



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGIA "PRESIDENTE JUAREZ"

*Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas*  
*Área Temática: Fisiología y Genética Vegetal*

## TESIS

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA Y PATOGÉNICA DE ESPECIES DE  
*Armillaria* (Vahl.: Fr.) Karsten ASOCIADAS A *Persea americana*  
Miller variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake

Que como requisito parcial para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:  
**Jesús Alejandro Ordaz Ochoa**

Directora de tesis:  
Doctora en Ciencias Agrícolas  
**Dra. Ma Blanca Nieves Lara Chávez**

Uruapan Michoacán agosto de 2017





**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES**  
**COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**PRESENTE**

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de tesis titulada: “**IDENTIFICACIÓN GENÉTICA Y PATOGENICA DE ESPECIES DE *Armillaria* (Vahl.: Fr.) Karsten ASOCIADAS A *Persea americana* Miller variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake**”, presentado por el **ING. JESÚS ALEJANDRO ORDAZ OCHOA**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**Morelia, Michoacán, a 01 de agosto de 2017.**

**MIEMBROS DE LA COMISION REVISORA**

*Blanca Nieves Lara Chávez*

Dra. Ma Blanca  
Nieves Lara Chávez  
Directora de Tesis

Dr. Ricardo Valenzuela Garza  
Sinodal

Dr. Héctor Guillen Andrade  
Sinodal

Dra. Martha Elena Pedraza Santos  
Sinodal

Dra. Margarita Vargas Sandoval  
Sinodal

*La Disciplina Tarde o Temprano  
Vencerá al Talento o a la Inteligencia*

(Proverbio japonés)

## *Dedicatoria*

*A mis padres, Ofelia Ochoa Pedraza y Gerardo Ordoz Ayala, por darme la vida, gracias. A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor, por mostrarme el camino correcto y guiarme por él, porque con su comprensión, cariño y todo su amor desinteresado son mi gran fortaleza, por servirme de apoyo y hacer el papel de mejores amigos, por darme todo sin pedir nada. A quienes, sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, por su dedicación, por renunciar a todo a cambio de cuidarme, porque siempre buscan lo mejor para mí y darme lo que necesito, por disfrutar cada momento que pasamos en la vida, por formarme como una persona con carácter sólido, por ser un buen ejemplo, por compartir experiencias y vivencias únicas. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por esto y más... Gracias. porque gracias a ustedes todo lo que tengo no hubiera sido posible.*

# Agradecimientos

*La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.*

*A ti Dios mío, por darme la oportunidad de existir así, aquí y ahora; por mi vida, que la he vivido junto a ti. Gracias por iluminarme y darme fuerzas y caminar por tu sendero.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para la realización de este proyecto de Tesis.*

*A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", por abrirme las puertas de sus instalaciones y darme la oportunidad de continuar con mis estudios.*

*A mi Padre, gracias a ti por ayudarme a crecer y a ser quien soy, gracias por tu dedicación, gracias por nunca esperar nada de mí, aunque te lo debo todo.*

*A mi Madre, que con su demostración de una mujer ejemplar me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.*

*A mi Hermano Gera Ordoz, por apoyarme en lo que he necesitado, gracias por todo y a pesar de las peleas, somos hermanos y siempre estaremos juntos*

*A mi asesora Dra. Ma Blanca Nieves Lara Chávez por aceptarme en su laboratorio sin conocerme, permitirme desarrollar nuestro proyecto en su laboratorio y proporcionarme todo el equipo necesario, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia, sus regaños y su motivación hemos logrado terminar esta tesis.*

*Al Dr. Ricardo Valenzuela, por sus atinadas correcciones y su apoyo en la caracterización morfológica de esporóforos*

*Al Dr. Héctor Guillén, por su valiosa aportación, y dejarme trabajar en su laboratorio cuando lo necesite.*

*A la Dra. Martha Pedraza, por sus valiosas aportaciones en la redacción de esta tesis.*

*A la Dra. Margarita Vargas, por sus consejos y su apoyo en la realización de este proyecto*

*A mis compañeros, colegas y amigos ingenieros: Eduardo Copiz, José Luis Vargas, Jesús Ibarra, Hugo; por brindarme su apoyo en las salidas a campo.*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio: Rafa toto, Juan Churape, Ruby, Linda Parquer, Sandybel, Señora Katalina, Mayra, Víctor Zúñiga, Luis, Víctor Pompe, Víctor el fresco, Pacc, Lucy, Roberto, Rulo, Karmen Y Gaby, por darme su amistad, su apoyo incondicional, y hacer que el trabajo del laboratorio fuera más agradable.*

*A mis colegas y amigos Angel, Guzy, Cristobal, Chanche, Flor, Ale, Rubén, Josa Por su apoyo y ánimos a pesar de que estamos un poco lejos.*

*Por último, a una de las personas más importantes de mi vida: a ti mi amor Angelica Cisneros Zambrano, por apoyarme incondicionalmente en todo, por estar a mi lado en cada momento, por alentarme a seguir adelante, y por amarme tanto a pesar de todos mis malos ratos. Te amo con todo mi corazón eres lo mejor que me pude pasar en la vida eres la niña de mis ojos porque solo tú los haces brillar, eres la mujer más hermosa del universo; te amo inmensamente y quiero pasar el resto de mi vida contigo.*

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	3
Objetivo General .....	3
Objetivos específicos .....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Importancia del cultivo del aguacate en México.....	4
2.2 Factores que limitan la producción de aguacate.....	4
2.3 Enfermedades de raíz del aguacate .....	4
2.4 <i>Armillaria</i> spp. ....	5
2.5 Características morfológicas de <i>Armillaria</i> spp. ....	5
2.5.1 Esporóforos .....	6
2.5.2. Basidiosporas .....	6
2.5.3 Rizomorfos.....	7
2.6 Síntomas y signos de la enfermedad de la raíz por <i>Armillaria</i> .....	8
2.7 Epidemiología y control de <i>Armillaria</i> spp.....	9
2.8 Control de la Enfermedad .....	9
2.9 Uso de herramientas biotecnológicas en la caracterización del género <i>Armillaria</i> .....	10
2.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1 Área de estudio.....	12
3.2 Ubicación del área experimental .....	12
3.3 Síntomas observados en campo.....	12
3.4 Elaboración de medios de cultivo .....	14
3.5 Obtención de aislamientos de <i>Armillaria</i> spp. ....	14
3.5.1 Purificación de cepas.....	15
3.6 Caracterización molecular.....	15
3.6.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	15
3.6.2 Cuantificación y análisis de calidad del ADN.....	15
3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
3.6.4 Secuenciación.....	16
3.7 Caracterización macro y microscópica de esporóforos .....	16
3.8 Pruebas de patogenicidad .....	17
3.8.1 Preparación del sustrato .....	17

3.8.2 Preparación del material vegetativo .....	17
3.8.3 Preparación del inoculo .....	17
3.9 Variables respuesta.....	18
3.10 Análisis de la información.....	18
IV.RESULTADOS.....	19
4.1 Escalas de severidad.....	19
4.2 Aislamiento y purificación de <i>Armillaria</i> spp.....	22
4.3 Caracterización morfológica de cepas.....	22
4.3.1 Forma de la colonia y textura del micelio .....	23
4.3.2 Tasa de crecimiento.....	23
4.4 Caracterización morfológica de esporóforos.....	24
4.4.1 La leña San Juan Nuevo .....	24
4.5 Pruebas de patogenicidad en plántulas de aguacate .....	25
4.5.1 Virulencia de <i>Armillaria</i> spp.....	26
4.5.2 Severidad de <i>Armillaria</i> spp.....	26
4.6 Extracción de ADN .....	28
4.7 Estandarización del protocolo de amplificación .....	28
4.7.1 Amplificación ITS.....	29
4.7.2 PCR en gradiente.....	29
4.8 Comparación de secuencias en BLAST .....	30
V. CONCLUSIONES .....	32
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	33

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características de los sitios de recolecta para el aislamiento de cepas de <i>Armillaria</i> spp. ....	12
<b>Cuadro 2.</b> Determinación de las fechas en las que emergieron los esporóforos. ....	21
<b>Cuadro 3.</b> Características y ubicación de los sitios de colecta. ....	22
<b>Cuadro 4.</b> Reacción de PCR en gradiente con 12 temperaturas diferentes .....	29

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspecto que presentan los árboles de aguacate muestreados afectados por la pudrición blanca. A) Árbol muerto, B) hojas adheridas al árbol con un característico color café cobrizo, C) micelio y rizomorfos sobre la corteza. ....	13
<b>Figura 2.</b> Forma de tomar la muestra para transportar al laboratorio y estructuras que presenta el fitopatógeno. A) Toma de la muestra. B), micelio en forma de abanico sobre el tallo de aguacate.....	14
<b>Figura 3.</b> Escala de severidad de síntomas foliares por pudrición de raíz de aguacate producido por <i>Armillaria</i> spp. Árbol sano (I), Defoliación inicial de puntas (II); Amarillamiento y sobreproducción de fruta (III); muerte regresiva (IV); árbol muerto (V).....	20
<b>Figura 4.</b> Escala de síntomas y signos del avance del fitopatógeno en tronco: Sano (I), Inicio de síntoma mancha oscura (II); Agrietamiento y presencia de micelio (III); Exudado café oscuro (IV); grietas profundas y muerte (V).....	21
<b>Figura 5.</b> <i>Cepas de Armillaria en medio de cultivo PDAZ, aisladas de raíz, tallo y corona de árboles de aguacate.</i> ....	23
<b>Figura 6.</b> Estructuras macro y microscópicas de esporóforos. San Juan Nuevo. A) Esporóforos, B) basidios y esporas, C) trama, D) hifas.....	24
<b>Figura 7.</b> Síntomas aéreos en plántulas inoculadas con las distintas cepas. (A) Planta sana; (B) amarillamiento y defoliación inicial apical; (C) defoliación casi completa;(D) poco follaje con muerte apical y (E) planta muerta. ....	25
<b>Figura 8.</b> Comparación de medias (Tuke $\alpha=0.05$ %) para virulencia de 11 cepas de <i>Armillaria</i> spp. Inoculadas en plántulas de aguacate. ....	26
<b>Figura 9.</b> Imagen que muestra el grado 4 en la escala de Lara 2008 (muerte) en plántulas de aguacate inoculadas con <i>Armillaria</i> spp.....	27
<b>Figura 10.</b> Imagen que muestra el grado 3 en la escala de Lara 2008 (marchitamiento y muerte apical) en plántulas de aguacate inoculadas con <i>Armillaria</i> spp. ....	27
<b>Figura 11.</b> Visualización de ADN en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de Etidio. Carril 1 y 21 marcador de peso molecular; carril 2 a 20 y 22 a 24; ADN de las cepas; carril 25 a 29 ADN de los esporóforos.....	28
<b>Figura 12.</b> Visualización de PCR en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de Etidio. Carril 1 a 12 cepas; carril 13 a 17 esporóforos; carril 18 control positivo, carril 19 control negativo y carril 20 marcador de peso molecular. ....	30
<b>Figura 13.</b> Comparación de una secuencia de ADN en homología con secuencias de base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante el software BLAST .....	31

## RESUMEN

México actualmente es el principal productor de aguacate a nivel mundial, Michoacán es el estado que tiene la mayor producción a nivel nacional; sin embargo, no está exento de problemas fitosanitarios, en los últimos años ha destacado por su importancia el fitopatógeno *Armillaria* spp., causa la enfermedad conocida como pudrición blanca por las estructuras que forma sobre la madera dañada del árbol, genera grandes pérdidas económicas en la producción. Con base en lo anterior se planteó el objetivo de identificar morfológica, genética y patogénicamente especies del género *Armillaria* causantes de la pudrición blanca en árboles de aguacate. De las recolectas en campo (raíz, tallo, corona) se aislaron 11 cepas con características similares a las descritas para el género *Armillaria*, en todos los casos presentaron rizomorfos, siete con crecimiento dicotómico y cuatro con crecimiento simple, tiñeron el medio color café; la tasa de crecimiento oscilo entre 2.3 y 3.5 mm por día; se realizó extracción de ADN de las 11 cepas de acuerdo al protocolo de Lee *et al.* (1991) y CTAB 3 % (Ahrens y Seemueller, 1992) modificado por Cazares *et al.*, (2010), para la amplificación se empleó el Primer ITS. Se recolectaron esporóforos en los mismos sitios donde se recolectó el material vegetativo, para su caracterización se determinó; tamaño, grado de humedad, color, forma del píleo, forma del estípite, margen, forma y frecuencia de laminillas, tipo de volva, velo, trama, hifas, tamaño y contexto, de esporas, forma, ornamentación, color y tamaño, tipo de basidios, tamaño, forma, color y numero de esterigmas. De los esporóforos también se realizó extracción de ADN y amplificación con el mismo primer que usaron para las cepas. Las secuencias se compararon en la base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante el software BLAST, dio como resultado que las cepas SFC1, SFC2, SFC3, SAZ1, SAZ2 y CHA1 presentaron entre 83 y 89 % de identidad para *Armillaria ostoyae*; las cepas de SJN y HTA1 presentaron 82 % de identidad con *Armillaria gallica*, las cepas de CHA2, CHA3 y HTA2 tuvieron entre 94 y 84 % de identidad para *Armillaria mellea*. Las pruebas de patogenicidad en plántulas de aguacate indicaron que las 11 cepas presentaron virulencia y severidad de la enfermedad en diferentes grados, se observaron los mismos síntomas que en campo en árboles de aguacate.

