

# ***Armillaria gallica* AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ Y MUERTE DE ÁRBOLES DE AGUACATE EN MICHOACÁN, MÉXICO.**

Jeny Michua-Cedillo<sup>1</sup>, Daniel Téliz-Ortíz<sup>1</sup>, Salvador Ochoa-Ascencio<sup>2</sup>, María del Pilar Rodríguez-Guzman<sup>1</sup>, Alejandro Alarcón<sup>3</sup>, Carlos de León<sup>1</sup>, Gerardo Vázquez Marrufo<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, 56230 Texcoco, México. <sup>2</sup>Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH, 60170 Uruapan, Michoacán. <sup>3</sup>Posgrado en Edafología, Colegio de Postgraduados, 56230 Texcoco, México. <sup>4</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH, 58262, Morelia, Michoacán.

**Autor de correspondencia:** [michua0206@gmail.com](mailto:michua0206@gmail.com)

## **RESUMEN**

La pudrición de la raíz y muerte de árboles de aguacate asociada con el hongo *Armillaria* es una enfermedad emergente con un alto impacto económico en Michoacán en huertos establecidos en áreas forestales. Muestras de raíces con pudrición y cubiertas con rizomorfos de *Armillaria* se colectaron de árboles de aguacate con síntomas de pudrición de raíz, marchitamiento foliar hasta árboles muertos en tres huertos comerciales. Los aislados se amplificaron por PCR con los genes *rpb2* y *tef*  $\alpha$ -1 y se identificaron como *Armillaria gallica*, *A. mexicana* y *Armillaria* sp. *Armillaria gallica* se registra por primera vez asociada a la pudrición de la raíz del aguacate en Charapan, Michoacán. Los basidiocarpos concuerdan con las características morfológicas de *A. gallica*. Este es el primer registro de *Armillaria gallica* asociada con la pudrición de la raíz y muerte de árboles de aguacate en Michoacán, México.

**Palabras clave:** *Armillaria gallica*, aguacate, basidiocarpos, *rpb2*, *tef*  $\alpha$ -1.

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

México cosechó 1.47 millones de toneladas de fruta en 2017, que representan el 31% de la producción mundial con 231,028 ha sembradas. De esta superficie, el estado de Michoacán contribuye con 992,816 ton para exportación a Estados Unidos, China, Corea y Chile (SIAP, 2018). *Armillaria* spp se ha registrado en ecosistemas forestales y en cultivos como durazno, nogal, viñedos, plantas hortícolas y en áreas urbanas (Beckman y Pussey, 2001; Baumgartner, 2004; Keca, 2009; Nogales *et al.* 2009).

Los árboles estresados por agentes bióticos o abióticos son más susceptibles al ataque *Armillaria* (Valdez *et al.* 2004; Ochoa, 2011), particularmente en áreas donde la superficie forestal ha sido sustituida por otros cultivos comerciales como parte del manejo en donde los cultivos nuevos establecidos son afectados por *Armillaria*, ocasionándoles su muerte (Morales y Téliz, 2000; Valdez *et al.* 2004). Estudios recientes de este patógeno describen

algunas especies como *A. mellea*, *A. ostoyae* y *A. mexicana* reportadas en durazno (Elías, 2013) y *A. mellea* en forestales.

*Armillaria* se ha registrado en Michoacán en algunos cultivos como *Prunus pérsica* (Coria *et al.* 2008) y *Persea americana* (GIIIA, 2013; Morales, 1983; Ochoa, 2011; Tamayo, 2009; Téliz, 2000; Téliz y Mora 2007 y 2015). La enfermedad en durazno se atribuyó a la especie *Armillaria mellea* y en aguacate la especie es desconocida (Coria *et al.* 2008). Las especies presentes en bosques son *Armillaria calvescens*, *A. gallica*, *A. mellea*, *A. ostoyae* reportadas en los estados de Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Veracruz, Morelos (Alvarado *et al.* 2007), mientras que en durazno se reportan especies como *A. mellea*, *A. gallica* y *A. mexicana* en los municipios de Coatepec Harinas y Temascaltepec en el Estado de México (Elías, 2013). *Armillaria mellea* se ha registrado en Los Reyes, Michoacán en durazno (Coria *et al.*, 2005), en aguacate se ha detectado en San Juan Viejo en aguacate (Ochoa, 2011), Salvador Escalante y Charapan, siendo en estos últimos municipios una especie desconocida (Michua, 2014). La etiología de las especies de *Armillaria* asociadas con la pudrición de la raíz del aguacate en Michoacán requiere de precisión.

