

# Dieback disease of *Prunus* sp. associated to *Armillaria* spp. in commercial orchards in Michoacan, Mexico

## Muerte descendente de *Prunus* sp. asociada a *Armillaria* spp. en huertas comerciales de Michoacán, México

**Patricia Rivas-Valencia\***, **Alejandra Almaraz-Sánchez**, **Adriana Cano-Salgado**, Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Km. 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco. C.P. 56250. Coatlinchán, Estado de México; **Lervin Hernández-Ramos**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA-SAGARPA. Km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México; **Iobana Alanís-Martínez**, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA. Km. 21 Carretera Amazcala-Chichimequillas, Municipio El Marqués C.P. 76247, Santiago de Querétaro, Querétaro; **Mario Rafael Fernández-Montes**, Sitio Experimental Querétaro-INIFAP. Luis Pasteur 414, Colonia Valle Alameda C.P. 76040 Santiago de Querétaro, Querétaro. \*Autor para correspondencia: rivas.patricia@inifap.gob.mx.

**Recibido:** 17 de Febrero, 2017.

**Aceptado:** 30 de Junio, 2017.

Rivas-Valencia P, Almaraz-Sánchez A, Cano-Salgado A, Hernández-Ramos L, Alanís-Martínez I, Fernández-Montes MR. 2017. Dieback disease of *Prunus* sp. associated an *Armillaria* spp. in commercial orchards in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 463-475.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1702-1

Primera publicación DOI: 29 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 29, 2017.

**Resumen.** El área productora de durazno (*Prunus persica*) y ciruelo (*Prunus domestica*) en Michoacán, se localiza en el municipio de Zinapécuaro. Recientemente se han presentado síntomas de un deterioro progresivo de los árboles que les ocasiona la muerte, poniendo en riesgo la producción de fruta. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar molecularmente el patógeno

**Abstract.** The producing area of peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus domestica*) in Michoacan is located at Zinapécuaro county. Recently there have been symptoms of a progressive deterioration of trees that causes their death, increasing the risk of fruit production failure. The aim of this study was to identify and characterize molecularly the responsible pathogen. Five sites with previous experiences of having the problem were sampled: root, trunk and soil samples were collected. Signs of *Armillaria* spp. were found, which was confirmed by molecular sequencing of the Tef-1 $\alpha$  gene (translation elongation factor 1 $\alpha$ ). The phylogenetic analysis performed, grouped the sequences as new species, phylogenetically related in the same clade as *A. mellea*, which is a very aggressive pathogen. At present in Mexico, tolerant rootstocks have not been identified and it is therefore recommended to continue searching for genetic resistance and improve orchard disease management.

responsable. En las localidades de Ucareo, Jeráhuaro, Huajúbaro, San Joaquín y La Galera con antecedentes del problema, se colectaron muestras de raíz, tronco y suelo. Se identificaron signos característicos del hongo *Armillaria* spp., confirmado por secuenciación molecular del gen Tef-1 $\alpha$  (translation elongation factor 1 $\alpha$ ). El análisis filogenético agrupó las secuencias como dos especies nuevas, filogenéticamente emparentada en el mismo clado que *A. mellea*, que es una especie patógena agresiva. En México no se cuenta actualmente con portainjertos tolerantes, y por tanto, se recomienda continuar con estudios de búsqueda de resistencia genética y manejo de la enfermedad en las huertas.

**Palabras clave:** Caracterización molecular, análisis filogenético, Tef-1 $\alpha$ , secuenciación molecular.

El área con mayor producción de durazno (*Prunus persica*) y ciruelo (*Prunus domestica*) en Michoacán, se localiza en el Municipio de Zinapécuaro al noroeste del estado, en las coordenadas 19° 52' de latitud norte y 100° 50' de longitud oeste, con una altitud de 2400 a 2700 msnm. El relieve lo constituye el Eje Volcánico Transversal, con clima templado con lluvias en verano. La precipitación pluvial anual promedio es de 622 mm y temperaturas entre los 3 y 34 °C (Villaseñor, 2005). El área productora de durazno y ciruelo se ha extendido en áreas de bosque mixto de pino-encino y abeto-pino, con una superficie sembrada de 1256 ha, que representa el 30 % de la superficie estatal y se concentra en cinco localidades: Ucareo, Jeráhuaro, Huajúbaro, San Joaquín y La Galera, con una producción anual de 6950 t y un valor de la producción de \$41.7 millones de pesos (SAGARPA, 2015). En Michoacán la superficie sembrada de ciruelo en 2014 fue 2827 ha, con una producción de 13,316 t