**Palabras clave:** rizomorfos, esporóforos, micelio, aguacate, fitopatógeno.

## ABSTRACT

Mexico is currently the main producer of avocado worldwide, Michoacan is the state with the highest production nationwide; However, it is not exempt from phytosanitary problems. In recent years, the plant pathogen *Armillaria* spp., Has caused the disease known as white rot by the structures that form on the damaged wood of the tree, generates great economic losses in the production. Based on the above, the objective was to identify morphological, genetic and pathogenic species of the genus *Armillaria* that cause white rot in avocado trees. Eleven strains with similar characteristics to those described for the genus *Armillaria* were isolated from the field (root, stem, crown), in all cases they presented rhizomorphs, seven with dichotomous growth and four with simple growth, they stained the brown medium; The growth rate oscillates between 2.3 and 3.5 mm per day; DNA extraction from the 11 strains was performed according to the protocol of Lee et al. (1991) and 3% CTAB (Ahrens and Seemueller, 1992) modified by Cazares et al. Al., (2010), for the amplification the Primer ITS was used. Sporophores were collected at the same sites where the vegetative material was collected, for their characterization to be determined; Size, degree of humidity, color, shape of the spike, shape of the stipe, margin, shape and frequency of leaflets, volva type, veil, weft, hyphae, size and context, spores, shape, ornamentation, color and size, type Of basidia, size, shape, color and number of stereos. Sporophores were also extracted DNA and amplified with the same primer they used for the strains. Sequences were compared in the genbank database (NCBI GenBank) using the BLAST software; Resulted in that the SFC1, SFC2, SFC3, SAZ1, SAZ2 and CHA1 strains had between 83 and 89% identity for *Armillaria ostoyae*; The strains of SJN and HTA1 presented 82% identity with *Armillaria gallica*, strains of CHA2, CHA3 and HTA2 had between 94 and 84% of identity for *Armillaria mellea*. The pathogenicity tests in avocado seedlings indicated that the 11 strains showed virulence and disease severity to different degrees, the same symptoms were observed that in the field in avocado trees.

**Key words:** rhizomorphs, sporophores, mycelium, avocado, pathogen.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, México es el principal productor de aguacate a nivel mundial; lugar que obtiene por las 205, 250.42 ha plantadas que producen 1,889,353.60 t, ocupa la tercera posición a nivel nacional por el valor de su producción con \$ 30' 265, 787.40 (SIAP, 2016).

En Michoacán, el aguacate tiene las mejores condiciones de suelo y clima para su desarrollo; sin embargo, estas condiciones también favorecen el desarrollo de diversos fitopatógenos que dañan el sistema radicular. En la franja aguacatera, se estima que 25 enfermedades reducen la producción entre 30 y 40 %; de estas, 20 son ocasionadas por hongos, destacan las que dañan la raíz. Entre estos fitopatógenos se reporta; *Phytophthora cinnamomi* Rands, que causa la enfermedad más importante y destructiva del aguacate; además de varias especies de los géneros *Ganoderma*, *Fusarium*, *Rosellinia*, *Verticillium*, *Phymatotricopsis* y recientemente *Armillaria*, que ocasionan pudriciones radiculares, y como con secuencia importantes pérdidas económicas a los productores (Lara, 2008; Téliz y Mora, 2007; Phillips *et al.*, 1986).

El género *Armillaria* se ha reportado recientemente como problema fitosanitario en aguacate. Es uno de los géneros más importantes entre los hongos fitopatógenos que dañan la raíz de diferentes especies de plantas en todo el mundo. Ataca a cientos de especies de árboles maderables como, *Abies*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* y cultivos agronómicos como cítricos, *Juglans*, *Malus*, *Prunus*, *Vitis*; en una amplia gama de climas. La enfermedad de la raíz por *Armillaria* afecta plantaciones agronómicas y maderables establecidas en tierras previamente ocupada por cultivos de frutales infectados o bosque infectado (Baumgartner *et al.*, 2011; Baumgartner y Rizzo, 2001; Entry *et al.*, 1991; Hood *et al.*, 1991).

La mayoría de las especies de *Armillaria* se consideran necrotrofos facultativos; tienen una fase parasitaria y una fase saprofita (Rishbeth, 1985). En la primera fase *Armillaria* coloniza el cambium de las raíces vivas (fase parasitaria). En la segunda fase, el hongo mata el cambium, causa una lesión necrótica debajo de la corteza de la raíz. Por último, el hongo se alimenta del tejido muerto (fase saprófita). Esta capacidad saprofita hace que el fitopatógeno sea muy difícil de controlar, el micelio puede persistir durante años en las raíces de árboles muertos, las cuales quedan enterradas en el suelo después de eliminar

los árboles infectados. Aunque la gran capacidad saprofita del hongo es considerada de gran utilidad en los ecosistemas naturales, porque degrada la lignina y por lo tanto tienen un papel importante en el ciclo del carbono. Las especies de *Armillaria* varían considerablemente en virulencia; todas tienen la capacidad de colonizar las raíces, pero algunas son la principal causa de muerte de la planta como *Armillaria ostoyae*; otras atacan hospederos ya estresados por insectos o algún otro factor, como *Armillaria cepistipes* (Prospero *et al.*, 2004). Entre las especies más virulentas, de los ecosistemas forestales se encuentra *Armillaria ostoyae*, en cultivos agrícolas la especie más reportada es *Armillaria mellea* (Gregory *et al.*, 1991). Sin embargo, estas diferencias dependen de la distribución geográfica del hospedero.

Las plantas infectadas por especies de *Armillaria*, presentan diferentes grados de severidad, retraso en el crecimiento, follaje pequeño, marchitamiento, defoliación prematura, resinosidad en el caso de coníferas y frutales, las estructuras que forma en sus hospederos son; esteras blancas de tejido fúngico (micelio en forma de abanico), se puede encontrar debajo de la corteza de raíces infectadas. En ocasiones se encuentran rizomorfos en las plantas infectadas, y están entrelazados ya sea dentro del micelio y la raíz de la corteza o extendidos en el suelo (Baumgartner *et al.*, 2011).

Hasta la década de 1980, la identificación taxonómica *Armillaria* estaba basada en características morfológicas descritas para los agaricales: esporas blancas, agallas decurrentes y micelio vegetativo diploide, rizomorfos de color marrón rojizo, ya sea en el campo o en cultivos (Baumgartner *et al.*, 2011; Volk y Burdsall, 1996; Watling *et al.*, 1991). Ornamentación y la estructura del estípite y píleo, ubicación de los pigmentos, el tamaño de la basidiospora y ornamentación, (Pildain *et al.*, 2010; Volk y Burdsall, 1996; Watling *et al.*, 1991). Sin embargo, la clasificación taxonómica se basa en características morfológicas ha presentado una serie de inconvenientes para poder definir a las especies, porque los esporóforos son efímeros e irregulares, la coloración cambia debido a que son influenciados por el medio ambiente o bien algunas especies presentan esporóforos idénticos (*Armillaria ostoyae*, *Armillaria gemina*). A pesar de estas limitaciones, el concepto biológico de especie es la base de muchos estudios taxonómicos (Baumgartner *et al.*, 2011; Bérubé y Dessureault, 1989), por lo tanto, es un reto acertar al estatus taxonómico de las especies de *Armillaria* si solamente se basa en sus características fenotípicas.

Desde que se publicaron las primeras secuencias moleculares por Anderson y Stasovski (1992), la comparación de secuencias de ADN y los análisis filogenéticos de datos de secuencias de ADN se utilizan cada vez más para descubrir nuevas especies e identificar los aislados de *Armillaria* a nivel de la especie. Otros métodos basados en el ADN que se han empleado para este fin incluyen la hibridación ADN-ADN (Jahnke *et al.*, 1987), composición de bases de ADN (Motta *et al.*, 1986), amplificación de longitud de fragmentos polimorfismos (AFLP) (Wingfield *et al.*, 2009; Pérez-Sierra *et al.*, 2004) y la longitud de fragmentos de restricción polimorfismos (RFLPs) (Anderson *et al.*, 1987; Smith y Anderson, 1989) ADN mitocondrial, ADN nuclear de células enteras (Anderson *et al.*, 1987), el intrón ribosomal completo (Anderson y Bailey, 1989; Schulze *et al.*, 1995) y RFLPs de regiones amplificadas por PCR del espaciador del rDNA intergénicas I (IGS-I) y el espaciador transcrito interno (ITS) (Mwenje *et al.*, 2003; Coetzee *et al.*, 2000; Chillali *et al.*, 1998; Chillali *et al.*, 1997; Harrington y Wingfield, 1995).

Con base en lo anterior en el presente trabajo de investigación se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

### **Hipótesis**

El hongo fitopatógeno *Armillaria* spp., causa la pudrición blanca en *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*.

### **Objetivo General**

Identificar genética y patogénicamente especies del genero *Armillaria*, causantes de síntomas de pudrición blanca en *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*.

### **Objetivos específicos**

1. Recolectar y aislar especies de *Armillaria*, asociadas a la pudrición de raíces y tallos de *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*.
2. Identificar morfológica, genética y patogénicamente las especies de *Armillaria*, aisladas de raíces y tallo de aguacate con síntomas de pudrición.
3. Caracterizar morfológicamente los esporóforos de *Armillaria* spp., recolectados en los distintos huertos.
4. Establecer pruebas de patogenicidad en plántulas de *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia del cultivo del aguacate en México

En México el aguacate (*Persea americana* Miller), es en la actualidad uno de los cultivos más importantes, no solo por la cantidad de toneladas producidas, sino también porque genera miles de empleos directos e indirectos y permite una entrada importante de divisas por la exportación de su fruta, (SIAP, 2016). Es importante socioeconómicamente ya que aporta beneficio a productores, comercializadores, industrializadores y consumidores, por la demanda de mano de obra en insumos en las diferentes actividades de la cadena productiva. Actualmente, se le ha dado gran importancia en lo que respecta a la salud humana por el contenido nutricional de su pulpa (Téliz y Marroquín, 2008).

### 2.2 Factores que limitan la producción de aguacate

Como muchas otras especies frutales, el aguacate sufre del ataque de distintas enfermedades durante sus etapas de desarrollo. Diversos factores limitan la productividad y longevidad del árbol, estas pueden ser bióticas, producidas por microorganismos (bacterias, hongos, virus y nemátodos), abióticas, causadas por factores ambientales como heladas, granizadas, exceso de lluvia, sequía, salinidad del suelo, deficiencias nutrimentales o bien factores fisiológicos propios de la genética de la planta (Ochoa, 2011).

Las enfermedades bióticas son producidas por microorganismos, éstas pueden diseminarse entre árboles y huertos vecinos, por la lluvia, viento, herramientas de trabajo, injertos, acarreo de suelo contaminado de otras áreas, insectos, en el agua de riego, entre otros (Teliz y Mora, 2007).

### 2.3 Enfermedades de raíz del aguacate

Los hongos causantes de pudriciones de raíces son habitantes del suelo que han desarrollado formas de sobrevivencia, por lo que es difícil su control, los árboles de aguacate no deben de tener exceso o falta de agua porque esto es favorable para estos fitopatógenos. Los ajustes hídricos (falta de agua por periodos prolongados seguidos de riegos abundantes) promueven la presencia y severidad de *Phymatotrichum* sp., mientras que el exceso de humedad y encharcamiento favorece el ataque de *Dematophura* spp., y *Armillaria* spp. Las prácticas culturales para disminuir el inóculo de estos fitopatógenos deben estar enfocadas a disminuir la capacidad de retención de humedad del suelo

mediante la aplicación de abonos orgánicos y el riego adecuado para evitar el exceso o deficiencia de humedad en el suelo (Teliz y Mora, 2007).

Los síntomas que presentan en los árboles atacados por fitopatógenos que causan pudriciones radicales puede ser que, posiblemente se manifiesten de forma similar al principio, dado que en estos casos hay un taponamiento de los haces vasculares o bien, una destrucción de las raíces, lo que propicia la no circulación de los nutrientes y el agua, esto da como resultado un marchitamiento en la parte aérea, seguido en ocasiones por un amarillamiento o clorosis del follaje, un estudio particularizado nos muestra que para cada caso hay signos y características propias que las diferencian unas de otras (Morales, 1991).

#### **2.4 *Armillaria* spp.**

Las especies del género *Armillaria*, son considerados como uno de los fitopatógenos importantes que infecta las raíces de diferentes especies de familias botánicas, presentan un amplio rango de hospederos, desde especies forestales (*Pinus* spp., *Abies* spp., *Pseudotsuga* spp.) y cultivos agrícolas (*Prunus* spp., *Citrus* spp., *Vitis* sp., *Persea* sp.) en una amplia gama de climas (Baumgartner, 2011; Hood *et al.*, 1991).

#### **2.5 Características morfológicas de *Armillaria* spp.**

Las características morfológicas de *Armillaria* spp., son muy variables entre especies. Es un hongo comestible y es conocido como “babosito”, “hongo de tronco” y “hongo de miel”, por el color del píleo que va desde amarillento rosado, color miel a moreno-amarillento, moreno rojizo o moreno oscuro.

De manera general Shaw y Kile (1991) mencionan algunas características importantes a nivel de género para diferenciarlo de otros Basidiomycetes; el estípote es blanquecino, arriba del anillo de color amarillo ocráceo a moreno oscuro, llega a ser grisáceo a negro en la base, es fibroso y provisto de un anillo conspicuo del mismo color del estípote, presenta pequeñas escamas café oscuro que desaparecen conforme madura, se origina de los rizomorfos de color negro, el ápice es luminiscente, igual que el micelio, estas características son variables y dependen de la especie (Valdés *et al.*, 2004; Herrera y Ulloa, 1990; Guzmán, 1980.). Bajo el píleo aparecen las láminas ligeramente arqueadas y algo decurrentes de color blanco a crema y pardo rojizo, lo cual depende del estado de madurez que se encuentre, en las láminas se observan los basidios y en cada uno se

producen cuatro basidiosporas elípticas de 7-8 X 5-6  $\mu\text{m}$ , esporas blancas el pie, de 10-15 X 1 cm, es cilíndrico, fibroso elástico, radicante con una base atenuada (estrechada gradualmente), a veces bulbosa, ya que en esta parte se une con otros esporóforos y forma grupos. La textura es consistente de color pálido de sabor agradable en los esporóforos jóvenes, amargo y astringente en los adultos, no presenta fíbulas el micelio.

### **2.5.1 Esporóforos**

El basidioma de *Armillaria* es marrón a rojizo convexo, que posteriormente se hace plano con la edad. La etapa vegetativa del hongo tiene dos formas. La primera son los rizomorfos, que crecen debajo de la corteza y que son planos, con coloración negra a marrón rojizo, y hasta 5 mm de ancho. La capa exterior se compone de un pseudoparénquima (micelio compacto) oscuro y en el núcleo interno es, un prosénquima formado por hifas entrelazadas (Forest Pest Fact Sheet, 2014).