Entre las diferentes técnicas para identificar especies con poca variación morfológica destacan la compatibilidad somática y análisis moleculares (Smith *et al.* 1990; Rizzo y Harrington, 1993; Worrall, 1994; Guilanum *et al.* 1996; Schulze *et al.* 1997). Los ITS e IGS del ADNr son polimórficos y proporcionan herramientas para estudios taxonómicos y filogenéticos para los cuales se han utilizado primers para amplificar estas regiones (White *et al.* 1990; Henrion *et al.* 1992; Gardes y Bruns, 1993; Chillali *et al.* 1998). Estas dos regiones se amplifican con PCR y las secuencias se analizan con enzimas de restricción (Haseawa *et al.* 2010). El factor de elongación *tef-1a* se ha manejado por tener utilidad filogenética (Haseawa *et al.* 2010). Maphosa *et al.* (2006) utilizaron este gen para un estudio filogenético de *Armillaria* y establecieron las relaciones entre especies de *Armillaria* de los Hemisferios Norte y Sur. El objetivo de la presente investigación fue identificar molecularmente las especies de *Armillaria* asociadas con la pudrición de la raíz del aguacate en el estado de Michoacán.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Muestreo y procesamiento de raíces y tejidos infectados

Se colectaron cuatro raíces con presencia de micelio de *Armillaria* sp. de cada uno de 10 árboles de aguacate con síntomas de pudrición, en tres huertos comerciales de los municipios de Charapan, Los Reyes (Zacán), Nuevo San Juan Parangaricutiro (San Juan Viejo), Salvador Escalante, Ario de Rosales y Tacámbaro en el estado de Michoacán. Las 30 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 (Aguín *et al.* 2004).

### 1.2.2. Aislamiento y conservación de las cepas

Los 30 aislamientos se realizaron 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 (1 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) (Cannon *et al.* 2007) con cinco réplicas de cada cepa.

### 1.2.2. 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 Cenis (2009).

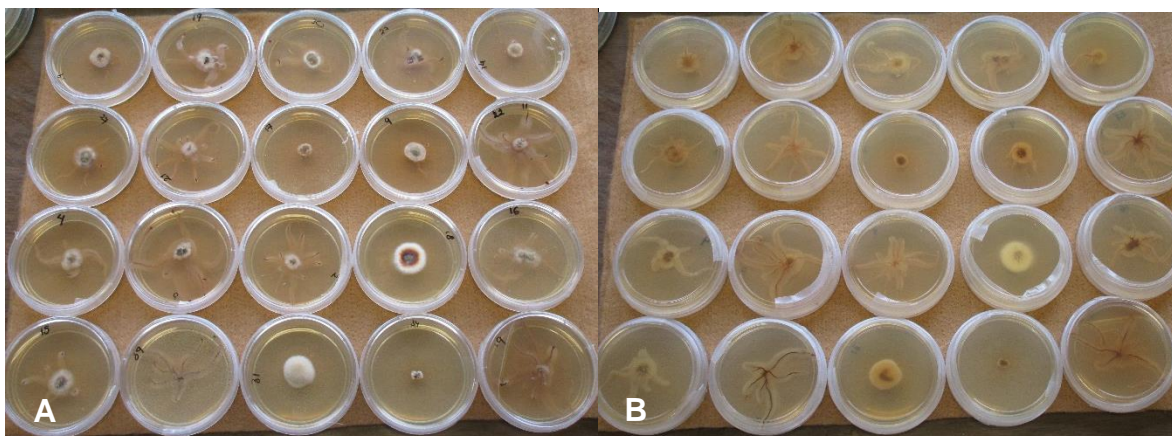


Figura 1. Morfotipos de *Armillaria* obtenidos de huertas de aguacate de diferentes municipios de la franja aguacatera de Michoacán. A. Anverso de las colonias; B. Reverso de las colonias.