**Key words:** Molecular characterization, phylogenetic analysis, Tef-1 $\alpha$ , molecular sequence.

The largest peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus domestica*) producing area in Michoacan is located at Zinapécuaro county (19° 52' northern latitude, 100° 50' western longitude and 2400 to 2700 masl) in the northwestern area of the state. The topography includes the Trans-Mexican Volcanic Belt, with temperate climate and summer rains. The average annual rainfall is 622 mm and temperatures range between 3 and 34 °C (Villaseñor, 2005). The peach and plum producing area has expanded to areas of mixed pine-oak and fir-oak forests; the peach production area planted on 1256 ha represents 30 % of the state's total area, and is concentrated in five locations: Ucareo, Jeráhuaro, Huajúbaro, San Joaquin and La Galera, where 6,950 tons valued at \$ 41.7 million pesos were harvested in 2015 (SAGARPA, 2015). The area planted to plum was 2827 ha in 2014, which produced 13,316 tons valued at \$ 47.1 million pesos (SAGARPA, 2014).

In recent years, peach and plum trees in some commercial orchards have been affected by progressive damage and gradual death that may occur within a few months. The first symptoms appear during the flowering stage (leaf wilting, yellowing at the top of the trees, stunting, base canker, tree neck exudate, lack of vigor and death).

The *Armillaria* genus includes over 40 species. Identifying this genus based on morphological traits is complicated because, in most cases, only asexual or vegetative structures are found. One of the issues extensively discussed in the literature is the lack of sexual structures that would allow identifying the genus based on classical taxonomy (Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012). Over the past few years, molecular data,

y un valor de producción de 47.1 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

En los últimos años, en algunas huertas comerciales, los árboles de durazno y ciruelo han sido afectados por un deterioro progresivo y la muerte paulatina de los mismos, la cual puede ocurrir en meses, presentándose los primeros síntomas durante la floración que pueden ser marchitez en hojas, amarillamiento de la copa del árbol, achaparramiento, cancro basal, exudado en el cuello del árbol, falta de vigor y muerte.

El género *Armillaria* incluye más de 40 especies, su identificación a partir de los caracteres morfológicos es complicada, debido a que en la mayoría de los casos, solo se encuentran estructuras asexuales o vegetativas, uno de los puntos que se ha discutido ampliamente en la literatura es la falta de estructuras sexuales para realizar la identificación taxonómica clásica (Kim *et al.*, 2006; Brazee *et al.*, 2011; Ross-Davis *et al.*, 2012). En los últimos años, los datos moleculares, específicamente las secuencias de ADN, se están utilizando para identificar las especies de hongos y realizar estudios filogenéticos (Cai *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2017). En la taxonomía contemporánea de este hongo, las comparaciones de secuencias de ADN han llevado al descubrimiento de una serie de nuevas especies que no están relacionadas con especies morfológicas (Maphosa *et al.*, 2006), lo cual ha tenido implicaciones en la identificación de este organismo.

Las especies del género *Armillaria* se han detectado en bosques naturales y huertas frutícolas (Cibrián *et al.*, 2007) y se puede comportar como saprófitas o patógenas (Ross-Davis *et al.*, 2012). Aún con el desplante de árboles infectados, el micelio sobrevive como saprófito, las raíces residuales

specifically DNA sequences, have been used to identify species of fungi and conduct phylogenetic studies (Cai *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2017). With the contemporary taxonomy of this fungus, comparing DNA sequences has led to the discovery of new species that are not related to morphological species (Maphosa *et al.*, 2006), a fact that has had implications for identifying the fungus.

In natural forest areas and fruit orchards, species of *Armillaria* genus have been detected (Cibrián *et al.*, 2007) that behave as saprophytes or pathogens (Ross-Davis *et al.*, 2012). Even after infected trees are cut, the mycelium survives as a saprophyte, and residual roots can remain buried in the soil and serve as inoculum (Redfern and Filip, 1991). The inoculum can survive from a few years to decades (Baumgartner and Rizzo, 2001), and combined with the lack of efficient disease control methods (Adaskaveg *et al.*, 1999, Aguin-Casal *et al.*, 2006), contributes to significantly reduce fruit yields during the whole life of both infected orchards (Baumgartner, 2004) and subsequent orchards.

In Mexico, the fungus is distributed in the states of Baja California, Chiapas, Chihuahua, State of Mexico, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacan, Morelos, Nuevo Leon, Oaxaca, Puebla, Queretaro, Veracruz and in forest areas of Mexico City (Valdés *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007; Elías-Román *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2014; Fernández-Pavía, *et al.*, 2015). The objective of this research was to identify and molecularly characterize the pathogen associated with dieback of peach and plum trees. The hypothesis of this research was that *Armillaria* spp. is responsible for causing peach and plum tree dieback in the fruit production area of Zinapecuaro county, Michoacan.

pueden permanecer enterradas en el suelo y sirven como inóculo (Redfern y Filip, 1991). El inóculo puede persistir durante algunos años o décadas (Baumgartner y Rizzo, 2001), esto combinado con la falta de métodos eficientes para prevenir, controlar o curar (Adaskaveg *et al.*, 1999, Aguín-Casal *et al.*, 2006), contribuye a reducir significativamente los rendimientos durante toda la vida de una plantación infectada (Baumgartner, 2004) y la de sucesivas plantaciones.