### **2.5.2. Basidiosporas**

Recientes estudios han revelado de manera más clara el papel de las basidiosporas en las poblaciones de *Armillaria*, investigaciones con micro satélites han demostrado que las poblaciones de *Armillaria* son panmícticas (población formada por individuos de sexos separados), y la evidencia de flujo de genes entre poblaciones separadas por 1000-3000 km , sugiere que no hay restricción en la dispersión de esporas a través de estas distancias (Próspero *et al*, 2010; Baumgartner *et al.*, 2009; Worrall *et al*, 2004.; Le Francois *et al.*, 2002). Esta falta de subdivisión de la población es de extrañar, ya que la estación de fructificación es limitada y los esporóforos se deterioran a los pocos días de formación. Sin embargo, es consistente con la observación de que las basidiosporas pueden permanecer latentes durante meses y en condiciones ambientales relativamente estresantes. Es muy raro encontrar micelios haploides en las poblaciones naturales de *Armillaria*, la rareza de estos micelios es probablemente el resultado de un muy breve período entre el momento de la germinación de las esporas y el apareamiento de micelios haploides para formar micelios diploides, como es el caso con micelio primario de otros Homobasidiomycetes descomponedores de madera (Peabody *et al.*, 2000; Garbelotto *et al.*, 1997).

En futuras investigaciones es necesario identificar el sustrato colonizado por basidiosporas, como son dispersadas por el viento, y si es posible que germinen en restos

de madera, en la superficie del suelo, en troncos de árboles, y que el micelio haploide resultante persista en forma saprofita. La evidencia en apoyo de esta hipótesis ha sido proporcionada por el aislamiento de *A. novae-zelandiae* a partir de piezas de madera de pino radiata que actúa como trampas para esporas dispersadas por el viento (Hood *et al.*, 2002), y el aislamiento de *A. ostoyae* de forma natural que se produce en restos de madera de *P. resinosa* (Kromroy *et al.*, 2005) que crecen con frecuencia en tocones de árboles muertos, es posible que la colonización de dichos sustratos por esporas permita la infección de raíces vivas, o alternativamente, las esporas de *Armillaria* pueden filtrarse a través del perfil del suelo para germinar directamente sobre las raíces vivas. De hecho, las cepas haploides de *A. mellea* son tan virulenta como cepas diploides (Baumgartner *et al.*, 2010).

### 2.5.3 Rizomorfos

Los rizomorfos son adaptaciones morfológicas especiales; con una apariencia externa similar a las raíces de árboles (Shaw y Kile, 1991), se extienden por el suelo para encontrar y parasitar raíces de árboles de plantas vecinas (Worrall *et al.*, 1986). Proporcionan un método de propagación vegetativa, es el más común que el hongo utiliza para extenderse de un hospedante a otro (Snider, 1959; Harting, 1873).

Los rizomorfos de *Armillaria* no son propágulos invernantes como los esclerocios de *Rhizoctonia solani* (Basidiomycota, Ceratobasidiaceae) o las clamidosporas de *Fusarium oxysporum* (Ascomycota, Nectriaceae) que al desprenderse de las raíces infectadas permanecen latentes en el suelo durante largos periodos de tiempo en ausencia de un hospedero. En el caso de los rizomorfos en ausencia de su hospedero su viabilidad es menor. Sin embargo, así como los esclerocios y clamidosporas, los rizomorfos de *Armillaria* son infecciosos. En campo se reportan extensas redes de rizomorfos para algunas especies (*Armillaria gallica*), Prospero *et al.*, (2006); Morrison, (2004); Redfern y Filip, (1991) sugieren que especies de *Armillaria* pueden variar en sus modos de propagación subterránea. Si los patrones o etapas de la infección en raíz son iguales para las infecciones iniciadas por rizomorfos o por hifas, es difícil determinar la relación entre la capacidad y forma de virulencia de los rizomorfos. La habilidad de manipular el crecimiento de rizomorfos con diversas enmiendas al medio de crecimiento (Weinhold, 1963), o con varias combinaciones de temperatura y humedad (Pearce y Malajczuk, 1990), sugiere que la formación del rizomorfo está influenciada por un conjunto complejo

de factores además de la identidad de la especie. Es posible que jueguen un papel en la fisiología de *Armillaria*, además de su importancia epidemiológica, un descubrimiento indica que los rizomorfos contienen poros especializados para el intercambio de gases (Pareek *et al.*, 2006). Dado que se ha demostrado que pueden crecer a grandes profundidades de la superficie del suelo y ayudan al micelio a respirar en un ambiente con alto contenido de dióxido de carbono, así como por debajo de la corteza de la raíz con poco oxígeno, (Baumgartner *et al.*, 2011; Morrison, 1976).

## **2.6 Síntomas y signos de la enfermedad de la raíz por *Armillaria***

Las plantas infectadas, presentan diferentes grados de severidad, retraso en el crecimiento, follaje pequeño, marchitamiento, defoliación prematura, resinosis, en el caso de coníferas y frutales, micelio del hongo debajo de la corteza de los árboles infectados (micelio en forma de abanico), cuando se observan estas estructura del hongo facilita su diagnóstico, también es posible encontrar rizomorfos en las plantas infectadas, entrelazados ya sea dentro del micelio y la raíz de la corteza o extendidos en el suelo (Baumgartner *et al.*, 2011).

Los síntomas más comunes es una reducción gradual de crecimiento de los brotes vegetativos y baja en la producción o rendimiento, cuando los daños son muy severos rápidamente muere el hospedero independientemente de la edad (Baumgartner y Rizzo, 2002). El inicio de los síntomas foliares se asocia típicamente con la presencia de micelio subcortical, tanto en la corona y en la mayoría de las raíces principales, madera parcialmente descompuesto debajo del micelio, con una apariencia acuosa. Si se toman muestras de estas raíces o madera dañada es fácil de aislar *in vitro*, se utiliza agar agua adicionado con benomil y estreptomycinina para evitar contaminaciones de hongos y bacterias transmitidas por el suelo (Harrington *et al.*, 1992). Las cepas de *Armillaria* aisladas de estas fuentes de inóculo se pueden distinguir de otros basidiomicetos principalmente por la ausencia de estructuras reproductivas y la presencia de rizomorfos (Baumgartner *et al.*, 2011; Watling *et al.*, 1991).

## **2.7 Epidemiología y control de *Armillaria* spp.**

La epidemiología de la enfermedad de la raíz por *Armillaria* difiere en cierta medida entre especies de árboles; en cultivos frutales, árboles maderables y bosque natural, la infección se cree que ocurre principalmente por el contacto de raíces de árboles sanos con raíces de árboles enfermos. La infección de árboles por basidiosporas dispersadas por el viento ocurre en menor grado, esto se ha demostrado con estudios basados en pruebas indirectas, como la localización del lugar, la distribución de las plantas sintomáticas y la presencia de raíces residuales (Baumgartner y Rizzo, 2002; Rizzo *et al.*, 1998).

El micelio puede persistir como saprofito durante meses o años en raíces bajo el suelo, de este modo sirve como fuente de inóculo. Una vez establecida la enfermedad la propagación vegetativa del hongo de un árbol a otro es a través del crecimiento de rizomorfos en el suelo o como micelio a través de las raíces susceptibles, en lugar de la dispersión de esporas, esto a pesar del hecho de que se forman basidiocarpos en los hospederos infectados (Próspero *et al.*, 2008; Baumgartner y Rizzo, 2002; Dettman y van der Kamp, 2001).

## **2.8 Control de la Enfermedad**

La mayoría de investigaciones sobre el control de la enfermedad de la raíz por *Armillaria* se ha centrado en la prevención de la infección en los cultivos agrícolas, mediante fumigaciones al suelo con bromuro de metilo (Adaskaveg *et al.*, 1999). Se tiene en cuenta que es el producto más potente contra el inóculo de *Armillaria*, sin embargo, este se prohibió para su uso, por lo que es necesario un método de control alternativo (Gubler *et al.*, 2004).

También se han empleado con buenos resultados especies de hongos mico-parásitos del género *Trichoderma* como alternativa de control biológico, mediante la inoculación del suelo, (Munnecke *et al.*, 1981). Aunque algunas cepas de *Trichoderma* spp., muestran una excelente inhibición *in vitro* del crecimiento *Armillaria mellea* (Raziq y Fox, 2003), es difícil obtener las concentraciones necesarias de este hongo antagonista en el suelo, especialmente en profundidades de más de 0.3 m (Otieno *et al.*, 2003). Hongos xilófagos saprófitos como *Ganoderma lucidum* son una alternativa para el control del micelio *Armillaria* en madera, lo que sugiere que la inoculación de árboles infectados, puede dar

lugar a un cierto nivel de erradicación del fitopatógeno (Cox y scherm, 2006; Chapman y Ziao, 2000; Pearce *et al*, 1995).

La aplicación de inoculantes comerciales que contienen bacterias antagonistas como *Bacillus subtilis* a través del sistema de riego por goteo (Baumgartner y Warnock, 2006), pueden producir aumentos del rendimiento de plantas infectadas porque incluyen uno o más de los mecanismos generales de biocontrol: parasitismo o antibiosis, la exclusión competitiva del fitopatógeno y la promoción de crecimiento de las plantas. *A. mellea*, *A. ostoyae* y *A. luteobubalina*, son tres de las especies más virulenta del genero *Armillaria*, se inhiben *in vitro* por bacterias que se encuentran de forma natural en el suelo como, *Bacillus spp.*, *Pseudomona fluorensces*, *actinobacterias* y *Streptomyces spp.* (de Vasconcellos y Cardoso, 2009; Baumgartner y Warnock, 2006; Delong *et al*, 2002).

La persistencia del inóculo dura años o décadas en el suelo (Baumgartner y Rizzo, 2002), combinado con la falta de métodos eficientes para prevenir de manera efectiva (Gubler, 2004) o curar infecciones (Aguin-Casal *et al*, 2006; Adaskaveg y Col, 1999), contribuye a reducir significativamente el rendimiento a lo largo de la vida de una plantación infectada y la de las plantaciones siguientes (Baumgartner, 2004).

## **2.9 Uso de herramientas biotecnológicas en la caracterización del género *Armillaria***

Desde principios de 1990, la secuenciación del ADN se ha convertido en una herramienta para la identificación a nivel de especies las recolectas de *Armillaria*, frecuentemente se realiza con fragmentos de micelio en abanico, rhizomorfos y madera podrida (y no esporóforos). Los análisis filogenéticos de IGS-I, ITS y el factor de elongación de genes nucleares 1-a (EF-1a) apoyan la existencia de las especies biológicas y morfológicas descritas dentro del género *Armillaria* (Maphosa *et al*, 2006; Coetzee *et al*, 2001 Anderson y Stasovski, 1992). Como resultado, se han encontrado especies taxonómicas distintas, que no es posible determinar morfológicamente debido a la ausencia de basidiocarpos, y para lo cual, las pruebas de acoplamiento no se pueden realizar como consecuencia de la falta de cepas de apareamiento no disponibles (Coetzee *et al*, 2005; Coetzee *et al.*, 2003; Mwenje *et al*, 2003), estudios recientes basados en el análisis de ADN han ayudado a equiparar linajes al usar características morfológicas de los esporóforos (Pildain *et al.*, 2010; Pildain *et al*, 2009).

### **2.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa**

La “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) fue descrita en 1972 y 1974 por el grupo de Khorana aunque pasó sorpresivamente desapercibida durante años. Su reinención en 1983 por Kary B. Mullis ha representado una de las mayores revoluciones en las ciencias de la vida. Finalmente, la técnica fue automatizada y popularizada en 1988 mediante el empleo de ADN polimerasa termoestable (Caballero *et al.*, 2001). La PCR se basa en la amplificación selectiva y exponencial de una región del ADN molde. Esta reacción es catalizada por una enzima ADN polimerasa termoestable, en presencia de dos oligonucleótidos (18-30 nucleótidos) denominados iniciadores o primers diseñados para que se unan a los extremos de la región a amplificar. Los iniciadores hibridan con el ADN desnaturalizado en dos zonas del mismo, esto crea dos fragmentos de ADN de doble cadena que ceban al ADN polimerasa y delimitan la región que se amplifica. De esta manera la ADN polimerasa duplica un fragmento de ADN, y al repetir el ciclo varias veces se consigue una multiplicación exponencial del fragmento, que permite obtener una cantidad de ADN visualizable a partir de una sola molécula del mismo (Ward, 1994).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudio

Las muestras de raíces, tallo y corona de árboles de aguacate infectados se recolectaron en municipios pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, localizada en la provincia fisiográfica del sistema volcánico transversal entre los paralelos 18° 45' y 20° 6' Latitud Norte y los meridianos 101° 47' y 103° 13' de Longitud Oeste (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características de los sitios de recolecta para el aislamiento de cepas de *Armillaria* spp.

Comunidad	Municipio	Altitud	Precipitación	Coordenadas
San Francisco Corupo	Uruapan	2605	1700	N19°36.914' W102°16.094'
San Juan Nuevo Parangauricutiro	Nuevo Parangaricutiro	2176	1300	N19°36.829' W102°15.960'
Santa Ana Sirosto	Uruapan	2505	1600	N19°32' W102°19'
Huirambosta	Uruapan	2216	1400	N19°31.593' W102°16.809'
Charapan	Charapan	2360	1200	N19°39' W102°15'

#### 3.2 Ubicación del área experimental

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán y en campo.

#### 3.3 Síntomas observados en campo

Los árboles de aguacate infectados por *Armillaria* presentan los siguientes síntomas; amarillamiento foliar, hojas pequeñas, defoliación apical. En el tronco se observa una grieta en forma vertical, manchas de color oscuro a cada lado de la grieta y en etapas más avanzadas exudados de color café oscuro y micelio en las grietas; pocas raíces, solo se

encuentran las más gruesas y no las alimenticias, cubiertas por abundante micelio de color blanco; el cual presenta crecimiento algodonoso en las partes afectadas, crece en forma de abanico, con rizomorfos al inicio de color café, a medida que envejecen se tornan de un color negro (Figura 1). También se observaron esporóforos adheridos a los troncos de los árboles de aguacate, o en área de goteo del cajete, cabe mencionar que cuando se les ocasionan heridas en los troncos de los árboles infectados, en estas crecen los esporóforos de manera abundante.



**Figura 1.** Aspecto que presentan los árboles de aguacate muestreados afectados por la pudrición blanca. A) Árbol muerto, B) hojas adheridas al árbol con un característico color café cobrizo, C) micelio y rizomorfos sobre la corteza.

Se realizaron 15 muestreos en cinco comunidades de tres municipios en el estado de Michoacán, en cada sitio se tomaron las lecturas de localización y altura con ayuda de un GPS Garmin Oregon 450. Las características agroecológicas se muestran en el Cuadro 1.

