del Pilar Rodríguez-Guzmán**², **Alejandro Alarcón**², **Carlos de León**² **Gerardo Vázquez-Marrufo**⁴, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, UMSNH, 58262, Morelia, Michoacán.

RESUMEN

Objetivos y antecedentes. La pudrición de la raíz y muerte de árboles de aguacate asociada a *Armillaria* es una enfermedad emergente con alto impacto económico en huertos establecidos en áreas previamente forestales de Michoacán. Actualmente se desconoce con precisión las especies asociadas con síntomas típicos de marchites, amarillamiento, producción excesiva de frutos y micelio subcortical en raíz. El objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente las especies de *Armillaria* asociadas a la pudrición de la raíz del aguacate.

Materiales y Métodos. Para la caracterización morfológica y molecular, en extracto de malta-agar, se procesaron 60 muestras de raíz de árboles provenientes de tres huertos comerciales con presencia putativa de *Armillaria*. ADN de aislados purificados se amplificaron por PCR con genes *rpb2* y *TEF α-1*. Las secuencias se alinearon con MAFFT y se realizaron las filogenias con algoritmo de máxima verosimilitud en IQ-TREE.

Resultados. Se identificaron dos especies de forma consistente: *A. gallica* (20%) con 100% de homología y *A. mexicana* (25%) con 98%. Otra especie que representó el 55% de los aislados no se alineó con ningún grupo. Morfológicamente, los basidiocarpos de *A. gallica* concuerdan con las características de esta especie.

Conclusiones. Este es el primer reporte de *A. gallica* asociado a la pudrición de la raíz del aguacate en Michoacán.

Palabras clave: Basidiocarpo, *rpb2*, *tef α-1*, Marchitez

*Autor de

correspondencia:

Jeny Michua-Cedillo
michua0206@gmail.com

Sección:

Edición periódica

Recibido:

30 Julio, 2023

Aceptado:

02 Marzo, 2024

Publicado:

21 Marzo, 2024

Cita:

Michua-Cedillo J, Téliz-Ortíz D, Ochoa-Ascencio S, Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón A, de León C y Vázquez-Marrufo G. 2024. *Armillaria gallica* asociado a la pudrición de raíz del aguacate en Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología 42(2): 19.

<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2307-7>



INTRODUCCIÓN

En México se cosecharon 1.64 millones de ton de aguacate en 2023 lo que representa el 31% de la producción mundial con 179,914.30 ha sembradas. De esta superficie, Michoacán contribuye con 992,816 ton para exportación a EUA, China, Corea, y Chile (SIAP, 2023). El hongo *Armillaria* spp se ha registrado en ecosistemas forestales, frutales y arbolado urbano (Baumgartner, 2004). Árboles estresados por agentes bióticos o abióticos son más susceptibles a *Armillaria*, particularmente en áreas donde la superficie forestal ha sido sustituida por cultivos comerciales (Valdez *et al.* 2004). Estudios recientes de este patógeno describen algunas especies como *A. mellea*, *A. ostoyae* y *A. mexicana* en durazno (*Prunus* sp) y *A. mellea* en forestales (Elías, 2018).

Armillaria se ha registrado en Michoacán en algunos cultivos como *Prunus pérsica* y *Persea americana*, en este último se desconoce la especie (Téliz y Mora 2015). En durazno se reporta a *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana* en Coatepec Harinas y Temascaltepec, Estado de México (Elías, 2018). Las especies presentes en árboles forestales son *A. calvescens*, *A. gallica*, *A. mellea*, y *A. ostoyae* reportadas en Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Veracruz, y Morelos (Alvarado *et al.*, 2007). Entre las diferentes técnicas para identificar especies con poca variación morfológica destacan la compatibilidad somática y análisis molecular (Schulze *et al.* 1997; Worrall, 1994; White *et al.* 1990). A nivel molecular, el factor de elongación TEF-1 α se ha empleado por su utilidad filogenética y ser una region conservada (Hasegawa *et al.* 2010). Maphosa y colaboradores (2006) utilizaron este gen para estudios filogenéticos de *Armillaria* y lograron establecer la relación entre especies de *Armillaria* de los hemisferios norte y sur. El objetivo de esta investigación fue identificar molecularmente las especies de *Armillaria* asociadas con pudrición de raíz y marchitez del aguacate en el estado de Michoacán.