En México, este hongo se distribuye en los estados de Baja California, Chiapas, Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y en áreas forestales de la Ciudad de México (Valdés *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007; Elías-Román *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2014; Fernández-Pavía, *et al.*, 2015). El objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización molecular del patógeno asociado a la muerte descendente de los árboles de durazno y ciruelo. La hipótesis de este trabajo se basó en la presencia de *Armillaria* spp. como responsable de la muerte descendente de árboles de durazno y ciruelo en la zona productora de Zinapécuaro, Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

En 2015 y 2016, se realizaron recorridos de campo y se seleccionaron cinco sitios de muestreo en huertas comerciales de durazno y ciruelo, ubicadas en la parte alta, media y baja de la zona productora de Zinapécuaro (Cuadro 1). En cada sitio se identificaron árboles con diversos síntomas de deterioro, como marchitez en hojas, amarillamiento de la copa del árbol, achaparramiento,

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

In 2015 and 2016, five sites were sampled in peach and plum commercial orchards located at the upper, intermediate and lower part of the Zinapécuaro production area (Table 1). Trees were identified with different damage symptoms (leaf wilting, tree top yellowing, stunting, basal canker, neck exudate, lack of vigor and death) at each site. A destructive sampling was undertaken to collect samples of primary and secondary roots and trunks at a height of 15-30 cm. It was verified that pathogenic signs and symptoms were present in the root system of the tree, where in some cases rhizomorphs, typical vegetative structures of *Armillaria*, and whitish-brown mycelial fans between bark and wood were found. Soil samples were taken at a depth of 30-60 cm.

### Processing plant and soil samples

Samples of plant material were thoroughly washed to remove soil; they were then cut into pieces 1 cm long, placed in 1.1 % sodium hypochlorite and gently shaken for 10 min. The pieces were then immersed in 70 % alcohol and washed with sterile distilled water between changes. The rhizomorphs were washed with 3 % hydrogen peroxide for 5 min, rinsed twice with sterile distilled water and dried with sterile paper towels, following the method of Harrington *et al.* (1992). Around 15-20 woodchips with mycelium and brown-to-black rhizomorphs were sown in Petri dishes containing BDS (Benomyl-Dicloran-Streptomycin) selective culture medium (Worrall, 1991; Aguín *et al.*, 1998). The dishes were covered with aluminum foil, placed in polypaper bags and incubated at 20 °C in darkness during 4-5 weeks.

**Cuadro 1. Sitios de colecta de muestras de raíz y tronco de *Prunus* sp. y suelo del municipio de Zinapécuaro, Michoacán 2016.****Table 1. Sites where samples of roots and trunks of *Prunus* sp. and soil were collected in the Zinapécuaro county, Michoacán, 2016.**

Huerta	Altura (msnm)	Sitio	Frutal	Coord. geográficas Longitud, Latitud	Variedad/Portainjerto	Edad (años)
1	2488	Jeráhuaro	Durazno	-100.6773, 19.8699	Fred/criollo	4.5
2	2495	Jeráhuaro	Ciruelo	-100.6786, 19.8697	Moscatel/criollo	20
3	2519	La Hacienda	Durazno	-100.6886, 19.8601	Diamante/criollo	1-46
4	2490	Ucareo	Durazno	-100.6790, 19.8941	Diamante mejorado/criollo	4-5
5	2539	Casablanca	Durazno	-100.6850, 19.8999	San Juan/criollo Regio/criollo	18

cancro basal, exudado en el cuello, falta de vigor y muerte. Se realizó un muestreo destructivo para tomar muestras de raíces primarias y secundarias y del tronco a una altura entre 15-30 cm. Se verificó la presencia de signos y síntomas de patógenos en el sistema radicular del árbol, encontrándose en algunos casos rizomorfos, estructura vegetativa típica de *Armillaria* y presencia de micelio de color blanco-marrón entre la corteza y la madera en forma de abanico. Se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 30-60 cm.