De cada sitio de muestreo se recolectaron muestras de raíz, tallo y corona de árboles con síntomas iniciales de amarillamiento, grieta en el tallo y signos del fitopatógeno (micelio, rizomorfos y esporóforos) con ayuda de herramienta previamente desinfectada entre cada toma, estas se depositaron en bolsas resellables, se etiquetaron de acuerdo al orden de recolecta; en caso de raíces se recolecto junto con una muestra del sustrato de donde se extrajo para evitar la pérdida de humedad de la raíz (Figura 2). Las muestras se

mantuvieron en refrigeración hasta ser procesadas en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.



**Figura 2.** Forma de tomar la muestra para transportar al laboratorio y estructuras que presenta el fitopatógeno. A) Toma de la muestra. B), micelio en forma de abanico sobre el tallo de aguacate.

### 3.4 Elaboración de medios de cultivo

Se prepararon volúmenes de 500 mL<sup>-1</sup> medios nutritivos PDA y PDA con zanahoria. Los medios se esterilizaron en una autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 20 minutos. Una vez que alcanzó la temperatura adecuada para su manejo, se vaciaron en cajas Petri Klinikus® de 100 x 15 mm y 60 x 15 mm en una campana de flujo laminar y se expusieron a luz UV hasta que solidificaron. Una vez solidificado, se guardaron en bolsas de plástico y se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

**Medio de cultivo PDAZ** Este medio de cultivo fue una adecuación a partir del PDA debido a que no se había reportada para el aislamiento y aumentar la tasa de crecimiento de *Armillaria* spp., para lo cual se colocaron 125 g de cuadritos de papas y 125 g de cuadritos de zanahoria frescas en 500 mL<sup>-1</sup> de agua destilada y se pusieron a hervir hasta que las papas y zanahorias estuvieron suaves al tacto. La infusión obtenida se filtró a través de una gasa, el volumen final se aforo a 500 mL<sup>-1</sup> y se agregaron 10 g de dextrosa y 8 g de agar.

### 3.5 Obtención de aislamientos de *Armillaria* spp.

Los aislamientos se hicieron de las raíces, tallos y corona recolectados en campo de acuerdo a los protocolos descritos por Trigiano *et al.* (2004), Agrios (2005), la técnica incluyó lavado y desinfección de los fragmentos de raíz y madera, se colocaron cinco trozos de 0.5 cm de material vegetal de forma equidistante en una caja Petri con medio de cultivo PDA.

### **3.5.1 Purificación de cepas**

Una vez crecido el fitopatógeno, se tomaron puntas de hifa y rizomorfos con ayuda de un bisturí previamente esterilizado y un estereoscópico, se transfirió a otra caja Petri con medio de cultivo PDA, para tener únicamente al fitopatógeno de interés, y posteriormente llevar a cabo la caracterización morfológica en los medios nutritivos antes citados.

### **3.6 Caracterización molecular**

Los aislados de *Armillaria* spp., se caracterizarán con ayuda del primer: ITS.

#### **3.6.1 Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de ADN se realizó a partir de rizomorfos del hongo crecidos durante 10 días, mediante el protocolo de Lee *et al.*, (1991) y Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 3 % (Ahrens y Seemueller, 1992) modificado por Cazares *et. al.*, (2010), el cual consistió en Pulverizar 100 mg de tejido en 1 ml de solución de extracción 2 ME/CTAB precalentado a 65° C, se mezcló con vortex o inversión, se incubó a 65°C por 45 minutos, cada 10 minutos se agitaron los tubos (antes de incubar se puede agregar proteinasa K), se agregaron 500  $\mu\text{L}^{-1}$  de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se agitó fuertemente por inversión; se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen igual de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se agitó fuertemente por inversión; se centrifugó a 12,000 rpm/10 min, se recuperó la fase acuosa y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol frío. Se dejó toda la noche a -20°C, se centrifugó a 12,000 rpm/20 min, se decantó y se lavó la pastilla con etanol al 70 %. Se centrifugó a 12,000 rpm/15 min.

El pellet se resuspendió en agua ultra pura y se almacenó a -20 °C. La calidad se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio a 80 volts durante 30 minutos y se observó en un foto-documentador ultravioleta MiniBis Pro®.

#### **3.6.2 Cuantificación y análisis de calidad del ADN**

La concentración y la pureza del ADN extraído se midió en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop, se colocó 1  $\mu\text{L}^{-1}$  de muestra y se evaluó mediante las lecturas de, 260 y 280 en un espectrofotómetro ultravioleta SmartSpec de BioRad® al cual se añadió como aditamento una celda tipo TrayCell de Hellma-Analytics®.

### **3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la amplificación de secuencias de ADN se utilizó una mezcla de reacción de PCR compuesta por 12 µL Buffer 10X, 5 µL de dNTPs, 1 µL del primer forward, 1 µL primer reverse, 19.5 µL de dH<sub>2</sub>O, 6 de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5 µL de Taq polimerasa y 5 µL del ADN extraído (100 ng/µL). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti® de Life Technologies® bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 94 °C por 2.5 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación a 55 °C por 40 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos; la extensión final se llevó a cabo a 72 °C durante 10 minutos. Las muestras de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % TBEX a 150 volts por 30 minutos con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

### **3.6.4 Secuenciación**

El producto de PCR se envió al laboratorio de Macrogen Inc. En Seúl, Corea, para su purificación y secuenciación.

Las secuencias obtenidas de los aislamientos serán comparadas en homología con secuencias de bases de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante el software BLAST, para posteriormente ser editadas y alineadas con el programa Bioedit versión 7.0.5.2 (Hall, 1999).

### **3.7 Caracterización macro y microscópica de esporóforos**

En época de lluvias (junio-agosto), se recolectaron esporóforos del hongo, en los mismos sitios donde se recolectaron las muestras de raíz, tallo y corona. Una vez que se recolectaron se etiquetaron, con los datos de localización y altura con ayuda de un GPS Garmin Oregon 450 y se llevaron al laboratorio para su posterior procesamiento.

Para la caracterización macroscópica en estado fresco se tomaron en cuenta los caracteres morfológicos que menciona Delgado *et al.* (2005); tamaño, grado de humedad, color, forma del píleo, forma del estípote, margen, forma y frecuencia de laminillas, tipo de bulbo, tipo de velo; además Delgado *et al.* (2005); mencionan que el hábito y hábitat donde crece el hongo son datos tan útiles como las características morfológicas. También se utilizaron las claves sinópticas Largent *et al.* (1973); Delgado *et al.* (2005).

Para la descripción microscópica se hicieron cortes y se observaron al microscopio compuesto Nikon Eclipse Ni, se usaron las claves sinópticas de Largent *et al.* (1973), Moreno *et al.* (1986) y tablas descriptivas, Valenzuela (2016), se registraron los caracteres siguientes; tipo de trama, tamaño y tipo de hifas, contexto, tamaño de esporas, forma, ornamentación, color, tipo de basidios, tamaño, forma, color y número de esterigmas, caracteres de género y especie.

### **3.8 Pruebas de patogénica**

En el invernadero de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” se desarrollaron las pruebas de patogenicidad con la inoculación de las plántulas de aguacate *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*, con cada una de las 11 cepas de *Armillaria* spp.

#### **3.8.1 Preparación del sustrato**

En bolsas de plástico limpias y desinfectadas con cloro se depositó una mezcla de sustrato, (suelo andosol y materia orgánica) en una proporción 2:1, esterilizado durante una hora a 121 °C, para garantizar la inocuidad y evitar la incorporación de patógenos que se pudieran encontrar en ambos sustratos.

#### **3.8.2 Preparación del material vegetativo**

Se recolectaron frutos maduros de 4-12 cm de largo, ovoides, con el exocarpo delgado de color oscuro, pulpa de color verde, de un solo árbol de aguacate criollo de la raza mexicana con buenas características en cuanto a porte y vigor, así como de la sanidad de la misma. Los frutos fueron recolectados directamente del árbol, se evitaron aquellos que estaban en contacto con el suelo. Al fruto se le retiró la pulpa y el endocarpio, una vez limpia la semilla se seleccionaron aquellas con un tamaño uniforme de 6-8 cm, con buena sanidad (sin plagas ni enfermedades) y sin daños mecánicos. Las semillas se sumergieron en agua a 50 °C durante 30 minutos, para eliminar posibles infecciones de microorganismos y mantener su viabilidad (Lara, 2008; Ohr *et al.*, 1991). Finalmente, las semillas se sumergieron en agua estéril fría para disminuir su temperatura y se sembraron inmediatamente en el sustrato estéril.

#### **3.8.3 Preparación del inoculo**

Por cada cepa de *Armillaria* spp., se inocularon cinco plantas de aguacate de seis meses de edad. La técnica de inoculación fue la descrita por la de Lara (2008), se colocó el

contenido de cinco cajas Petri con 15 días de crecimiento del hongo en el medio PDAZ en 500 mL<sup>-1</sup>, el cual fue fraccionado mediante agitación forzada y de este se tomaron alícuotas de 100 mL<sup>-1</sup>, las cuales se le aplicaron a cada una de las plantas.

### **3.9 Variables respuesta**

Las variables evaluadas para determinar la patogenicidad de las cepas de *Armillaria* spp., fueron la virulencia de las cepas y el grado de severidad de la enfermedad. La virulencia fue determinada con base al tiempo transcurrido desde inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas en la planta. Para determinar la severidad de la enfermedad se tomó en cuenta la escala descrita por Lara (2008) con cuatro grados, las cuales representaban (a) planta sana, (b) amarillamiento, (c) marchitez apical y (d) necrosis apical.

### **3.10 Análisis de la información**

De las cepas de *Armillaria* spp., las características morfológicas que se evaluaron fueron; tipo y espesor del micelio, coloración, rizomorfos, pigmentación del medio de cultivo y tasa de crecimiento, se analizó de manera cualitativa. Los datos de virulencia de las cepas se sometieron análisis de varianza y comparación de medias Tukey ( $\alpha=0.05$ ), el diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Finalmente la severidad de la enfermedad se determinó con base a la escala de Lara (2008)

## IV.RESULTADOS

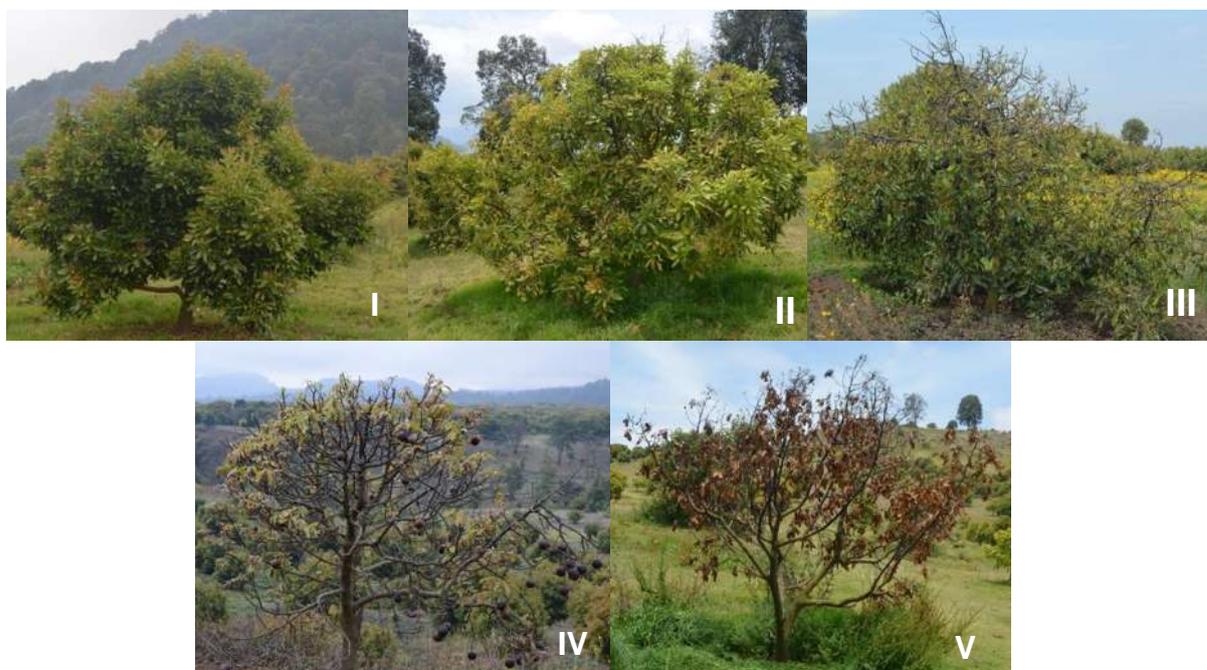
Este estudio de identificación genética y patogénica de especies de *Armillaria* (Vahl.: Fr.) Karsten asociadas a *Persea americana* Miller variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake, se tuvo variación en sus resultados, de acuerdo a la hipótesis y objetivos planteados, a continuación, se explica y detalla cada uno de ellos

### 4.1 Escalas de severidad

Con los síntomas observados en campo se elaboraron dos escalas de severidad de la enfermedad; la primera del follaje y la segunda con los síntomas que aparecieron en el tronco del árbol.

En follaje se hizo una escala diagramática de daño con los siguientes grados: Grado 1. Planta sana. Grado 2. Defoliación apical, Grado 3. Amarillamiento y sobre producción de fruta, Grado 4. Muerte regresiva y Grado 5. Árbol muerto, Figura3.

De igual manera para el tronco se elaboró una escala diagramática de acuerdo a como se fueron presentando los síntomas en campo: Grado 1. Sano, Grado 2. Mancha oscura, Grado 3. Agrietamiento y presencia de micelio, Grado 4. Exudados color café oscuro y Grado 5. Grietas profundas y muerte, Figura 4. Es importante señalar que no hay achaparramiento de los árboles afectados, como menciona agrios (2005), el árbol muere en la etapa de desarrollo que son infectados por el fitopatógeno. En las etapas consecutivas se observa follaje pequeño, se detiene la defoliación y las hojas se tornan de un color café cobrizo brillante, quedan tanto inflorescencias, hojas y frutas adheridas al árbol hasta su muerte, no se observó defoliación prematura como reporta Baumgartner (2011) Baumgartner y Rizzo, (2002), Figura 3.



**Figura 3.** Escala de severidad de síntomas foliares por pudrición de raíz de aguacate producido por *Armillaria* spp. Árbol sano (I), Defoliación inicial de puntas (II); Amarillamiento y sobreproducción de fruta (III); muerte regresiva (IV); árbol muerto (V).