Muestreo y procesamiento de raíces y tejidos infectados. Se colectaron raíces con presencia de micelio de *Armillaria* spp. de 20 árboles de aguacate de tres huertos comerciales de los municipios de Charapan, Los Reyes, y Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Un total de 60 muestras se trasladaron al laboratorio para aislar al hongo. El micelio se fragmentó y se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70% durante 10 y 5 min, respectivamente. Entre cada solución se realizó un enjuague con agua destilada estéril para posteriormente secar los trozos de micelio en sanitas estériles (Agúin *et al.* 2004).

Aislamiento y conservación de las cepas. Un total de 60 aislamientos se obtuvieron de siembras en cajas de Petri con medio BDS (extracto de malta (AM) con

40 mg de benomyl, 20 mg de dicloran, y 100 mg de estreptomicina) (Aguín *et al.* 2004). En cada caja se colocaron cinco fragmentos de micelio y se mantuvieron a 24°C en oscuridad hasta que el hongo empezó a desarrollar rizomorfos (un mes aproximadamente). La conservación de las cepas se hizo en VCAM (Very Cold Armillaria Medium: 1.5% agar, 0.75% extracto de malta, 0.5% peptona, and 0.75% dextrosa) con cinco réplicas por cepa.

Extracción de ADN y PCR. El DNA se extrajo a partir de cepas de tres semanas de edad cultivadas en extracto de malta al 1% (Figura 1), siguiendo el protocolo de Cenís (2009).

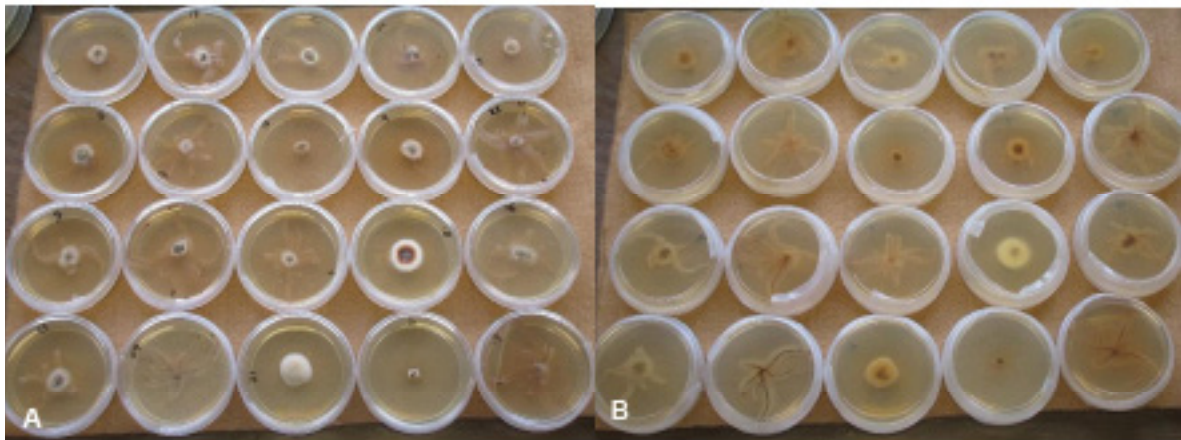


Figura 1. Morfotipos de *Armillaria* obtenidos de huertas de aguacate de diferentes municipios de la franja aguacatera de Michoacán. **A.** Anverso, **B.** Reverso.

La concentración y absorbancia del DNA se cuantificaron en el Nanodrop 2000c Spectrophotometer®. Se amplificaron regiones de los genes *tef 1-α* y *rpb2*. Para el factor de elongación *tef 1-α* se utilizaron los iniciadores EF1160R (5'CCGATCTTGTAGACGTCCTG3') y EFR595F (5'CGTGACTTCATCAAGAACATG3') (Maphosa *et al.*, 2006) y RPB2-6F (5' TGGGGKWTGGTYTGYCCTGC 3') y RPB2-7R (5' CCCATWGCYTGCTTMCCCAT 3') para el gen *rpb2* (Brazee *et al.*, 2011). Las reacciones PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL con 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 µM MgCl₂, 25 mM de cada uno de los dNTP's, 0.2 U de Taq DNA polimerasa, 10 pM de cada uno de los oligos (Invitrogen, USA) y 25 µg de DNA genómico. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). El programa consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min,