Se amplificaron regiones de los genes *tef 1- $\alpha$*  y *rpb2*. Para el factor de elongación *tef 1- $\alpha$*  se utilizaron los primers EF1160R (5'CCGATCTTGTAGACGTCCTG3') y EFR595F (5'CGTGACTTCATCAAGAACATG3') (Maphosa *et al.* 2006) y para el gen *rPB2*, los

oligos fueron rpb2-6F (5' TGGGGKWTGGTYTGYCCTGC 3') y rpb2-7R (5' CCCATWGCYTGCTTMCCCAT 3') (Brazee *et al.*, 2011)

Los ensayos de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25 µL que contenía 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 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 en tubos de PCR de 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), consistiendo en 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 (Crous *et al.* 2009) 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).

La concentración y absorbancia del DNA se cuantificaron en el Nanodrop 2000c Spectrophotometer®. Las secuencias obtenidas se editaron a mano para eliminar las ambigüedades en los extremos y se realizó una búsqueda Blastn para encontrar aquellas con máxima identidad depositadas en el Genbank. Se obtuvieron los archivos fasta de secuencias de *Armillaria* spp. con mayor identidad y de aquellas que se consideraron adecuadas para realizar el análisis filogenético, incluyendo las secuencias de *Desarmillaria tabescens* (KY359140) para su utilización como grupo externo. Se realizó el alineamiento de las secuencias empleando el servidor MAFFT con los parámetros por default (Katoh *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. Los árboles generados mediante el criterio de ML se construyeron empleando el paquete IQ-TREE (Nguyen *et. al.*, 2015) obteniendo los valores de soporte SH-aLRT (%) / aBayes support / ultrafast bootstrap (UFBoot) support para cada bifurcación (Hoang et al., 2017). Debido a la congruencia entre los tres valores de soporte solo se incluyeron en el árbol los porcentajes de los valores 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/>).

### 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1.3.1.1. Amplificación de los genes *rpb2*, *tef* $\alpha$ -1 y filogenia

Con la amplificación del gen *tef*  $\alpha$ -1 se obtuvo una banda de 450 a 500 pb. La cepa MICH29 colectada en el huerto La Tepoja del municipio de Charapan se identificó como *Armillaria gallica*, de acuerdo con los resultados del BLAST (Figura 2).



Figura 2. Basidiocarpos de *Armillaria gallica* colectados en el huerto La Tepoja del municipio de 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.

El alineamiento con las secuencias del GenBank mostró un 99% de similitud con la secuencia JF895870 denominada por Brazee *et al.*, (2011) como *Armillaria gallica* (Figura 3). Esta es una de las especies reportadas en Norte América y que se encuentra estrechamente relacionada con *A. calvescens*. *A. gallica* está reportada en especies forestales en México (Alvarado *et al.*, 2007) y durazno (Elías, 2013), sin embargo, este es el primer reporte que corrobora la identidad de *A. gallica* causando la pudrición de la raíz del aguacate. La cepa 32 y 32R se alinea con *A. mexicana*, aunque no existen secuencias del gen *rpb2* para *A. mexicana* que corroboren la identidad de este aislado. La cepa 21 originaria de San Juan Viejo se situó de manera independiente entre el clado de *A. mellea* y *A. mexicana*; el porcentaje de alineamiento con estas especies es de 62% y 66%. Es probable que exista una relación entre estas especies, sin embargo para esta cepa en particular es necesario realizar la descripción morfológica y una filogenia multigen que incluya la amplificación de tres genes (ITS, factor de elongación y *rpb2*). No se puede descartar que debido a la heterogenicidad y poca variación en este gen resulte complicado diferenciar entre algunas especies como ocurre con la amplificación de los IGS-I (Haseawa *et al.*, 2010).