Los síntomas en troncos, iniciaron con una mancha café, conforme avanza la enfermedad con una grieta vertical, manchas de color oscuro a cada lado de la grieta, posteriormente micelio de color blanco en forma de abanico, en etapas más avanzadas exudados de color oscuro, en la última etapa se presentan varias grietas en el tallo, hasta que el árbol muere; Figura 4, estos síntomas coinciden con lo reportado por Durai (2013), quien reporta una resinosis en arboles forestales, además menciona que la enfermedad se extiende por el contacto directo de las raíces de árboles enfermos con árboles sanos, encontró un 60 % de mortalidad, además en época de lluvias observo esporóforos en los troncos de los árboles muertos y no en árboles sanos; mismos reportes fueron hechos por Baumgartner (2011) Baumgartner y Rizzo, (2002).



**Figura 4.** Escala de síntomas y signos del avance del fitopatógeno en tronco: Sano (I), Inicio de síntoma mancha oscura (II); Agrietamiento y presencia de micelio (III); Exudado café oscuro (IV); grietas profundas y muerte (V).

Los esporóforos recolectados en los árboles con síntomas de pudrición blanca, se determinaron las fechas de aparición, que fueron a principios de junio y finalizan a mediados del mes de agosto, Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Determinación de las fechas en las que emergieron los esporóforos.

Sitio de recolección	Municipio	Fecha de aparición	Fecha de última observación
San Francisco Corupo	Uruapan	29/junio/2016	30/agosto/2016
San Juan Nuevo Parangaricutiro	Nuevo Parangaricutiro	27/junio/2016	12/agosto/2016
Santa Ana Sirosto	Uruapan	22/junio/2016	30/agosto/2016
Huirambosta	Uruapan	04/julio/2016	20/agosto/2016
Charapan	Charapan	20/junio/2016	25/agosto/2016

## 4.2 Aislamiento y purificación de *Armillaria* spp.

De los 15 muestreos realizados se obtuvieron un total de 11 cepas con características similares para el género *Armillaria*, siete del municipio de Uruapan de las siguientes comunidades: tres de San Francisco Corupo, dos de Santa Ana Zirosto y dos de Huirambosta; Una del municipio de Nuevo Parangaricutiro y tres de Charapan, a las cuales se les asignó la siguiente clave de cepario de acuerdo a la zona donde fueron recolectadas SFC1, 2,3; SAZ1, 2; HTA1, 2, SJN1 y CHA 1, 2, 3, Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Características y ubicación de los sitios de colecta.

cepa	Sitios de colecta	Municipio	Altitud(m)	Precipitación(mm)	Coordenadas
SFC1	San Francisco Corupo	Uruapan	2605	1700	N19°36.914' W102°16.094'
SFC2	San Francisco Corupo	Uruapan	2605	1700	N19°36.914' W102°16.094'
SFC3	San Francisco Corupo	Uruapan	2583	1700	N19°36.911' W102°16.040'
SAZ1	Santa Ana Sirosto	Uruapan	2505	1600	N19°32' W102°19'
SAZ2	Santa Ana Sirosto	Uruapan	2505	1600	N19°32' W102°19'
SJN	San Juan Nuevo Parangaricutiro	Nuevo Parangaricutiro	2176	1300	N19°36.829' W102°15.960'
HTA1	Huirambosta	Uruapan	2216	1400	N19°31.593' W102°16.809'
HTA2	Huirambosta	Uruapan	2208	1400	N19°31.677' W102°16.940'
CHA1	Charapan	Charapan	2360	1200	N19°39' W102°15'
CHA2	Charapan	Charapan	2360	1200	N19°39' W102°15'
CHA3	Charapan	Charapan	2360	1200	N19°39' W102°15'

## 4.3 Caracterización morfológica de cepas

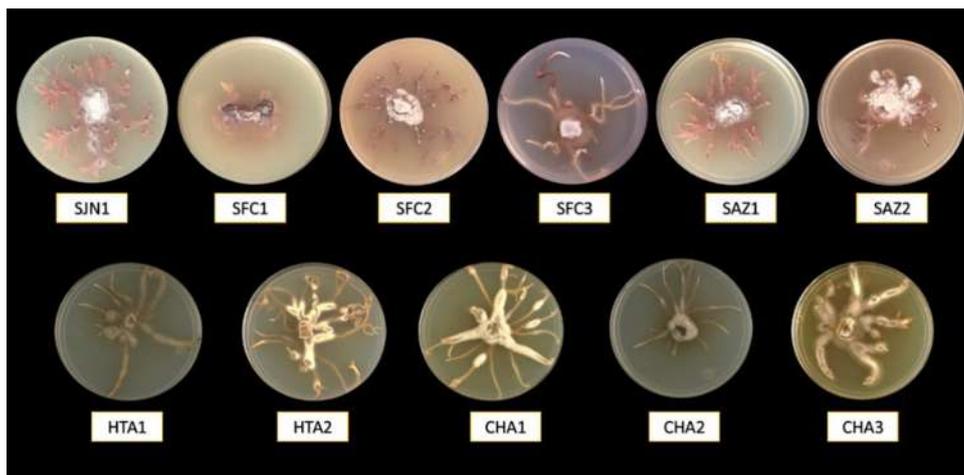
Las 11 cepas de *Armillaria* spp., presentaron características morfológicas contrastantes, en cuanto a la forma y crecimiento de los rizomorfos, color del medio de cultivo, textura del micelio y tasa de crecimiento.

### 4.3.1 Forma de la colonia y textura del micelio

Las 11 cepas obtenidas, en su crecimiento se observaron rizomorfos de color crema al inicio, a medida que envejecen se oscurecen hasta tener un color negro; presentaron poco micelio, principalmente alrededor de los rizomorfos, de color, blanco crema al inicio, después se torna de color café oscuro y forma una costra de color negro; Watling *et al.* (1982) y Baumgartner *et al.* (2011) reportan que las cepas de *Armillaria* spp crecidas en medio de cultivo se puede distinguir de otros basidiomicetos por la ausencia de estructuras reproductivas y la presencia de rizomorfos. Se diferenciaron dos tipos de crecimiento en los rizomorfos; crecimiento dicotómico en las cepas, SFC1, SFC2, SFC3, SJN1, HTA2, CHA3 Y SAZ1, en el resto de las cepas el crecimiento fue simple. Las 11 cepas colorearon el medio de cultivo café claro y conforme avanza el crecimiento cambio a café oscuro (Figura 5).

### 4.3.2 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento de las cepas osciló entre 2.3 y 3.5 mm/día. Esta característica es comúnmente utilizada como un carácter de identificación secundario. Leslie y Summerell, (2006) mencionan que esta variable puede ser influenciada por una gran variedad de condiciones como la luz, la posición de la caja Petri, la cantidad de medio de cultivo, etc., por lo que los resultados de esta prueba no necesariamente son contundentes para la identificación a nivel de especie.



**Figura 5.** Cepas de *Armillaria* en medio de cultivo PDAZ, aisladas de raíz, tallo y corona de árboles de aguacate.

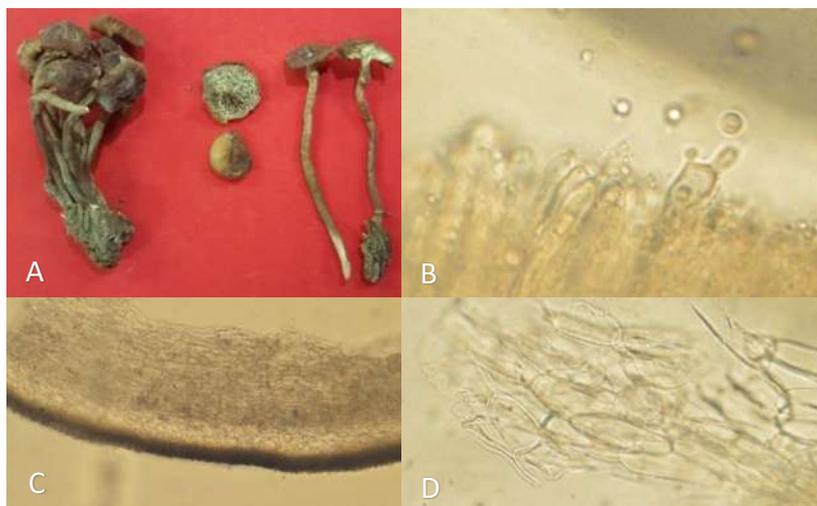
#### 4.4 Caracterización morfológica de esporóforos

De los esporóforos recolectados en los distintos sitios solo en una muestra se observaron características macro y microscópicas similares a las descritas para los esporóforos de *Armillaria*.

##### 4.4.1 La leña San Juan Nuevo

Píleo de 20-40 mm de diámetro, crecimiento cespitoso, plano-convexo, de color café oscuro, liso. Láminas subadheridas, de color crema, con tonos café claro en algunos ejemplares, café oscuro cuando secas, juntas, de 2-4 mm de ancho, con borde liso. Estípite de 50-90 x 4-8 mm, de color café claro a crema, base amarillo claro a crema, con una zona más clara en la unión de las láminas, húmedo, liso a ligeramente fibriloso, adelgazando hacia el ápice, sólido, con consistencia carnosas fibrosa. Contexto blanquecino, con olor y sabor fungoide (Figura 6) (Delgado *et al.*, 2005).

Esporas de 6.7-10.5 x 6-7.5  $\mu\text{m}$ , hialinas en KOH, inamiloides, lisas, de pared delgada, elipsoides. Basidios de 30-73 x 5.2-8.5  $\mu\text{m}$ , hialinos en KOH, tetraesporados, de pared delgada, claviformes, con esterigmas de 4.8-6.4  $\mu\text{m}$  de largo. Cistidios himeniales ausentes. Trama himenoforal subparalelo, con hifas hialinas en KOH, de pared delgada, de 5-14  $\mu\text{m}$  de diámetro. Trama subparalelo, hialinas en KOH, con pared delgada, de 3.2-20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Epicutis del píleo de 190-230  $\mu\text{m}$  de grosor, de hifas semierectas a erectas, entrelazadas laxamente, de hialinas, amarillentas a de color café amarillento en KOH, de pared delgada, de 2.4-4.8  $\mu\text{m}$  de diámetro (Moreno *et al.* 1986; Largent *et al.* 1973) (Figura 6).



**Figura 6.** Estructuras macro y microscópicas de esporóforos. San Juan Nuevo. A) Esporóforos, B) basidios y esporas, C) trama, D) hifas.

Estas características coinciden con la especie *Armillaria ostoyae* reportada por Bbrubb, y Bessureault, (1988), y Cha *et al.* (1992).

#### 4.5 Pruebas de patogenicidad en plántulas de aguacate

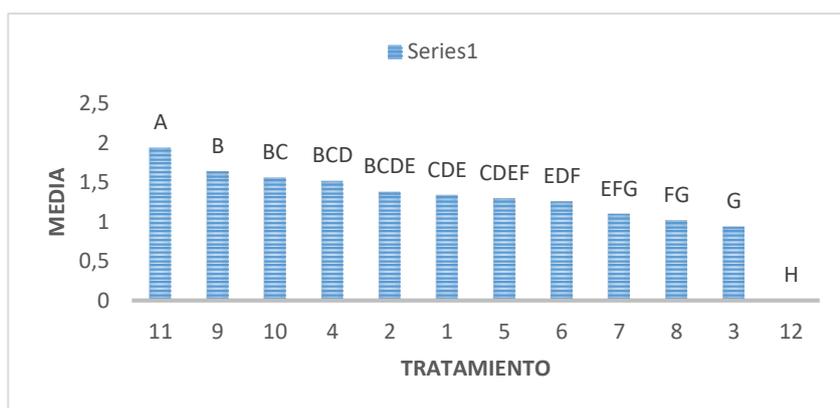
Los primeros síntomas en las plántulas de aguacate se presentaron a los 30 días posteriores a la inoculación; fueron: amarillamiento y una defoliación inicial apical; a los 50 días defoliación apical casi completa; a los 75 días muerte apical y a los 95 días muerte completa de la planta Figura 7. Todas las cepas presentaron variación en virulencia y severidad de la enfermedad, pero en todos los casos mataron a las plántulas de aguacate inoculadas. Estos síntomas coinciden con lo reportado por Piercey-Normore y Bérubé (2000), quienes reportan síntomas de clorosis, además de muerte en plantas de coníferas (*Picea mariana* Mill., *Abies balsamea* L. Mill.). Rishbeth (1982) reportó un 12 % de plántulas de pino muertas después de la inoculación con *A. ostoyae*. Singh (1980) inoculó semilleros de picea negra de 2 a 4 años bajo condiciones de invernadero con *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer, produjeron 21 % de infección. Singh (1980) describió cuatro etapas de desarrollo de la enfermedad que van desde la luz (clorosis del árbol huésped) hasta muy grave (árbol huésped muerto).



**Figura 7.** Síntomas aéreos en plántulas inoculadas con las distintas cepas. (A) Planta sana; (B) amarillamiento y defoliación inicial apical; (C) defoliación casi completa; (D) poco follaje con muerte apical y (E) planta muerta.

#### 4.5.1 Virulencia de *Armillaria* spp.

El análisis de varianza realizado para los datos obtenidos de virulencia de las 11 cepas de *Armillaria* spp., recolectadas en los municipios de Corupo, Santa Ana Zirosto, San Juan Nuevo Huirambosta y Charapan pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán; se detectó diferencia altamente significativa ( $P > 0.0001$ ) para esta variable. Las cepas con mayor virulencia fueron las aisladas en el municipio de Charapan (CHA1, CHA2 Y CHA3). En contraste con las cepas aisladas en los municipios de Corupo (SFC3) y Huirambosta (HTA1 y HTA2) que necesitaron mayor tiempo para producir el síntoma en las plántulas de aguacate, Figura 8. Lara (2008) reportó resultados similares en plántulas de aguacate inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*, se presentaron diferentes grados de severidad y formaron diferentes grupos estadísticos. Olalde (2015) reportó diferencia altamente significativa de virulencia; en plántulas de aguacate inoculadas con diferentes especies de *Fusarium*.



**Figura 8.** Comparación de medias (Tuke  $\alpha=0.05$  %) para virulencia de 11 cepas de *Armillaria* spp. Inoculadas en plántulas de aguacate.