30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 56° por 30 seg, extensión a 72° por 30 seg y elongación final a 72° por 7 min para el factor de elongación. Para el gen *rpb2* el primer ciclo fue de 95 °C durante 2 min, posteriormente se realizaron 30 ciclos que comprendían una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una temperatura de alineamiento de 60 °C durante 45 s, y una extensión de 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Brazee *et al.*, 2011). Los amplicones generados se examinaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con SYBER Green (Invitrogen, USA). Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados por la empresa Elim Biopharmaceuticals Inc. (Hayward, CA. USA). Las secuencias obtenidas se editaron a mano para eliminar las ambigüedades en los extremos y se realizó una búsqueda *Blast* para encontrar aquellas con máxima identidad con secuencias del NCBI Genbank. Se obtuvieron los archivos fasta de secuencias de *Armillaria* spp. y de aquellas con mayor homología para realizar análisis filogenético, incluyendo una secuencia de *Desarmillaria tabescens* (KY359140) para su uso como grupo externo. Se realizó alineamiento de secuencias con MAFFT con los parámetros por default (Kato *et al.*, 2017). El alineamiento obtenido se utilizó para obtener un modelo evolutivo empleando el software ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). Los árboles filogenéticos se generaron empleando los modelos TIM3e+G4 (gen de factor de alargamiento) y GTR+G (gen *rpb2*) para calcular las distancias genéticas. Se generaron dendrogramas mediante el criterio ML en IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015). Se obtuvieron los valores SH-aLRT (%), *aBayes support*, y *ultrafast bootstrap (UFBoot) support* para cada bifurcación. Debido a la congruencia entre los tres valores de soporte solo se incluyeron en el árbol los porcentajes de SH-aLRT mayores al 50%. Lo árboles se visualizaron y editaron empleando el software FigTree version 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Amplificación de los genes *rpb2*, *tef* α -1 y filogenia. Con la amplificación del gen *tef* α -1 se obtuvo una banda de 450 a 500 pb. La cepa MICH29 colectada en Charapan se identificó como *A. gallica* de acuerdo con BLAST y los caracteres morfológicos de los basidiocarpos (Figura 2).

El alineamiento con secuencias del GenBank mostró 99% de similitud con la secuencia JF895870 correspondiente a *A. gallica* (Brazee *et al.* 2011) (Figura 3).

Esta especie se ha reportado en Norte América y se encuentra estrechamente relacionada con *A. calvescens*. *A. gallica* está reportada en especies forestales de México (Alvarado *et al.*, 2007) y durazno (Elías, 2018). Sin embargo, este es el primer reporte de *A. gallica* asociada a la pudrición de raíz en aguacate en Michoacán. La cepa MICH32 y MICH32R se alineó con *A. mexicana*, aunque no existen secuencias del gen *RPB2* para esta especie. La cepa 21 originaria de San Juan Viejo se situó de manera independiente entre el clado de *A. mellea* y *A. mexicana*; el



Figura 2. Basidiocarpos de *Armillaria gallica* colectados en Charapan, Michoacán. **A.** Basidiocarpos maduros de *Armillaria gallica* (píleo amarillo con escamas); **B.** Basidiocarpos de *A. gallica* inmaduros con coloración grisácea y escamas; **C.** Basidiocarpo solitario con rizomorfo en la base.

porcentaje de alineamiento con estas especies fue de 62% y 66%, respectivamente. Esta especie por tanto no pudo identificarse. Es probable que exista una relación entre estas especies; sin embargo, para esta cepa en particular es necesario realizar la descripción morfológica y filogenia multigen que incluya la amplificación de al menos tres genes (p.e., ITS, TEF y RPB2). No se puede descartar que debido a la heterogenicidad y poca variación en este gen resulte complicado diferenciar entre algunas especies (Hasegawa *et al.* 2010).