#### Procesamiento de muestras vegetales y de suelo

Las muestras de material vegetal fueron lavadas exhaustivamente con la finalidad de eliminar el suelo, se cortaron segmentos de 1 cm de longitud y se colocaron en hipoclorito de sodio al 1.1 % durante 10 min en agitación suave, posteriormente se sumergieron en alcohol al 70 % y se lavaron con agua destilada estéril entre cada cambio. Los rizomorfos fueron lavados con peróxido de hidrógeno al 3 % por 5 min y dos lavados de agua destilada estéril, secados con toallas de papel estériles de acuerdo a lo descrito por Harrington *et al.*, (1992). En cajas de petri con medio cultivo selectivo, BDS (Benomyl-Dicloran- Estreptomycin), (Worrall, 1991; Aguín *et al.*, 1998), se sembraron de 15 a 20 trozos de

To explore the mycoflora population present in soil at the collection sites, the soil dilution PDA-TS (potato-dextrose-agar-tergitol) technique was used (Steiner and Watson 1965). The dishes were kept at a temperature of 22-24 °C for 7 to 10 days, period during which the fungi developed. Isolates were transferred to water-agar medium to be purified using the hyphae-point technique and sown individually in dishes containing water agar and PDA.

#### Molecular identification. DNA extraction, specific amplification and sequencing

After obtaining pure isolates of the fungi, they were molecularly characterized. DNA extraction was performed using the AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen) kit, according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using the ARMEF-3-A (CGT GAY TTY ATC AAG AAC ATG) and ARMEF-R (TAC CCG TTC GGC GAT CAA TCT) primers designed in the amplified region for the Tef-1 $\alpha$  gen (translation elongation factor 1 $\alpha$ ) (Ross-Davis *et al.*, 2012). Amplified reactions were performed in a standard TProfessional thermocycler (Biometra, Germany) using a final volume of 25  $\mu$ L with the following reagents: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM,

corteza con micelio y rizomorfos de color marrón a negro. Las cajas se cubrieron con papel aluminio y se guardaron dentro de bolsas de polipapel y se incubaron a 20 °C en oscuridad durante 4-5 semanas. Para explorar la población de la micoflora en suelo presente en los sitios de colecta, se utilizó la técnica de dilución de suelo PDA-TS (papa-dextrosa-agar tergitol) (Steiner y Watson 1965). Las cajas se mantuvieron a temperatura de 22-24 °C de 7 a 10 días, que fue el periodo en el que se desarrollaron los hongos. Los aislados se transfirieron a medio agua-agar para purificarlos mediante la técnica de punta de hifa y se sembraron por separado en cajas con medio agar-agua y PDA.

#### **Identificación molecular. Extracción de ADN, amplificación específica y secuenciación**

Una vez obtenidos los aislamientos puros de los hongos en estudio, se inició la caracterización molecular. La extracción del ADN se llevó a cabo con el Kit de extracción AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR utilizando los iniciadores ARMEF-3-A (CGT GAY TTY ATC AAG AAC ATG) y ARMEF-R (TAC CCG TTC GGC GAT CAA TCT) diseñados para la región que amplifica para el gen *Tef-1 $\alpha$*  (translation elongation factor 1 $\alpha$ ) (Ross-Davis *et al.*, 2012). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador TProfessional estándar (Biometra, Alemania) en un volumen final de 25  $\mu$ L con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP's 0.2mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen, USA), 10  $\mu$ M de cada primer y 4  $\mu$ L de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 45 s, y una extensión final a 72 °C por 4 min. Se verificó

dNTP's 0.2mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen, USA), 10  $\mu$ M of each primer and 4  $\mu$ L of total DNA. The amplification program was as follows: 96 °C for 3 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 4 min. To verify the presence of the fragment electrophoresis in 2 % agarose gels stained with ethidium bromide (5 mg L<sup>-1</sup>) was utilized; the gels were documented using the Gel Doc (Bio-Rad, USA) photo documentation system. The PCR products were purified and sequenced in both directions by the Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

#### **Multiple alignment and phylogenetic analysis**

Sequences of the *TEF-1 $\alpha$*  gene in the isolates were edited and manually aligned using BioEdit 7.2.5 software (Hall, 1999). The sequences were compared with those available in the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database using the BLAST® algorithm. For the phylogenetic analysis, all the sequences of *Armillaria* spp. isolates from Michoacan were grouped in a single consensus sequence, and sequences of isolates of 34 *Armillaria* species characterized worldwide were used, according to the method of Maphosa *et al.* (2006), Hasegawa *et al.* (2010), Ross-Davis *et al.* (2012), Elías-Román *et al.* (2013) and Guo *et al.* (2016). *Pleurotus ostreatus* (NCBI accession number AY883432) was used as a root node outside the group. All the sequences were aligned with the CLUSTAL-W algorithm and analyzed by the Neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987) using Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA 7). One thousand support value replications (*Bootstrap*) were used to obtain a consensus tree with a 50 % majority rule (Tamura *et al.*, 2004). For this task, the Kimura 2

la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y los geles se documentaron en el fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad, USA). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por la Compañía Macro-gen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

### Alineamiento múltiple y análisis filogenético

Las secuencias del gen TEF-1 $\alpha$  de los aislados fueron editadas y alineadas manualmente con el Software BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Las secuencias se compararon con las disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) mediante el algoritmo BLAST®.