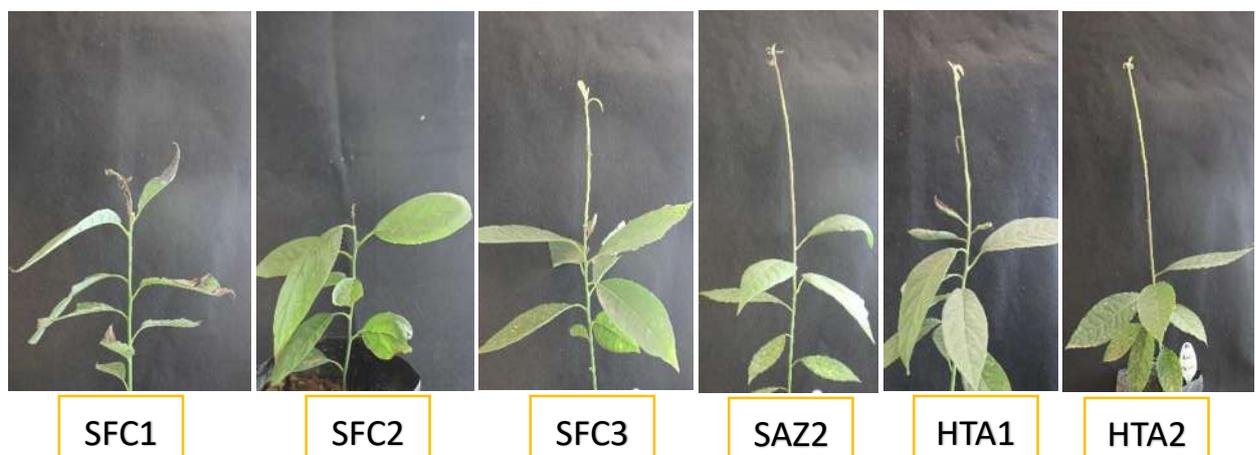
#### 4.5.2 Severidad de *Armillaria* spp.

La severidad de la enfermedad determinada en plántulas de aguacate, inoculadas con cada una de las 11 cepas de *Armillaria* spp, tuvo variación, las cepas colectadas en los municipios: Charapan (CHA1, CHA2 Y CHA3) y Santana Zirosto (SAZ1); presentaron una alta capacidad para producir la muerte de las plántulas a los 77 días posteriores a la inoculación, (grado 4, escala de Lara, 2008), Figura 9. El resto de las cepas se consideraron con una severidad intermedia, en el mismo lapso de tiempo (77 días), los síntomas que produjeron fueron marchitamiento y muerte apical (grado 3, escala de Lara, 2008), Figura 10. Estos resultados coinciden con los reportados; Watling *et al.* (1991), Tsopelas y Tjamos, (1997); Cha *et al.* (2009). Rishbeth (1982) Singh (1980), reportan

diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad ocasionada por diferentes especies de *Armillaria*. Pero difieren de lo reportado por Piercey-Normore (2000), al inocular dos cepas de *Armillaria ostoyae* en *Abies balsamea*, observaron síntomas hasta los dos años de haber sido inoculadas las plantas, pero solamente hubo defoliación y 4 % de infección radicular, por lo que sugieren que es necesario hacer evaluaciones por más tiempo y estresar las plantas de acuerdo a las condiciones de su hábitat natural. Kamp (1993) evaluó *in situ* árboles de abetos de 110 años infectados con *Armillaria ostoyae*, el tiempo promedio desde la aparición de los síntomas (resinosis basal) hasta la muerte de los árboles fue de seis años, siendo más severo en árboles pequeños muriendo más rápido.



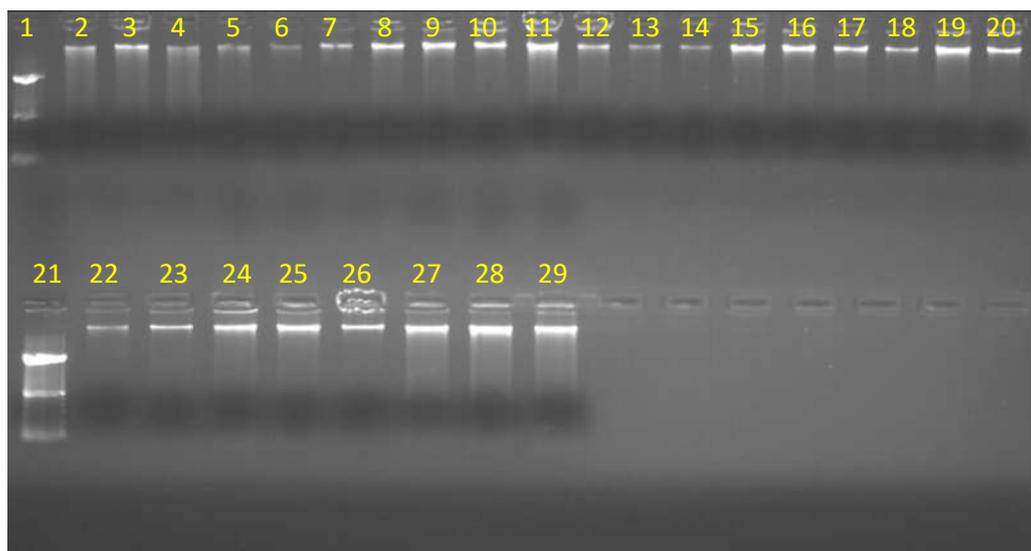
**Figura 9.** Imagen que muestra el grado 4 en la escala de Lara 2008 (muerte) en plántulas de aguacate inoculadas con *Armillaria* spp.



**Figura 10.** Imagen que muestra el grado 3 en la escala de Lara 2008 (marchitamiento y muerte apical) en plántulas de aguacate inoculadas con *Armillaria* spp.

#### 4.6 Extracción de ADN

Los resultados de la extracción de ADN de las cepas y de los esporóforos fueron positivas, se observan bandas bien marcadas en el gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio, Figura 11. El ADN tuvo una concentración que osciló entre los 253 y 2300 ng/μL; mientras que la relación de absorbancia 260/280 nm fue de 1.73-1.98, lo cual coincide con lo publicado por Wilfinger *et al.* (2009) quienes mencionan que una muestra de ADN con valor de 1.80 es aceptada como pura; estos resultados coinciden con lo reportado por Olalde (2015), el cual extrajo ADN de *Fusarium* spp., obtuvo calidad entre 1.72 y 1.95. Gonthier *et al.* (2014), extrajeron ADN de *Armillaria* spp., *Echinodontium* spp., *Fomitopsis pinicola*, *Fuscoporia toluosa*, *Heterobasidion annosum sensulato*, *Onnia* spp., *Phaseolus schweinitzii*, *Phellinus weiri* s. l., *Pholiota* spp., y *Porodaedalea* spp., con el protocolo de CTAB, con resultados aceptables para realizar la PCR.



**Figura 11.** Visualización de ADN en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de Etidio. Carril 1 y 21 marcador de peso molecular; carril 2 a 20 y 22 a 24; ADN de las cepas; carril 25 a 29 ADN de los esporóforos.

#### 4.7 Estandarización del protocolo de amplificación

El primer paso, fue estandarizar los protocolos para poder determinar las cantidades y concentraciones de las mezclas maestras, así como las diferentes temperaturas de alineamiento en el área ITS (Prodorutti *et al.* 2009; Sicoli *et al.* 2003). Concentración, cantidad y temperaturas.

#### 4.7.1 Amplificación ITS

Para la amplificación del ITS se usaron 45  $\mu\text{L}$  de Mezcla Maestra (PCR super Mix, Invitrogen/Thermo Scientific), 3  $\mu\text{L}$  de Iniciador Forward (200ng/  $\mu\text{L}$ ) ITS 1, 2.5  $\mu\text{L}$  de Iniciador Reverse (200ng/  $\mu\text{L}$ ) ITS, más 1  $\mu\text{L}$  de DNA blanco (200ng/  $\mu\text{L}$ ).

Las condiciones de amplificación de PCR fueron las siguientes: 94 °C 150 segundos, 94 °C 30 segundos, 60 °C 40 segundos, 72 °C 30 segundos por 35 ciclos. 72 °C 5 minutos extensión final. (White *et al.* 1990; Dodd *et al.* 2000; Smith-White *et al.* 2002).

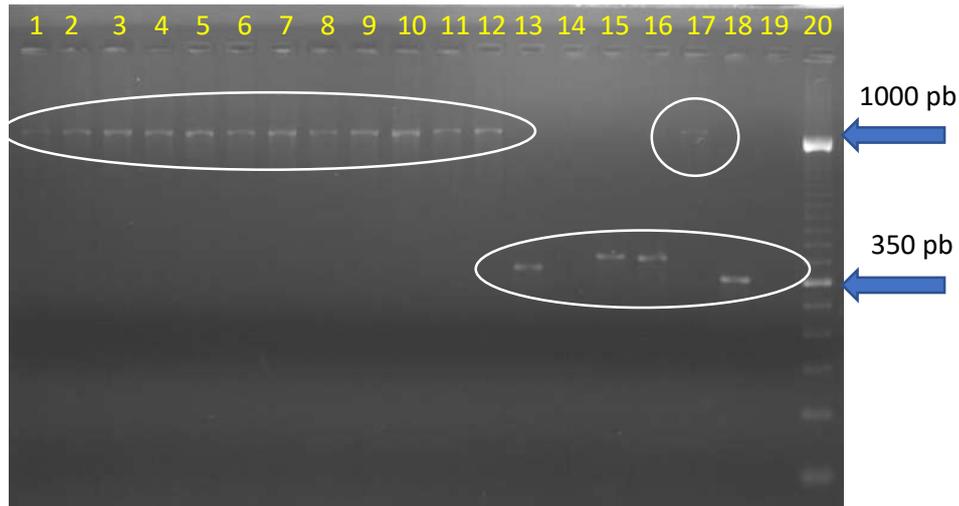
#### 4.7.2 PCR en gradiente

Se tomó una muestra de ADN de buena calidad y concentración, con las cantidades antes mencionadas, pero con cinco diferentes temperaturas de alineamiento, y seis diferentes ciclos, Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Reacción de PCR en gradiente con 12 temperaturas diferentes

Ciclos	Temp 1	Temp 2	Temp 3	Temp 4	Temp 5
33	53	55	57	59	61
35	53	55	57	59	61
37	53	55	57	59	61
39	53	55	57	59	61
41	53	55	57	59	61
43	53	55	57	59	61

De las 36 reacciones de PCR en gradiente con cinco diferentes temperaturas y seis diferentes ciclos, se determinó que la mejor temperatura de alineamiento fue de 55 °C y 35 ciclos. Con estos resultados, se procedió a procesar las muestras para su amplificación Figura 12.



**Figura 12.** Visualización de PCR en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de Etidio. Carril 1 a 12 cepas; carril 13 a 17 esporóforos; carril 18 control positivo, carril 19 control negativo y carril 20 marcador de peso molecular.

La PCR con los el primer ITS proporcionó *bandas* de un tamaño alrededor de 1000 pb en la amplificación de las 11 cepas y un esporóforo, los demás esporóforos tuvieron una amplificación entre 350 y 450 pb, Figura 13. El tamaño de los fragmentos no concuerda con lo reportado por Dodd *et al* (2010), ellos reportan fragmentos de 650 pb en *Armillaria novae-zelandiae* ni con lo reportado por Mansilla *et al.*, (2000), reportaron fragmentos de 800 pb para *Armillaria gallica*.

#### 4.8 Comparación de secuencias en BLAST

Las secuencias de los aislamientos obtenidas del laboratorio de Macrogen Inc. En Seúl, Corea, se observó su pureza en un electroferograma con ayuda del programa CROMAS versión 2.6.2, posteriormente fueron editadas en el programa BioEdit Sequence Alignment y el programa CLC Sequence Viewer 7.6 y se compararon en homología con secuencias de bases de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante el software BLAST, Figura 13; las secuencias de SFC1, SFC2, SFC3, SAZ1, SAZ2, HTA2 y CHA1 presentaron entre 83 y 89 % de identidad para *Armillaria ostoyae*; las secuencias de SJN y HTA1 presentaron 82 % de identidad con *Armillaria gallica*, las secuencias de CHA2, CHA3 y presentaron 86 % de identidad para *Armillaria mellea* y *Armillaria ostoyae* respectivamente; los resultados obtenidos muestran que se trata de tres especies diferentes de *Armillaria*.

quences producing significant alignments:

ect: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Armillaria</i> sp. RDER-2012 isolate MEX60 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal	1177	1492	95%	0.0	100%	KC111009.1
<i>Armillaria</i> sp. RDER-2012 isolate MEX57 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal	1171	1486	95%	0.0	99%	JX261814.1
<i>Armillaria</i> sp. JWH-2016 isolate MEX85 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete	1158	1439	100%	0.0	98%	KR051308.1
<i>Armillaria</i> sp. JWH-2016 isolate MEX88 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete	1155	1439	100%	0.0	98%	KR051312.1
<i>Armillaria</i> sp. JWH-2016 isolate MEX86 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete	1155	1439	100%	0.0	98%	KR051311.1
<i>Armillaria</i> sp. JWH-2016 isolate MEX87 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal tra	1155	1439	100%	0.0	98%	KR051310.1
<i>Armillaria</i> sp. RDER-2012 isolate MEX47 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal	1105	1389	95%	0.0	98%	KC111008.1
<i>Armillaria</i> sp. RDER-2012 isolate MEX40 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal	1103	1387	95%	0.0	98%	KC111007.1
<i>Armillaria</i> sp. RDER-2012 isolate MEX43 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal	1103	1387	95%	0.0	98%	JX261813.1
<i>Armillaria</i> sp. RDER-2012 isolate MEX45 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal	1103	1387	95%	0.0	98%	JX261812.1
<i>Armillaria ostoyae</i> isolate R1237-B Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence	505	572	69%	8e-139	89%	AY096719.1
<i>Armillaria ostoyae</i> isolate OR22-B Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence	503	571	69%	3e-138	89%	AY096720.1
<i>Armillaria ostoyae</i> isolate 9 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and Internal transcribed spacer 2,	501	569	69%	1e-137	89%	JX174687.1
<i>Armillaria ostoyae</i> voucher JB 13.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcri	501	569	69%	1e-137	89%	FJ654606.1
<i>Armillaria ostoyae</i> Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence	497	565	69%	1e-136	89%	DQ011905.1

Figura 13. Comparación de una secuencia de ADN en homología con secuencias de base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante el software BLAST

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y bajo las condiciones en las que se llevó a cabo la presente investigación, se concluye lo siguiente:

De los 15 muestreos realizados en tres municipios pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán se obtuvieron 11 cepas pertenecientes al género *Armillaria*.