Las secuencias alineadas con factor de elongación, *tef 1- α* , que mencionan Maphosa y colaboradores (2006) sirven para analizar la relación entre especies e identificarlas (Hasegawa *et al.* 2010). El aislado MICH29 es el único que se agrupó en el clado de *A. gallica* con 100% de identidad respecto a la base de datos del GenBank y un fragmento amplificado entre 600 y 700 pb que es el rango de fragmento obtenido para *Armillaria* utilizando el factor de elongación (Hasegawa *et al.* 2010; Maphosa *et al.* 2006). Con la cepa MICH21, los resultados fueron más consistentes, *Armillaria* sp se agrupó en un clado situado entre *A. mexicana* y *A. mellea*. La relación entre los clados podría deberse a que el hemisferio sur podría ser el origen del ancestro de *Armillaria* spp (Maphosa *et al.*, 2006).

Los resultados del alineamiento y análisis filogenético del gen TEF α -1, corroboran que la relación entre especies de *Armillaria* es muy estrecha y que se tienen que considerar otros parámetros para distinguirlas, por ejemplo, el morfológico. Algunas especies están significativamente ligadas y la amplificación de ITS no es suficiente para distinguirlas (Coetzee *et al.* 2001). Con este gen, las especies de *Armillaria* del hemisferio norte se estuvieron estrechamente relacionadas (Dunne *et al.* 2002). Este hecho está relacionado con la hibridación interespecífica como ocurre con *A. gallica* y *A. calvescens*, donde ambas especies son parcialmente infértil-