Para el análisis filogenético, todas las secuencias del gen EF-1 $\alpha$  obtenidas de los aislados de *Armillaria* spp. de Michoacán se agruparon en una sola secuencia consenso. Además, se utilizaron secuencias de aislamientos de 34 especies de *Armillaria* caracterizadas a nivel mundial de acuerdo a lo reportado por Maphosa *et al.*, (2006), Hasegawa *et al.*, (2010), Ross-Davis *et al.*, (2012), Elías-Román *et al.*, (2013) y Guo *et al.*, (2016). Se utilizó a *Pleurotus ostreatus* (número de accesión en el NCBI AY883432) como nodo raíz externo al grupo. Todas las secuencias fueron alineadas con el algoritmo CLUSTAL-W, y se analizaron con el método Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) utilizando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7). Se utilizaron 1000 réplicas de valores soporte (*Bootstrap*) para obtener un árbol consenso con una regla de mayoría del 50 % (Tamura *et al.*, 2004). Se utilizó el modelo de sustitución Parametro-2 de Kimura (K2P) de acuerdo con Hasegawa *et al.*, (2010).

Replacement Parameter-2 Model (K2P) was used, according to the method of Hasegawa *et al.* (2010).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological identification

The strains collected in orchards 1, 2 and 5 (Table 1) from the bark of trees infected with fungal mycelium had a fan-like growth pattern and the rhizomorphs from roots showed a cottony creamy yellow growth in the culture medium. Rhizomorphs with dichotomic growth formed after 20 days and hyphae characteristic of the *Armillaria* genus formed at 28 days. No basidiocarps were found at the study sites before, during or after the rainy season.

Samples of plant material collected from orchards 3 and 4 did not include *Armillaria* spp. isolates. The genera *Trichoderma* sp., *Pilatoporus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and *Fomitopsis* sp. were found in the soil isolates from all the sampling sites. *Fomitopsis* sp. is an associated pathogen that can cause trees to decay and die (Cibrián *et al.*, 2007). In orchard 5, the presence of *Fusarium oxysporum* was detected, a root pathogen that damages the vascular system.

### Molecular identification. Multiple alignment and phylogenetic analysis

The DNA sequences obtained in this study do not have reliable coverage and have not been identified ( $\geq 99 \%$ ) as being one of the known species of *Armillaria* reported in NCBI; thus it appears to be a new species of the genus. However, the sequences were 99 % similar to those reported

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación morfológica

Las cepas obtenidas de las huertas 1, 2 y 5 (Cuadro 1) provenientes de la corteza de árboles infectados con micelio del hongo, cuyo patrón de crecimiento fue en forma de abanico y los aislados de los rizomorfos obtenidos de las raíces, presentaron un crecimiento en medio de cultivo con aspecto algodonoso de color amarillo cremoso en el centro. Después de 20 días se observó la formación de rizomorfos con crecimiento dicotómico, a los 28 días formación de hifas, características del género *Armillaria*. No se encontraron en los sitios de estudio la presencia de basidiocarpos, antes, durante y después del periodo de lluvias.

En las muestras de material vegetal de las huertas 3 y 4, no se aisló *Armillaria* spp. En todos los sitios de muestreo en los aislados del suelo se encontraron los géneros, *Trichoderma* sp, *Pilatoporus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fomitopsis* sp., este último es un patógeno asociado que puede contribuir en la muerte de árboles sujetos a procesos de decaimiento (Cibrián *et al.*, 2007). Además en la huerta 5 se detectó la presencia de *Fusarium oxysporum*, el cual es un patógeno de la raíz que ocasiona daños en el sistema vascular.

### Identificación molecular. Alineamiento múltiple y análisis filogenético

Las secuencias de ADN obtenidas en este estudio no tienen una cobertura e identidad confiable ( $\geq 99$  %) con ninguna de las especies conocidas del género *Armillaria* reportadas en el NCBI, por lo que aparentemente representan una nueva especie dentro del género. No obstante, las secuencias obtuvieron un 99 % de similitud con aquellas reportadas como *Armillaria* spp. por Elías-Román

as being *Armillaria* spp. by Elías-Román *et al.* (2013), based on isolates from the State of Mexico, concluded that root rot in peach trees is caused by a species of the *Armillaria* genus that has not yet been described. The sequences obtained in this study are kept in the GeneBank with accession numbers KY611443 to KY611450 and are available. These sequences and those reported by Elías-Román *et al.* (2013) are from the same organism, which belongs to a species not yet described in the literature.