Todas las cepas presentaron rizomorfos, SFC1, SFC2, SFC3, SAZ1, SJN, HTA2 y CHA3 tienen crecimiento dicotómico el resto crecimiento simple de los rizomorfos

Las secuencias comparadas en el BLAST coinciden con las especies; *Armillaria ostoyae*, *Armillaria gallica* y *Armillaria mellea*

Las características morfológicas del esporóforo recolectado en San Juan Nuevo coinciden con la especie *Armillaria ostoyae*.

Las once cepas aisladas de los tres municipios resultaron ser patogénicas para *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*

Las cepas aisladas del municipio de Charapan fueron más severas y virulentas que el resto de las cepas.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg, J.E., Forster, H., Wade, L., Thompson, D.F. y Connell, J.H.** 1999. Efficacy of sodium tetrathiocarbonate and propiconazole in managing *Armillaria* root rot of almond on peach rootstock. *Plant Dis.* 83, 240–246.
- Agrios G. N.** 2005. *Plant Pathology* 5<sup>th</sup> edition. Elsevier. United States of America. 922 p.
- Aguin-Casal O., Mansilla-Vazquez, J.P. y Sainz-Oses, M.J.** 2006. *In vitro* selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Manag. Sci.* 62, 223–228.
- Aguin-Casal O., Sainz-Oses, M.J. y Mansilla-Vazquez, J.P.** 2004. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 683–687.
- Anderson, J.B. y Bailey, S.S.** 1989. Variation in ribosomal DNA among biological species of *Armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution*, **43**, 1652–1662.
- Anderson, J.B., Petsche, D.M. y Smith, M.L.** 1987 Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia*, **79**, 69–76.
- Anderson, J.B. y Stasovski, E.** 1992. Molecular phylogeny of Northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*, 84, 505–516.
- Antonín V., Tomsovsky, M., Sedlák, P., Májek, T. y Jankovsky, L.** 2009. Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes*–*A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia. *Mycol. Prog.* **8**, 259–271.
- Barahona M. y E. Sancho,** 1998. *Fruticultura Especial. Aguacate y Mango, Fruticultura II*, 1 reim. EUNED. San José, Costa Rica. 80 p.
- Baumgartner, K.** 2004. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Dis.* 88, 1235–1240.
- Baumgartner, K. y Rizzo, D.M.** 2001. Distribution of *Armillaria* species in California. *Mycologia*, 93, 821–830.

- Baumgartner, K.** y Rizzo, D.M. 2001. Ecology of *Armillaria* species in mixed-hardwood forests of California. *Plant Dis.* 85, 947–951.
- Baumgartner, K.** y Rizzo, D.M. 2002. Spread of *Armillaria* root disease in a California vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 197–203.
- Baumgartner, K.** y Warnock, A.E. 2006. A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea* in vitro and improves productivity of grapevines with root disease. *Plant Dis.* 90, 439–444.
- Baumgartner, K.,** Grubisha, L., Fujiyoshi, P., Garbelotto, M. y Bergemann, S.E. 2009. Microsatellite markers for the diploid Basidiomycete fungus, *Armillaria mellea*. *Mol. Ecol. Res.* 9, 943–946.
- Baumgartner, K.,** Fujiyoshi, P., Foster, G.D. y Bailey, A.M. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation for investigation of somatic recombination in the fungal pathogen *Armillaria mellea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7990–7996.
- Baumgartner K.,** Coetzee M. P. A. y Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. molecular plant pathology. 11<sup>a</sup>, D-07745 Jena, Germany.
- Bérubé, J.A.** 2000. *Armillaria* species in Newfoundland. *Can. J. Forest Res.* 30, 507–512.
- Bliss, D.E.** 1951. The destruction of *Armillaria mellea* in citrus soils. *Phytopathology*, 41, 665–683.
- Bruhn, J.N.,** Wetteroff, J.J., Mihail, J.D., Kabrick, J.M. y Pickens, J.B. 2000. Distribution of *Armillaria* species in upland Ozark Mountain forests with respect to site, overstory species composition and oak decline. *Forest Pathol.* 30, 43–60.
- Caballero J.L.,** V. Valpuesta, y J. M. Muñoz Blanco, 2001. Introducción a la Biotecnología Vegetal: Métodos y aplicaciones. Publicaciones Caja Sur. Córdoba. 406 p.
- Cázares-Sánchez E.,** Segura-Ledesma S., Dominguez-Alvarez J. L., Luna-Morales C. C., Alanis-Martinez I., Soto-Hernandez R. M. y Rojas-Martinez R. I. 2010.

Elimination of Oxidative Compounds to Increase the Quality and Quantity of DNA Extracted from Leaves of Guava (*Psidium guajava* L.). Acta Hort. 849, ISHS 2010.

**Cha, J.Y.** y Igarashi, T. 1995. *Armillaria* species associated with *Gastrodia elata* in Japan. *Eur. J. Forest Pathol.* 25, 319–326.

**Cha, J. Y.,** Lee, S.Y., Chun, K W., Lee, S.Y., Haha, O y Sho, J. 2009. Armillaria root rot caused by *Arimillariatabescens* on *Prunussalicina* in a Korean garden, *J. Fac. Agr., Kuyushu Univ.*, 2009, 54(2), 273-277.

**Cha J. Y.,** Sung J. M. y Igarashi T. 1992. Biological Species and Morphological Characteristics of *Armillaria mellea* Complex in Hokkaido: *A. ostoyae* and *A. bulbosa*. *Research Bulletins of the college Experiment Forest Vol. 49, No. 2* 185-194

**Chapman, B.** y Ziao, G. 2000. Inoculation of stumps with *Hypholoma fasciculare* as a possible means to control Armillaria root disease. *Can. J. Bot.* 78, 129–134.

**Chillali, M.,** Idder-Ighili, H., Agustian, A., Guillaumin, J.-J., Mohammed, C. y Botton, B. 1997. Species delimitation in the African *Armillaria* complex by analysis of the ribosomal DNA spacers. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43, 23–29.

**Chillali, M.,** Idder-Ighili, H., Guilaumin, J.-J., Mohammed, C., Lung Escarmant, B. y Botton, B. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycol. Res.* 102, 533–540.

**Coetzee, M.P.A.,** Wingfield, B.D., Coutinho, T.A. y Wingfield, M.J. 2000. Identification of the causal agent of Armillaria root rot of *Pinus* species in South Africa. *Mycologia*, 92, 777–785.

**Coetzee, M.P.A.,** Wingfield, B.D., Kirisits, T., Chhetri, D.B., Bloomer, P. y Wingfield, M.J. 2005. Identification of *Armillaria* isolates from Bhutan based on DNA sequence comparisons. *Plant Pathol.* 54, 36–45.

**Coria A., V. M.** 2008. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, libro Técnico No. 8, Uruapan, Michoacán, 145-146 p.

- Cox, K.D. y Scherm, H.** 2006. Interaction dynamics between saprobic lignicolous fungi and *Armillaria* in controlled environments: exploring the potential for competitive exclusion of *Armillaria* on peach. *Biol. Control*, 37, 291–300.
- Delgado F. A., Villegas R. M. y Cifuentes B. J.** 2005. Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar. Facultad de ciencia, UNAM. México, 66 p.
- Delong, R.L., Lewis, K.J., Simard, S.W. y Gibson, S.** 2002. Fluorescent pseudomonad population sizes baited from soils under pure birch, pure Douglas-fir, and mixed forest stands and their antagonism toward *Armillaria ostoyae* in vitro. *Can. J. Forest Res.* 32, 2146–2159.
- Dettman, J.R. y van der Kamp, B.J.** 2001. The population structure of *Armillaria ostoyae* and *Armillaria sinapina* in the central interior of British Columbia. *Can. J. Bot.* 79, 600–611.
- Dodd SL, Crowhurst RN, Rodrigo AG, Samuels GJ, Hill RA y Stewart A.** 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 104, 23–34. doi:10.1017/S0953756299001100.
- Dodd S. L., Ramsfield T. D. y Marshall J. W.** 2010. PCR primers to distinguish *Armillaria* species found in New Zeland. *Australasian Plant Pathology*, 39, 536-543.
- Durai M. V.** 2013. First report of *Armillaria tabescens* (Scop.) causing root rot on *Dalbergia sissoo* Roxb. in India. *Current Biotica* 6 (4): 504-508.
- Entry, J.A., Cromack, K.J., Hansen, E. y Waring, R.** 1991. Response of western coniferous seedlings to infection by *Armillaria ostoyae* under limited light and nitrogen. *Phytopathology*, 81, 89–94.
- Forest Pest Fact Sheet,** 2014. *Armillaria* root disease (*Armillaria* spp.) Saskatchewan Ministry of Enviroment. Disponible en URL: <http://www.enviroment.gov.sk.ca/adx/asp/adxGetMedia.aspx?DocID=3630,184,121,104,81,1,Documents&MediaID=4160&Filename=Armillaria+root+diseas e.pdf>. Consulta realizada el 30 de julio de 2014.

- Garbelotto**, M.M., Lee, H.K., Slaughter, G., Popenuck, T., Cobb, F.W. y Bruns, T.D. 1997. Heterokaryosis is not required for virulence of *Heterobasidion annosum*. *Mycologia*, 89, 92–102.
- Gregory**, S.T., Rishbeth, J. y Shaw, C.G., III 1991 Pathogenicity and virulence. In: *Armillaria Root Disease* Agriculture Handbook No. 691 (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds), pp. 76–87. Washington, DC: United States
- Gronthier** P., Giglielmo F., Sillo F., Giordano L. y Garbelotto M. 2014. A molecular diagnostic assay for the detection and identification of wood decay fungi of conifers. *Forest Pathology* 45 (2015) 89-101. Grugliasco, Italy.
- Gubler**, W.D., Baumgartner, K., Browne, G.T., Eskalen, A., Rooney Latham, S., Petit, E. y Bayramian, L.A. 2004. Root diseases of grapevines in California and their control. *Austral. Plant Pathol.* 33, 157–165. Department of Agriculture Forest Service.
- Guillaumin** J. J. 1986. Le Pourridie de la vigne. *Phytoma-Defense des cultures*, noviembre, pp 19-23.
- Guillaumin**, J. J., Mohammed, C., Anselmi, N., Courtecuisse, R., Gregory, S.C., Holdenrieder, O., Intini, M., Lung, B., Marxmuller, H., Morrison, D., Rishbeth, J., Termorshuizen, A.J., Tirro, A. y Vandam, B. 1993. Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in Western Europe. *Eur. J. Forest Pathol.* 23, 321–341.
- Guillén** A. H., Ch Ma. B. N. Lara, C. M. Gutiérrez, C. M. Ortiz, y P. M. E. Ángel, 2007. Cartografía Agroecológica del Cultivo del aguacate en Michoacán. Morevallado Editores. 140 p.
- Guzmán** G. 1980. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. Limusa, México, D. F. 452 p.
- Hall** T. A. 1999. “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

- Harrington**, T.C. y Wingfield, B.D. 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia*, 87, 280–288
- Harrington**, T.C., Worrall, J.J. y Baker, F.A. 1992. *Armillaria*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi* (Singleton, L.L., Mihail, J.D. and Rush, C.M., eds), pp. 81–85. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Hartig** R. 1873. Vorläufige Mitteilung fiber den Parasitismus von *Agaricul Melleus* und dessen Rhizomorphen. *Bot. Zeit.* 31: 295-297.
- Herrera** T. y M. Ulloa, 1990. El Reino de los Hongos. UNAM/Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 552 p.
- Hood**, I.A., Horner, I.J., Gardner, J.F. y Sandberg, C.J. 2002. *Armillaria* root disease of *Pinus radiata* in New Zealand. 1: Basidiospore dispersal. *N. Z. J. Forest Sci.* 32, 94–102.
- Hood**, I.A., Redfern, D.B. y Kile, G.A. 1991. *Armillaria* in planted hosts. In: *Armillaria Root Disease Agriculture Handbook No. 691* (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds), pp. 122–149. Washington, DC: United States Department of Agriculture Forest Service.
- Hu**, Z., Huang, Q.-Z., Liu, X.-Z. y Yang, J.-B. 1999. Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFP-I from *Gastrodia elata*. *Acta Bot. Yunnan*, 21, 131–138.
- Jahnke**, K.-D., Bahnweg, G. y Worrall, J.J. 1987. Species delimitation in the *Armillaria mellea* complex by analysis of nuclear and mitochondrial DNAs. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88, 572–575.
- Jin**, W.S. y Tian, D.Q. 2000. Studies of the chemistry and pharmacology of *Gastrodia elata*. *Chin. Trad. Drug Technol.* 2, 21–30.
- Johannesson**, H. y Stenlid, J. 1999. Molecular identification of woodinhabiting fungi in an unmanaged *Picea abies* forest in Sweden. *Forest Ecol. Manag.* 115, 203–211.
- Keca**, N., Karadzic, D. y Woodward, S. 2009. Ecology of *Armillaria* species in managed forests and plantations in Serbia. *Forest Pathol.* 39, 217–231.

- Kile**, G.A. y Watling, R. 1988. Identification and occurrence of Australian *Armillaria* species, including *A. pallidula* sp. nov. and comparative studies between them and non-Australian tropical and Indian *Armillaria*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91, 305–315.
- Kile**, G.A., Guillaumin, J.J., Mohammed, C. y Watling, R. 1994. Biogeography and pathology of *Armillaria*. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Root and Butt Rots* (Johannson, M. and Stenlid, J., eds), pp. 411–436. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Kromroy**, K.W., Blanchette, R.A. y Grigal, D.F. 2005. *Armillaria* species on small woody plants, small woody debris, and root fragments in red pine stands. *Can. J. Forest Res.* 35, 1487–1495.
- Lara** Ch. Ma. B. N. 2008. Variabilidad fenotípica y patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la franja aguacatera de Michoacán, México.
- Largent** D.L. 1973. How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features. Eureka, CA: Mad River Press. 151p.
- LeFrancois**, J.-B., Lung-Escarmant, B. y Langrell, S.R.H. 2002. Development of novel polymerase chain reaction (PCR) based microsatellite markers in *Armillaria gallica* by cross-species amplification and species-specific cloning. *Mol. Ecol. Notes*, 2, 182–184.
- Leslie**, J. F. y Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 387 p.
- Mansilla**, J.P.; Aguin, O.; Abelleira, A. y Sainz, M.J. 2000. Adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies de *Armillaria* en Galicia. *Bol.San. Veg. Plagas*, 26:79-88
- Maphosa**, L., Wingfield, B., Coetzee, M., Mwenje, E. y Wingfield, M.J. 2006. Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Aust. Plant Pathol.* 35, 513–520.