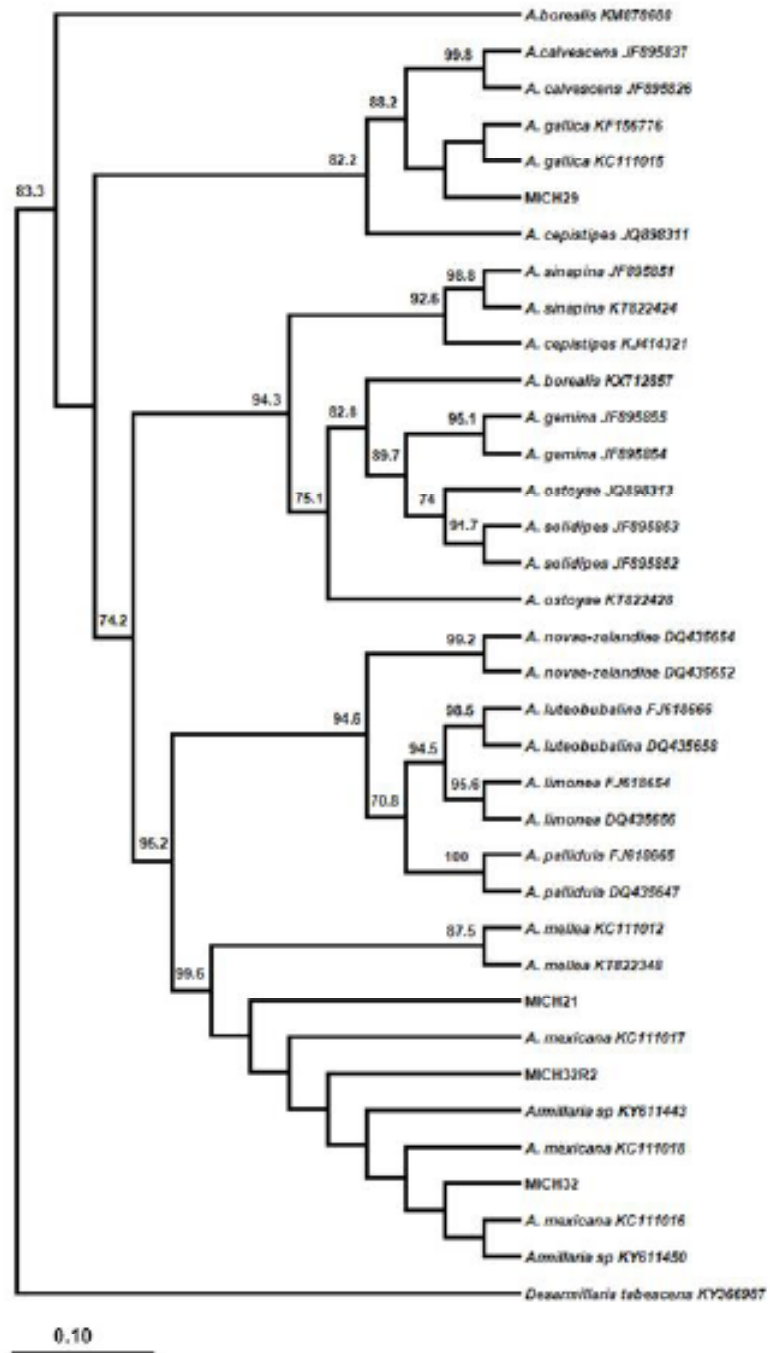


Figura 3. Análisis filogenético con secuencias de especies de *Armillaria* provenientes de aguacate y del GenBank amplificadas con el gen *tef* α -1. El aislado MICH29 se agrupó directamente con la especie *Armillaria gallica*. Las cepas MICH32 y MICH32R están estrechamente relacionadas con *Armillaria mexicana*, mientras que MICH21 se agrupó entre el clado de *A. mellea* y *A. mexicana*.

les y por eso hay compatibilidad de talos. Aunque los IGS e ITS son las regiones más amplificadas para este género no son confiables por que se presentan casos en donde no se pueden distinguir las especies, debido a la alta diversidad de los IGS entre aislados.

Con el presente estudio se amplía la distribución geográfica de *A. gallica* a Michoacán, además de los registros previos en Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Veracruz, Morelos (Elías, 2017). Respecto al gen *rpb2* no hay secuencias de todas las especies en Genbank; sin embargo, la secuencia de la cepa MICH29 se alineó 100% con *A. gallica*. La cepa MICH21 se alineó con el clado de *A. mellea* (Figura 4).

La amplificación del gen *rpb2* ha sido útil en la discriminación de especies de basidiomicetos estrechamente relacionadas. No obstante, este gen no discriminó entre las especies *A. calvescens* y *A. gallica* (Brazee *et al.*, 2011). Al presente, el gen *rpb2* se ha empleado poco para examinar especies estrechamente relacionadas de *Armillaria* pero a comparación de las secuencias IGS e ITS se han utilizado en varios estudios filogenéticos. Regiones de ADNr también proporcionan una resolución deficiente para distinguir especies estrechamente relacionadas de *Armillaria* (Ota *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2006). Además, los micelios diploides a menudo contienen secuencias heterogéneas que pueden confundir el análisis (McLaughlin y Hsiang; 2010; Kim *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Se encontraron tres especies de *Armillaria* presentes en huertos de aguacate establecidos en suelos con antecedente forestal en Michoacán. *A. gallica* se identificó en siete de 10 muestras con síntomas más severos de pudrición de raíz en comparación con las otras dos especies identificadas. *A. mexicana* se detectó 25% de las muestras y una especie no identificada, *Armillaria* sp, en 55%. Factor de elongación fue el gen más adecuado para identificar especies de *Armillaria*. Se sugiere explorar otros genes para generar una filogenia concatenada. La identificación morfológica de especies de *Armillaria* es complicada debido a los caracteres estrechos entre especies. Es necesario fundamentar los resultados moleculares con datos morfológicos.

AGRADECIMIENTOS

A CONHACYT por la beca otorgada para el programa doctoral, al equipo del CEMEB por el apoyo en el desarrollo de los protocolos de extracción y PCR. A los productores por su colaboración en la toma de muestras.