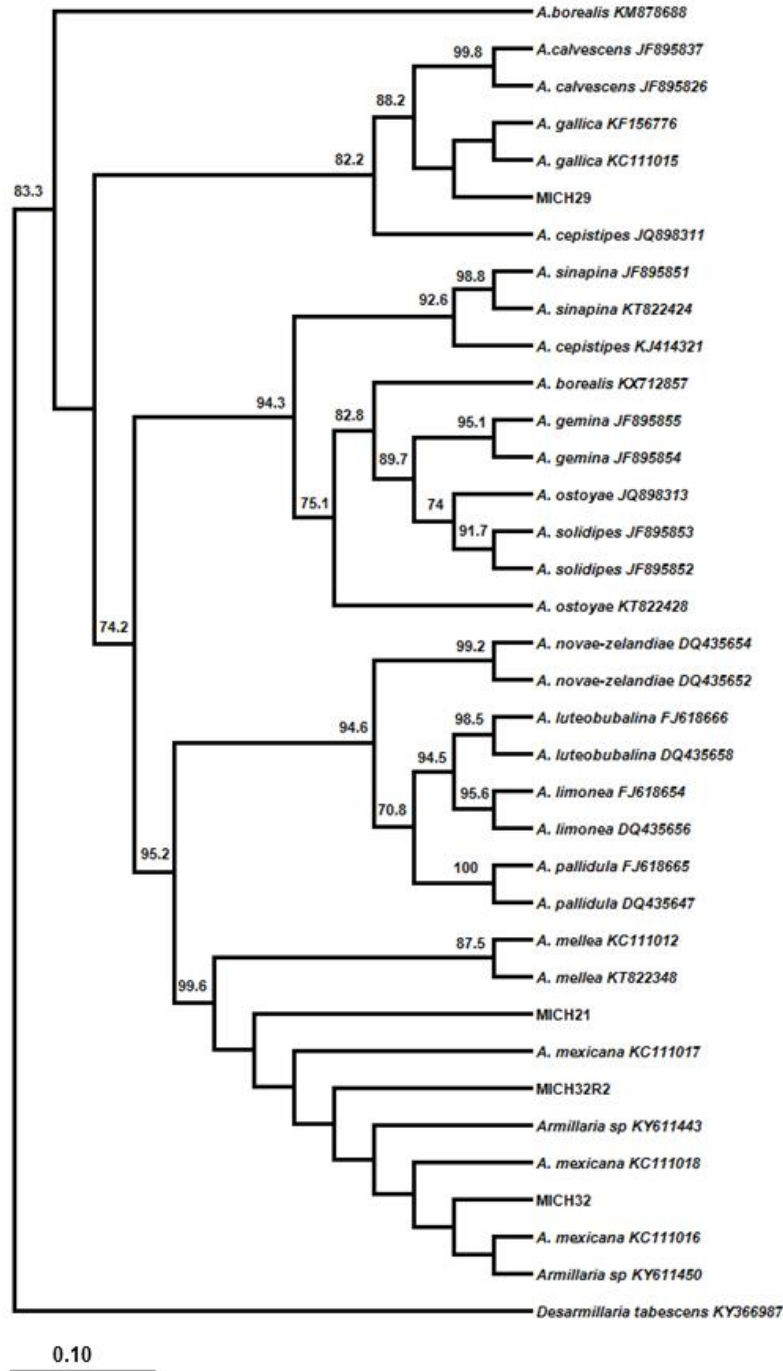


Figura 3. Análisis filogenético con secuencias de especies de *Armillaria* provenientes de aguacate y del GenBank amplificadas con el gen *tef alpha-1*. El aislado MICH29 se agrupó directamente con la especie *Armillaria gallica*. Las cepas MICH32 y 32 R están estrechamente relacionadas con *Armillaria mexicana*, mientras que MICH21 se agrupo entre el clado de *A. mellea* y *A. mexicana*