Based on the alignment of 48 sequences of the EF-1 $\alpha$  gene from at least 34 species of the *Armillaria* genus that have been characterized worldwide. Following the results reported by Maphosa *et al.* (2006), Hasegawa *et al.* (2010), Ross-Davis *et al.* (2012), Elías-Román *et al.* (2013) and Guo *et al.* (2016), a phylogenetic analysis was performed using the *Neighbor-joining* algorithm. A 50 % or higher probability consensus tree was obtained in which the *Armillaria* species were grouped into four main clades (Figure 1). The EF-1 $\alpha$  gene was useful for separating all the species. The studied sequences were grouped in the same clade as the species *Armillaria mellea*, but in different branches (Figure 1). This confirmed that they are new species that appear to be phylogenetically related to *A. mellea*. However, the phylogenetic analysis, BLAST and the sequence analysis (single-nucleotide polymorphisms, insertions and deletions) all clearly distinguish both organisms as being different species, which agrees with the results reported by Elías-Román *et al.* (2013) using the isolates obtained in the State of Mexico.

In the *Armillaria* genus, species grouped in the same clade as *A. mellea* and *A. ostoyae* are associated with or considered aggressive pathogens that usually cause diseases in various fruit and forest trees, compared with species that are saprophytes or that behave as weak pathogens and that are grouped in the other clades (Ross-Davis



*et al.*, (2013), quienes a partir de aislados provenientes del Estado de México concluyeron que la pudrición de raíces en árboles de durazno es originada por una especie del género *Armillaria* no descrita. Las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en GenBank con los números de accesión KY611443 a KY611450 y están disponibles al público en general. Éstas secuencias y las reportadas por Elías-Román *et al.*, (2013) corresponden al mismo organismo, el cual representa a especies aún no descritas en la literatura existente.

Basado en el alineamiento de 48 secuencias del gen EF-1 $\alpha$  pertenecientes al menos a 34 especies del género *Armillaria* caracterizadas a nivel mundial, de acuerdo a lo reportado por Maphosa *et al.*, (2006), Hasegawa *et al.*, (2010), Ross-Davis *et al.*, (2012), Elías-Román *et al.*, (2013) y Guo *et al.*, (2016), se realizó el análisis filogenético mediante el algoritmo *Neighbor-joining* con el cual se obtuvo un árbol consenso de probabilidades superior al 50 %, en el cual las especies de *Armillaria* se agruparon en cuatro clados principales (Figura 1). El gen EF-1 $\alpha$  fue útil para separar a todas las especies. Las secuencias del estudio se agruparon en el mismo clado que las secuencias de la especie *Armillaria mellea*, pero en ramas diferentes (Figura 1), confirmando que se trata de especies nuevas que al parecer están filogenéticamente relacionadas con *A. mellea*. Sin embargo, tanto el análisis filogenético, el BLAST y el análisis de secuencias (polimorfismos de un solo nucleótido e inserciones y deleciones) separan claramente a ambos organismos como especies distintas, lo cual coincide con lo reportado por Elías-Román *et al.*, (2013) con los aislados que obtuvieron en el Estado de México.

En el género *Armillaria* las especies que se agrupan en el mismo clado que *A. mellea* y *A. ostoyae* se asocian o se consideran como patógenos agresivos que regularmente pueden causar enfermedades en diversos árboles frutales y forestales,

*et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016). In this study, the phylogenetic analysis grouped the sequences in the same clade as *A. mellea* sequences that have been reported in North America, Asia and Europe.

In a parallel study, the cumulative incidence of dieback over three years in orchard 1 was calculated at 21.3 % (145/679 trees) (Rivas-Valencia and Fernández-Montes *et al.*, 2017). This could be interpreted as being an epidemic of great importance, caused by a species of *Armillaria* closely related to *A. mellea*.

The information about new *Armillaria* species in Mexico is based on reports from Alvarado and Blanchette (1994) on native species from forest regions of central Mexico showed that some of the isolates obtained in the state of Puebla were not compatible with reference isolates of species known in North America, which suggests that they belong to a different species. Due to the lack of sequences, it is not known if those isolates belong to the same biological species studied in this research. However, using biotechnological tools and, specifically, DNA sequence data, it is possible to identify the *Armillaria* species, which is essential to evaluate the threat of disease and its required management.