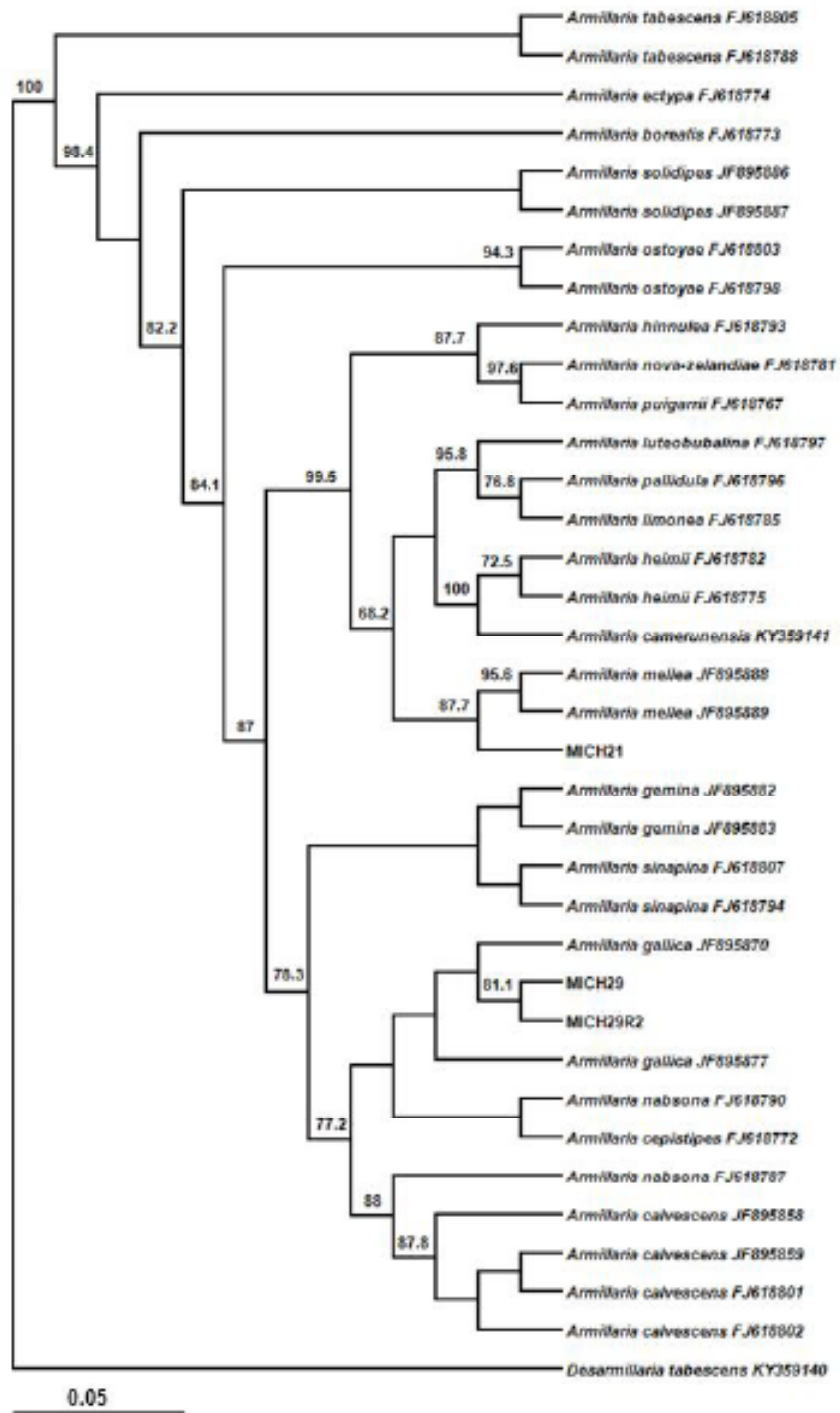


Figura 4. Análisis filogenético de secuencias de especies de *Armillaria* provenientes de aguacate y del GenBank amplificadas con el gen *rpb2*. La cepa MICH29 y MICH29R se agrupan directamente con la especie *Armillaria gallica*, mientras que MICH21 está relacionada con *A. mellea*.