Las secuencias alineadas con el factor de elongación *tef I-alpha*, que mencionan Maphosa *et al.* (2006) sirven para analizar la relación entre especies e identificarlas (Haseawa *et al.* 2010). El aislado MICH29 es el único que se agrupó en el clado de *A. gallica* con 100% de identidad con estas secuencias y con una banda de entre 600 y 700 pb que es el rango de

fragmento obtenido para *Armillaria* utilizando el factor de elongación (Haseawa *et al.* 2010; Maphosa *et al.* 2006). En el caso de la cepa MICH21 los resultados son más consistentes, *Armillaria* sp se agrupó en un clado diferente situado entre *A. mexicana* y *A. mellea*. La relación entre los clados podría deberse que las especies de *Armillaria* del hemisferio sur son ancestros de las del Hemisferio Norte, según Maphosa *et al.* (2006).

Los resultados del alineamiento y análisis filogenético del gen *tef* $\alpha$ -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. Coetzee *et al.*, (2001) mencionaron que algunas especies están significativamente ligadas y que la amplificación de ITS no es suficiente para distinguirlas; con este gen las especies de *Armillaria* del Hemisferio Norte se definieron como estrechamente relacionadas (Dunne *et al.* 2002). Este hecho está estrechamente relacionado con la hibridación interespecífica como ocurre con *A. gallica* y *A. calvescens*, donde ambas especies son parcialmente infértiles y por eso hay unión de colonias; este fenómeno está reportado en especies de *Armillaria* en Norte América (Anderson y Stasovski, 1992; Kim *et al.* 2001). 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 (Long y Dawid, 1980). Las regiones IGS son parte de la familia multigénica de DNA repetidas en tándem. A pesar de la heterogeneidad intraespecies que se ha informado en IGS-I para *Armillaria* (Blaedow *et al.* 2010), Haseawa *et al.* (2010) encontraron que los análisis filogenéticos de ITS e IGS-I ayudan en la identificación de *A. mellea*, *A. ostoyae*, *A. nabsnana*, *A. tabescens* pero no para identificar *A. gallica*, *A. sinapina* y *A. cepistipes*. El gen *tef* $\alpha$ -1 corrobora la identidad de *A. gallica*. 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 (Alvarado *et al.* 2007; Elías, 2013. Respecto al gen *rpb2* no hay secuencias de todas las especies, sin embargo, la secuencia de la cepa MICH29 se alineó 100% con las secuencias de *A. gallica* existentes en el GenBank. 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 (Matheny *et al.* 2007). Sin embargo, este gen no discriminó entre las especies *A. calvescens* y *A. gallica* (Brazee *et al.*, 2011), probablemente porque la región de *rpb2* amplificada por estos autores no fue apropiada.

Hasta la fecha, el gen *rpb2* se ha empleado muy poco para examinar especies estrechamente relacionadas de *Armillaria* pero a comparación de las secuencias IGS e ITS se han utilizado en varios estudios filogenéticos. Estas regiones de la repetición de ADNr también proporcionan una resolución deficiente para distinguir especies estrechamente relacionadas de *Armillaria* (Sicoli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Ota *et al.*, 2011), y los aislados diploides a menudo contienen secuencias heterogéneas que pueden confundir el análisis (Kim *et al.*, 2006; McLaughlin y Hsiang, 2010). La partición filogenética de algunos aislados podría ser atribuida a su naturaleza homotética y los linajes filogenéticos podrían representar linajes clonales dentro de una especie. La tasa de heterogeneidad relativa ha indicado que los linajes evolucionan independientemente, y a la misma velocidad de su ancestro común. Estas aseveraciones junto con la distribución geográfica de las especies y las relaciones de los dos grupos, indican que los clados representan dos especies estrechamente relacionadas (Coetzee *et al.* 2003).