## CONCLUSIONS

Dieback of peach and plum trees at Zinapécuaro county, Michoacan, is associated with the presence of the *Armillaria* genus. Based on the analysis of DNA sequences, two isolates were identified in Michoacan that differ from those obtained in peach orchards in the State of Mexico. Isolates of *Armillaria* from Michoacan and the State of Mexico are genetically related to *A. mellea*, considered to be an aggressive pathogen. No tolerant rootstocks to *Armillaria* have been identified so far; therefore,



en comparación con las especies saprófitas o que se comportan como patógenos débiles que se agrupan en los otros clados (Ross-Davis *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016). En este estudio el análisis filogenético agrupa a las secuencias en el mismo clado que aquellas de *A. mellea* reportadas para Norteamérica, Asia y Europa.

En un estudio paralelo a este, se calculó la incidencia acumulada de tres años de muerte descendente para la huerta 1, con un valor de 21.34 % (145/679 árboles) (Rivas-Valencia y Fernández-Montes *et al.* 2017), lo cual puede interpretarse como una epidemia de intensidad importante, la cual es ocasionada por una especie de *Armillaria* estrechamente relacionada con *A. mellea*.

La documentación de nuevas especies de *Armillaria* en México tiene sus antecedentes en lo reportado por Alvarado y Blanchette (1994), quienes en un estudio de las especies nativas de las regiones forestales del centro de México demostraron que algunos aislados obtenidos en el Estado de Puebla fueron incompatibles con cepas de referencia de especies conocidas en Norteamérica, sugiriendo que estos correspondían a una especie diferente. Debido a la falta de secuencias se desconoce si esos aislados corresponden a la misma especie biológica de esta investigación. Sin embargo, con el uso de las herramientas biotecnológicas y específicamente los datos de las secuencias de ADN, se puede identificar la especie de *Armillaria*, lo cual es fundamental para la evaluación del riesgo de la enfermedad y el manejo de la misma.

## CONCLUSIONES

La muerte descendente de árboles de durazno y ciruelo en el municipio de Zinapécuaro, Michoacán está asociada a la presencia del género *Armillaria*. Con base en el análisis de las secuencias de ADN se

it is recommended to continue further studies to find genetic disease resistance as well as improve disease management methods in the orchards.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Ing. Fortino Mendoza, Antonio Durán, Rafael Mendoza, Gerardo Mendoza and Jesús Guerrero for their help in conducting this study, and are grateful for the partial funding provided by Fondos Fiscales INIFAP Convocatoria 2015-2016, and SAGARPA/COFUPRO funds 2016 for the project “Generación de nuevas variedades de durazno en México” DF1600000799.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

identifican dos aislados para Michoacán, diferentes a los aislados obtenidos en huertas de durazno en el Estado de México. Los aislados de *Armillaria* en Michoacán y Estado de México están relacionados genéticamente con *A. mellea*, el cual es considerado un patógeno agresivo. Actualmente, no se tienen identificados portainjertos tolerantes a *Armillaria*, se recomienda continuar con estudios de búsqueda de resistencia genética y manejo de la enfermedad en las huertas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Fortino Mendoza, Antonio Durán, Rafael Mendoza, Gerardo Mendoza y Jesús Guerrero por todas las facilidades otorgadas para la realización de este estudio así como al Financiamiento parcial de Fondos Fiscales INIFAP Convocatoria 2015-2016, SAGARPA/COFUPRO Convocatoria 2016 en el Proyecto denominado: “Generación de nuevas variedades de durazno en México” DF1600000799.