LITERATURA CITADA

- Aguín CO, Sainz JM. and Mansilla VP. 2004. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern Spain. European Journal of Plant Pathology 110: 683–687. [https:// DOI:10.1023/B:EJPP.0000041553.98879.51](https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000041553.98879.51)
- Alvarado, R.D., 2007. Pudrición de raíz por *Armillaria*/*Armillaria* root rot. *Armillaria* (Fr.) Staude. (Agaricales, Marasmiaceae). Pp: 211-215. In: Cibrián T., D., D. Alvarado R. y S.E. García (eds) Enfermedades forestales en México. Mundi-Prensa. UACH,Chapingo, México.
- Baumgartner K. 2004. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. Plant Disease 88:1235-1240. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.11.1235
- Brazee NJ, Hulvey JP and Wick RL. 2011. Evaluation of partial *tefl*, *rbp2*, and *Nlsu* sequences for identification of isolates representing *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. Fungal Biology 115: 741-749. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.05.008
- Cenis JL. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research 20:9. doi: 10.1093/nar/20.9.2380
- Coetzee MP, Wingfield BD, Harrington TC, Steimel, J, Coutinho AT and Wingfield JM. 2001. The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. Molecular Ecology 10: 387–396. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2001.01187.x
- Coetzee MP, Bloomer P, Ridley GS and Wingfield MJ. 2003. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates South America and Indo-Malaysia. Mycologia 95: 285-293. DOI:10.2307/3762039
- Dunne CP, Glen M, Tommerup IC, Shearer BL. and Hardy, G. J. 2002. Sequence variation in the rDNA ITS of Australian *Armillaria* species and intra-specific variation of *Armillaria luteobubalina*. Australasian Plant Pathology 31: 241-251. DOI: <https://doi.org/10.1071/AP02015>
- Elías RD, Medel R, Alvarado D, Hanna J, Ross AL, Kim M and Kopfenstein N. 2018. *Armillaria mexicana*, a new described species from México New *Armillaria* species from Mexico. Mycologia 110: 347-360 <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1419031>
- Hasegawa E, Ota Y, Hattori T. and Kikuchi T.2010. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene. Mycologia 102:898–910. DOI: 10.3852/09-238
- Katoh K, Rozewicki, J. and Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in Bioinformatics. bbb108 [https://doi: 10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108).
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong KF, von Haeseler A and Jermini LS. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nature Methods. 14:587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- Kim MS, Klopfenstein NB, Hanna JW and McDonald GI, 2006. Characterization of North American *Armillaria* species: Genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. Forest Pathology 36: 145-164. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00441.x>
- McLaughlin JA and Hsiang T. 2010. Identification protocol for six *Armillaria* species from northeastern North America. Canadian Journal Forest Research 40: 536-548. [https:// DOI:10.1139/X10-015](https://doi.org/10.1139/X10-015)
- Maphosa L, Wingfield BD, Coetzee PA, Mwenje E. and Wingfield MJ. 2006. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. Australian Plant Pathology 35:513–520. [https:// DOI:10.1071/AP06056](https://doi.org/10.1071/AP06056)
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, and Minh BQ. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. Molecular Biology Evolution. 32:268-274. [https://doi: 10.1093/molbev/msu300](https://doi.org/10.1093/molbev/msu300)
- Ota Y, Kim MS, Neda H, Klopfenstein NB, Hasegawa E, 2011. The phylogenetic position of an *Armillaria* species from Amani- Oshima, a subtropical island of Japan, based on elongation factor and ITS sequences. Mycoscience 52: 53-58. [https:// DOI: https://doi.org/10.1007/s10267-010-0066-3](https://doi.org/10.1007/s10267-010-0066-3)
- Rizzo DM and Harrington TC. 1993. Declination and biology of clones of *Armillaria ostoyae*, *A. gemina* and *A. calvescens*. Mycologia 85:164-174. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010076>
- Schulze S, Bahnweg G, Moller M and Sandermannjr H. 1997. Identification of the genus *Armillaria* by specific amplification of an rDNA-ITS fragment and evaluation of genetic variation within *A. ostoyae* by rDNA-RFLP and RAPD analysis. European Journal Forest Pathology 27:225-239. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1997.tb00865.x>

- Sistema de Información Agroalimentaria (SIAP). 2023. Producción Agrícola Anual. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/. Consultado el 2 de marzo de 2023.
- Téliz D y Mora A. Coord. 2015. El Aguacate y su Manejo Integrado. 1ª reimpresión 2ª Ed. bba (Biblioteca Básica de Agricultura). Colegio de Postgraduados. 321 p.
- Valdez M, Córdoba J, Valenzuela R. y Fierros MA. 2004. Incremento del fitopatógeno *Armillaria mellea* (Vahl. Fr) Karsten en bosque de pino-encino, en relación al grado de disturbio por tratamiento silvícola. Revista Chapingo Serie Forestales y del Ambiente 10:99-103.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J.1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), Academic Press: San Diego. p. 315-322
- Worrall JJ. 1994. Population structure of *Armillaria* species in several forest types. *Mycologia* 86:401-407. <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026427>