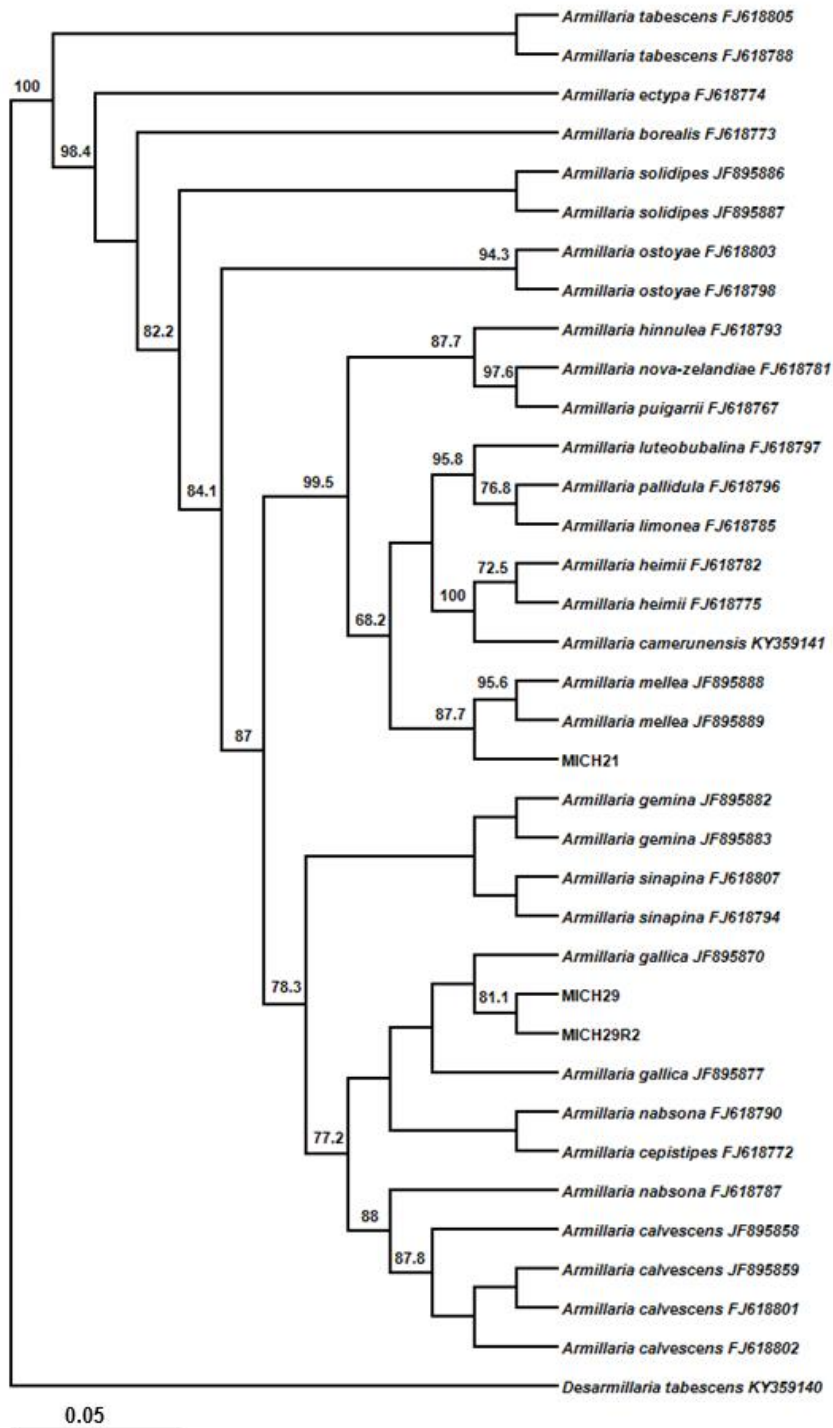


Figura 4. Análisis filogenético de secuencias de especies de *Armillaria* provenientes de aguacate y del GenBank amplificadas con el gen rpb2. La cepa MICH29 y MICH29R se agrupan directamente con la especie *Armillaria gallica*, mientras que MICH21 está relacionada con *A. mellea*.