## LITERATURA CITADA

- Adaskaveg JE, Forster H, Wade L, Thompson DF and Connell JH. 1999. Efficacy of sodium tetrathiocarbonate and propiconazole in managing *Armillaria* root rot of almond on peach rootstock. *Plant Disease* 83:240–246. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1999.83.3.240>
- Aguín O, Mansilla P, Pintos C and Salinero MC. 1998. La podredumbre blanca de la raíz de la vid. *Vida Rural España* 47: 1-2. Disponible en línea: [http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_vrural/Vrural\\_1998\\_72\\_46\\_47.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_vrural/Vrural_1998_72_46_47.pdf)
- Aguín-Casal O, Mansilla-Vazquez JP and Sainz-Oses MJ. 2006. In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Management Science*. 62, 223–228. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1149>
- Alvarado-Rosales D and Blanchette RA. 1994. *Armillaria* species from forests of central Mexico. *Phytopathology* 84:1106.
- Barnett LH and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 pp.
- Baumgartner K and Rizzo DM. 2001. Ecology of *Armillaria* species in mixed-hardwood forests of California. *Plant Disease* 85: 947–951. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.947>
- Baumgartner K. 2004. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Disease* 88:1235–1240. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2004.88.11.1235>
- Brazeo NJ, Hulvey JP and Wick RL. 2011. Evaluation of partial *tefl1*, *rpb2*, and *nLSU* sequences for identification *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. *Fungal Biology* 115, 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.05.008>
- Cai L, Giraud T, Zhang N, Begerow D, Cai G and Shivas RG. 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity* 50:121–133. Disponible en línea: [http://max2.ese.u-psud.fr/publications/Cai\\_2011.pdf](http://max2.ese.u-psud.fr/publications/Cai_2011.pdf)
- Cibrián TDD, Alvarado R y García SE (eds). 2007. Enfermedades Forestales de México/Forest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma de Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NR-CAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO, Chapingo, México. 587 pp.
- Domsch KH, Gams W and Anderson TH. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press. Great Britain. 859 pp.
- Elías-Román RD, Guzmán-Plazola RA, Klopfenstein NB, Alvarado-Rosales D, Calderon-Zavala, G, Mora-Aguilera JA, Kim MS and García-Espinosa R. 2013. Incidence and phylogenetic analyses of *Armillaria* spp. associated with root disease in peach orchards in the State of Mexico, Mexico. *Forest Pathology* 43: 390-401. <http://dx.doi.org/10.1111/efp.12043>
- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Mondragón-Flores A, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernández R y Herrera-Camacho J. 2015. Enfermedades de Especies Vegetales en México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. 425 pp.
- Gubler WD. 1992. *Armillaria* root rot. In: *Grape Pest Management Edition 2 Publication #3343* (Flaherty, D.L., Christensen, L., Lanini, W.T., Marois, J.J., Phillips, P.A. and Wilson, L.T., eds), Oakland, CA: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 92-93 pp.
- Guo T, Wang HC, Xue WQ, Zhao J and Yang ZL. 2016. Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLoS ONE* 11(5): e0154794. Disponible en línea: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0154794&type=printable>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98. Disponible en línea: <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Harrington TC, Worall JJ and Baker FA. 1992. *Armillaria*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press M.N. St. Paul. USA. 81 pp.
- Hasegawa E, Yuko O, Tsutomu H and Kikuchi T. 2010. Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene. *Mycologia* 102: 898–910. <http://dx.doi.org/10.3852/09-238>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00441.x>
- Klopfenstein NB, Hanna JW, Cannon PG, Medel-Ortiz R, Alvarado-Rosales D, Lorea-Hernández F, Elías-Román RD and Kim M.S. 2014. First report of the *Armillaria* root-disease pathogen, *Armillaria gallica*, associated with several woody hosts in three states of Mexico. *Plant Disease* 98:1280. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0349-PDN>
- Maphosa L, Wingfield BD, Coetzee MPA, Mwenje E and Wingfield MJ. 2006. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 35: 513-520. <https://doi.org/10.1071/AP06056>
- Rachel A. Koch RA, Wilson AW, Séné O, Henkel TW, and Aime MC. 2017. Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster*. *BMC Evolutionary Biology* 17:33. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0877-3>
- Redfern DB and Filip GM. 1991. Inoculum and infection. In: *Armillaria Root Disease Agriculture Handbook No. 691* (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds), Washington, DC: United States Department of Agriculture Forest Service. 48-61 pp.
- Rivas-Valencia P y Fernández-Montes MR. 2017. Patrón espacial de muerte descendente de durazno ocasionada por *Armillaria* sp. en Michoacán. *Suplemento Revista Mexicana de Fitopatología Volumen 35: S128*. Disponible en línea: <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>

- Ross-Davis LA, Hanna WJ, Kim MS and Klopfenstein BN. 2012. Advances toward DNA-based identification and phylogeny of North American *Armillaria* species using elongation factor-1 alpha gene. *Mycoscience* 53:161–165. <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0148-x>
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-25. Disponible en línea: <http://www.montefiore.ulg.ac.be/~lwh/IBIOINFO/Saitou-Nei-NJM-87.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Anuarios estadísticos de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). México, D. F. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (consulta: Enero, 2017).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta, 1980-2014 (SIACON). México. 2014. <http://www.gob.mx/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119> (consulta: Febrero, 2017).
- Steiner GW and Watson RD. 1965. Use for Surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology* 55: 728-730.
- Tamura K, Nei M and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 11030-5 DOI:10.1073/pnas.0404206101
- Valdés M, Córdova J, Valenzuela R y Fierros AM. 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 Ciencias Forestales y del Ambiente* 10: 99-103. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62910205>
- Villaseñor GLE (editora). 2005. La biodiversidad en Michoacán: Estudio de Estado. 2005. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. Disponible en línea: [http://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/EE\\_MICHOACAN\\_2005.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/EE_MICHOACAN_2005.pdf)
- Worrall JJ. 1991. Media for selective isolation of hymenomyces. *Mycologia* 83: 296-302. DOI:10.2307/3759989