## 1.4. CONCLUSIONES

1. Existen más de tres especies de *Armillaria* presentes en huertos de aguacate establecidos en suelos con antecedentes forestales en el Estado de Michoacán.
2. *A. gallica* se encontró localizada solo en un huerto del municipio de Charapan.
3. El factor de elongación fue el gen más adecuado para identificar especies de *Armillaria*.
4. La identificación de especies de *Armillaria* es complicada debido a los caracteres estrechos que poseen. Es necesario fundamentar los resultados con datos morfológicos y amplificación de genes como ITS, *tef 1- $\alpha$* , *rpb2* y LSU que diferencien los clados entre especies.

## 1.5. LITERATURA CITADA

- Aguín, C. O., Sainz, J. M. and Mansilla, V. P. 2004. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 110: 683–687.
- 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.
- Anderson, J. B. and Stasovski, E. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84: 505-516.
- Asociación de Productores y Exportadores de Aguacate de México (APEAM). 2015. Los Mercados Internacionales del Aguacate Mexicano. Uruapan, Michoacán, 14 de agosto.
- Baumgartner, K. 2004. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Disease* 88:1235-1240.
- Beckman, T.G. and Pussey P.L. 2001. Field Testing Peach Rootstocks for Resistance to *Armillaria* Root Rot. *Hortscience* 36:101-103.
- Brazeo, N.J., Hulvey, J.P. and Wick R. L. 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.
- Cannon, P., N.B.K., Mee, S. and Alvarado, R., D. 2007. An *Armillaria* survey in Mexico: A basis for determining evolutionary relationships, assessing potentially invasive pathogens, evaluating future impacts of climate change, and developing international collaborations in forest pathology p. 1-9. Western International Forest Disease Work Conference. October 15-19, Sedona, AZ. Salem, OR. Oregon Dep. of Forestry.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20:9.
- Chillali, M., Idder I. H., Guillaumin, J.J., Mohammed, C., Lung, E. B. and Botton, B. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycology Research* 102: 533-540.

- Coetzee, A. M. P., Wingfield, B. D., Harrington, T.C., Steimel, J., Coutinho, A. T. and Wingfield, J.M. 2001. The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. *Molecular Ecology* 10: 387–396.
- Coetzee, A.M.P., Bloomer, P., Ridley, G.S. and Wingfield, M.J. 2003. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates South America and Indo-Malaysia. *Mycologia* 95: 285-293.
- Coria, A., V.M. 2008. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, Libro Técnico No. 8, Uruapan, Michoacán, 145-146 p.
- Crous, P.W., Verkeley, G.J.M., Groenewald, J.Z. and Samson, R.A. 2009. Fungal Biodiversity. CBS. Laboratory Manual Series. 151 p.
- Dunne, C.P., Glen, M., Tommerup, IC., Shearer, B.L. 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.
- Elías, R. R. D. 2013. Etiología, patrón espacio-temporal y análisis filogenético de *Armillaria* spp. en árboles de durazno (*Prunus pérsica* L. Bastch) en el sur del Estado de México. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, 118 p.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- GIIIA (Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate. Autores en orden alfabético: Bautista, M. N., Beltrán, P. H., Castañeda, V. A., Chávez, A. A. M., Equihua, M. A., Duran, P. E., Fierro, C. D., González, H. H., González, S. M.G., Lomelí, F. R., Marroquín, P. F., Michua, C. J., Nava, D. C., Nieto, A. D., Ochoa, A. S., Ochoa, M. D., Rodríguez, L. E., Santillán, G. M. T., Saucedo, C. J. R., Soria, R. J., Téliz, O. D., Valdovinos, P. G., Vallejo, R. M. 2013. El Aguacate en Michoacán. Plagas y Enfermedades. López Impresos, Michoacán, México, 56 p.
- 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.
- Henrion, B., Le Tacon, F. and Martin, F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* 122:289-298.
- Hoang, D.T, Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q. and Vinh, L. S. 2017. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol*, in press.
- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. doi: 10.1093/bib/bbx108.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermin, L.S. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14:587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- Keča, N. 2009. *In vitro* interactions between *Armillaria* species and potential biocontrol fungi. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 100: 129-142.
- Kim S. M., Klopfenstein N. B., McDonald G.I., Arumuganathan K. and Vidaver A.M. 2001. Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCR-based techniques to assess intraspecific and interspecific matings of *Armillaria* species. *Mycology Research* 105:153-163.

- Kim M-S, Klopfenstein NB, Hanna JW, McDonald GI, 2006. Characterization of North American *Armillaria* species: Genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology* 36: 145-164.
- McLaughlin, J.A. and Hsiang, T. 2010. Identification protocol for six *Armillaria* species from northeastern North America. *Canadian Journal Forest Research* 40: 536-548.
- Maphosa, L., Wingfield, B.D., Coetzee, M.P.A., Mwenje, E. and Wingfield, M.J. 2006. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australian Plant Pathology* 35:513–520.
- Matheny P, Wang Z, Binder M, Curtis J, Lim Y, Nilsson R, Hughes K, Hofstetter V, Ammirati J, Schoch C, Langer E, Langer G, McLaughlin D, Wilson A, Froeslev T, Ge Z-W, Kerrigan R, Slot J, Yang Z-L, Baroni T, Fischer M, Hosaka K, Matsuura K, Seidl M, Vauras J, Hibbett D, 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430-451.
- Michua, C. J. 2014. Identificación, dispersión, histopatología e impacto económico de *Armillaria* en aguacate en Charapan, Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. 108 p.
- Morales, L. y Téliz, D. 2000. Pudrición de raíces por *Armillaria*. p. 169 *in* Téliz, D. 2000. El Aguacate y su Manejo Integrado. Mundi Prensa México. 233 p.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology Evolution*. 32:268-274. doi: 10.1093/molbev/msu300
- Nogales, A., Aguirreolea, E., Camprubí, A. and Calvet, C. 2009. Response of mycorrhizal grapevine to *Armillaria mellea* inoculation: disease development and polyamines. *Plant Soil*. 317: 177-187.
- Ochoa, A., S. 2011. Enfermedades del aguacate de importancia económica en México. *In*. Memoria del XXIV Curso de Actualización Frutícola. 12-14 de octubre. Coatepec Harinas, México. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, p. 9-11.
- Ota Y, Kim M-S, 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.
- Rizzo, D. M. and Harrington, T.C. 1993. Declination and biology of clones of *Armillaria ostoyae*, *A. gemina* and *A. calvescens*. *Mycologia* 85:164-174.
- Sicoli G, Fatehi J, Stenlid J, 2003. Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology* 33: 287-297.
- Smith, M.L., Duchesne, L.C., Brunh, J.N. and Anderson, J.B.1990. Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. *Genetics* 126: 575-582.
- 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.
- Tamayo, M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. *Politécnica Colombiana* 4:51-70.
- Téliz, D. 2000. El Aguacate y su Manejo Integrado. Mundi Prensa México. 233 p.
- Téliz, D., y Mora A. Coord. 2015. El Aguacate y su Manejo Integrado. 1ª reimpression 2ª Ed. bba (Biblioteca Básica de Agricultura). 321 p. Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, Instituto Nacional de Investigaciones

- Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Valdez, M., Córdoba, J., Valenzuela, R. y Fierros, M.A. 2004. Incremento del fitopatógeno *Armillaria mellea* (Vahl. Fr) Karsten en bosque de pino-encino, en relación al grado d disturbio por tratamiento silvícola. Revista Chapingo. Serie Forestales y del Ambiente 10:99-103.
- White, T. J., 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, J. J. 1994. Population structure of *Armillaria* species in several forest types. *Mycologia* 86:401-407.