- Matsushita**, N. y Suzuki, K. 2005. Identification of *Armillaria* species in Japan using PCR-RFLP analysis of rDNA intergenic spacer region and comparisons of *Armillaria* species in the world. *J. Forest Res.* 10, 173–179.
- Morales** G. J. L. 2009. Enfermedades de importancia económica en el cultivo del aguacate en Michoacán, México, 44 p.
- Moreno** G., M. J. L. García, y A. Zugaza, 1986. La guía de INCAFO de los hongos de la península ibérica tomo I. Incafo S. A. Madrid, España, 121p.
- Morrison**, D.J. 2004. Rhizomorph growth habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species. *Forest Pathol.* **34**, 15–26.
- Munnecke**, D.E., Kolbezen, M.J., Wilbur, W.D. y Ohr, H.D. 1981. Interactions involved in controlling *Armillaria mellea*. *Plant Dis.* 65, 384–389.
- Mwenje**, E., Wingfield, B.D., Coetzee, M.P.A. and Wingfield, M.J. 2003. Molecular characterisation of *Armillaria* species from Zimbabwe. *Mycol. Res.* 107, 291–296.
- Mwenje**, E., Wingfield, B.D., Coetzee, M.P.A., Nemato, H. y Wingfield, M.J. 2006. *Armillaria* species on tea in Kenya identified using isozyme and DNA sequence comparisons. *Plant Pathol.* 55, 343–350.
- Ohr** M., A. N. Halliday, y D. R. Peacot. 1991. Isotopic evidence for punctuated clay diagenesis, Texas Gulf Coast, Earth Planet. Sci. Lett., in press.
- Ochoa** A. S. 2011. Enfermedades del aguacate de importancia económica en México. Coatepec Harinas, México. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, pp. 9-11.
- Ota**, Y., Matsushita, N., Nagasawa, E., Terashita, T., Fukuda, K. y Suzuki, K. 1998. Biological species of *Armillaria* in Japan. *Plant Dis.* 82, 537–543.
- Otieno**, W., Termorshuizen, A., Jeger, M. y Othieno, C. 2003. Efficacy of soil solarization, *Trichoderma harzianum*, and coffee pulp amendment against *Armillaria* sp. *Crop Protect.* 22, 325–331.

- Pareek, M., Allaway, W.G. y Ashford, A.E.** 2006 *Armillaria luteobubalina* mycelium develops air pores that conduct oxygen to rhizomorph clusters. *Mycol. Res.* 110, 38–50.
- Peabody, R.B., Peabody, D.C. y Sicard, K.M.** 2000. A genetic mosaic in the fruiting stage of *Armillaria gallica*. *Fungal Genet. Biol.* 29, 72–80.
- Pearce, M.H. y Malajczuk, N.** 1990. Factors affecting the growth of *Armillaria luteobubalina* rhizomorphs in soil. *Mycol. Res.* 94, 38–48.
- Pearce, M.H., Nelson, E.E. y Malajczuk, N.** 1995 Effects of the cordforming saprotrophs *Hypholoma australe* and *Phanerochaete filamentosa* and of ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. *Mycol. Res.* 99, 951–956.
- Pegg K. G., L. M. Coates, L. Korsten, y R. M. Harding,** 2007. Enfermedades foliares, del fruto y el suelo. En: Whiley, A. W., Schaffer, B., y Wolstenholme, B. N. 2007. El Palto Botánica, Producción y Usos. Traducción 1a ed. Ediciones Universitarias de Valparaiso. Litogarín, Valparaiso. 275-310p.
- Pérez-Sierra, A., Guillaumin, J.-J., Spooner, B.M. y Bridge, P.D.** 2004. Characterization of *Armillaria heimii* from Africa. *Plant Pathol.* 53, 220–230.
- Phillips D., B. R. Grant y G. Weste,** 1986. Histological changes in the roots of an avocado cultivar Duke 7, infected whit *Phytophthora cinnamomi*. *Cytology and Histology. Phytopathology.* 77: 691-698.
- Piercey-Normore M. D. y Bérubé J. A.** 2000. Artificial inoculation with *Armillaria ostoyae* in established conifers stressed by defoliation, planting, and thinning in Newfoundland. *Canadian Forest Service, Natural Resources Canada,* 30: 1758-1765.
- Pildain, M., Coetzee, M., Rajchenberg, M., Petersen, R., Wingfield, M. y Wingfield, B.** 2009 Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes. *Mycol. Prog.* 8, 181–194.
- Pildain, M.B., Coetzee, M.P.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. y Rajchenberg, M.** 2010. Taxonomy of *Armillaria* in the Patagonian forests of Argentina. *Mycologia,* 102, 392–403.

- Prodorutti D**, Vanblaere T, Gobbin D, Pellegrini A, Gessler C y Pertot I 2009. Genetic diversity of *Armillaria* spp. infecting Highbush Blueberry in Northern Italy (Trentino Region). *Phytopathology* 99, 651–658. doi:10.1094/PHYTO-99-6-0651
- Prospero, S.**, Rigling, D. y Holdenrieder, O. 2003. Population structure of *Armillaria* species in managed Norway spruce stands in the Alps. *New Phytol.* 158, 365–373.
- Prospero, S.**, Holdenrieder, O. y Rigling, D. 2004. Comparison of the virulence of *Armillaria cepistipes* and *Armillaria ostoyae* on four Norway spruce provenances. *Forest Pathol.* 34, 1–14.
- Prospero S.**, Holdenrieder, O. y Rigling, D. 2006 Rhizomorph production and stump colonization by co-occurring *Armillaria cepistipes* and *Armillaria ostoyae*: an experimental study. *Forest Pathol.* 36, 21–31.
- Prospero, S.**, Lung-Escarmant, B. y Dutech, C. 2008. Genetic structure of an expanding *Armillaria* root rot fungus (*Armillaria ostoyae*) population in a managed pine forest in southwestern France. *Mol. Ecol.* 17, 3366– 3378.
- Prospero, S.**, Jung, E., Tsykun, T. y Rigling, D. 2010. Eight microsatellite markers for *Armillaria cepistipes* and their transferability to other *Armillaria* species. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 165–170.
- Qin, G.F.**, Zhao, J. y Korhonen, K. 2007. A study on intersterility groups of *Armillaria* in China. *Mycologia*, 99, 430–441.
- Raziq, F.** y Fox, R.T.V. 2003. Comparisons between the *in vitro* and *in vivo* efficacies of potential fungal antagonists of *Armillaria mellea*. *Biol. Agric. Hortic.* 21, 263–276.
- Redfern, D.B.** y Filip, G.M. 1991. Inoculum and infection. In: *Armillaria Root Disease* Agriculture Handbook No. 691 (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds), pp. 48–61. Washington, DC: United States Department of Agriculture Forest Service.
- Rishbeth, J.** 1982. Species of *Armillaria* in southern England. *Plant Pathol.* 31, 9–17.
- Rishbeth, J.** 1985. Infection cycle of *Armillaria* and host response. *Eur. J. Forest Pathol.* 15, 332–341.

- Rizzo**, D.M., Blanchette, R.A. y May, G. 1995. Distribution of *Armillaria ostoyae* genets in a *Pinus resinosa*–*Pinus banksiana* forest. *Can. J. Bot.* 73, 776–787.
- Rizzo**, D.M. y Harrington, T.C. 1993. Delineation and biology of clones of *Armillaria ostoyae*, *A. gemina*, and *A. calvescens*. *Mycologia*, 85, 164–174.
- Rizzo**, D.M., Whiting, E.C. y Elkins, R.B. 1998. Spatial distribution of *Armillaria mellea* in pear orchards. *Plant Dis.* 82, 1226–1231.
- Sa**, Q., Wang, Y., Li, W., Zhang, L. y Sun, Y. 2003. The promoter of an antifungal protein gene from *Gastrodia elata* confers tissue-specific and fungus-inducible expression patterns and responds to both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant Cell Rep.* 22, 79–84.
- Sánchez** R. G. 2007. El Cluster del Aguacate de Michoacán. 1° ed. Fundación Produce Michoacán. Morelia, Michoacán México. 241 p.
- Schnabel**, G., Ash, J.S. y Bryson, P.K. 2005. Identification and characterization of *Armillaria tabescens* from the southeastern United States. *Mycol. Res.* 109, 1208–1222.
- Schulze**, S., Bahnweg, G., Tesche, M. y Sandermann, H. 1995. Identification of European *Armillaria* species by restriction-fragmentlength polymorphisms of ribosomal DNA. *Eur. J. Forest Pathol.* 25, 214–223.
- Scora** R.W. y B.O. Bergh, 1992. Origin and taxonomic relationships within the genus *Persea*. In: Lovatt, C., Holthe, P.A. and Arpaia, M.L. (eds) Proceedings of the Second World Avocado Congress, Vol. 2. University of California Riverside, California, pp. 505–514.
- Sekizaki**, H., Kuninaga, S., Yamamoto, M., Asazu, S.N., Sawa, S., Kojoma, M., Yokosawa, R. y Yoshida, N. 2008. Identification of *Armillaria nabsnona* in *Gastrodia* tubers. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1410–1414.
- Shaw** C.G. III y G.A. Kile, 1991. *Armillaria* Root Disease. United States Department of Agriculture-Forest Service Handbook No. 691. Washington, DC: United States Department of Agriculture-Forest Service.

- SIAP.** 2016. Avances de siembra y cosecha por cultivo. SAGARPA URL: [http://nube.siap.gob.mx/cierre\\_agricola/](http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/). Consultado 07 de agosto de 2017.
- Sicoli G, Fatehi J y Stenlid J** 2003 Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology* 33, 287–297. doi:10.1046/j.1439-0329.2003.00330.x
- Singh, P.** 1980. *Armillaria* root rot: artificial inoculation and development of the disease in greenhouse. *Eur. J. For. Pathol.* 10: 420–431.
- Smith M.L. and Anderson, J.B.** 1989. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria*: identification of North American biological species. *Mycol. Res.* **93**, 247–256.
- Smith-White JL, Summerell BA, Gunn LV, Rinzin C, Porter C y Burgess LW.** 2002. Molecular detection and differentiation of Australian *Armillaria* species. *Australasian Plant Pathology* **31**, 75–79. doi:10.1071/AP01061.
- Snider P. J.** 1959. Stages in development of rhizomorphic thalli of *Armillaria mellea*. *Mycologia* 51: 693-707.
- Tamayo M. P. J.** 2007. Enfermedades del aguacate. Enuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. *Politécnica Colombiana* 4:51-70.
- Téliz O. D. y Mora, A. A.** 2007. El aguacatero y su manejo Integrado. 2da Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.
- Téliz O. D. y P. F.J. Marroquín,** 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. En: Téliz, O. D y Mora, A. A. El aguacate y su manejo integrado. 2a ed. Mundi Prensa. Ixtapaluca, Edo. De México. pp. 1-28.
- Trigiano R.N., M.H. Ament, M.T. Windham y J.K. Moulton,** 2004. Genetic profiling of red-bracted *Cornus kousa* cultivars indicates significant cultivar synonymy. *HortScience* 39:489–492.
- Tsopeles P y Tjamos E.C** 1997. Occurrence and pathogenicity of *Armillaria tabescens* on almond in Greece, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 27, 455 – 461.

- Valdés M., J., Córdova, R. Valenzuela y A. M. Fierros.** 2004. Incremento del fitopatógeno *Armillaria mellea* (Vahl.: Fr.) Karsten en bosque de pino-encino, en relación al grado de disturbio por tratamiento silvícola. *Rev Chapingo Serie: Ciencias Forestales y del Ambiente* 10: 99-103.
- Van der Kamp, B.J.** 1993. Rate of spread of *Armillaria ostoyae* in the central interior of British Columbia. *Can. J. For. Res.* 23: 1239–1241.
- Volk, T.J., Burdsall, H.H., Jr y and Banik, M.T.** 1996. *Armillaria nabsnona*, a new species from western North America. *Mycologia*, 88, 484–491.
- Wang, H.X., Yang, T., Zeng, Y. y Hu, Z.** 2007. Expression analysis of the gastrodianin gene ga4B in an achlorophyllous plant *Gastrodia elata* Bl. *Plant Cell Rep.* 26, 253–259.
- Wang, H.X., Bauw, G., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Chen, Z.-L., Van Montagu, M., Angenon, G. y Dillen, W.** 2001. Gastrodianin-like mannose-binding proteins: a novel class of plant proteins with antifungal properties. *Plant J.* 25, 651–661.
- Ward E.** 1994. Use of polymerase chain reaction for identifying plant pathogens. En: *Ecology of Plant Pathogens.* J. P. Blakeman y B. Williamson, eds. CAB International, Oxon, UK. 143-160 p.
- Wargo, P.M. y Shaw, C.G., III** 1985. Armillaria root rot: the puzzle is being solved. *Plant Dis.* 69, 826–832.
- Watling, R., Kile, G.A. y Burdsall, H.H., Jr** 1991. Nomenclature, taxonomy, and identification. In: *Armillaria Root Disease* Agriculture Handbook No. 691 (Shaw, C.G., III and Kile, G.A., eds), pp. 1–9. Washington, DC: United States Department of Agriculture-Forest Service.
- While A. W. B. Schaffer y B. N. Wolstenholme,** 2007. El Palto, Botánica, Producción y Usos. Ediciones Universitarias de Valparaiso. 275-310 p.
- White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor J** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In ‘PCR protocols: a guide to methods

and applications'. (Eds MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White) pp. 315–322. (Academic Press: San Diego, CA).

**Wingfield**, B.D., Maphosa, L., Coetzee, M.P.A., Mwenje, E. y Wingfield, M.J. 2009. Characterisation of Zimbabwean *Armillaria* using IGS-1 sequences and AFLP analysis. *Fungal Divers.* 34, 187–196.

**Worrall** J. J., I. Chet y A. Hüttermann, 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *Journal of General Microbiology* 132: 2527-2533.

**Worrall**, J.J. 1994. Population structure of *Armillaria* species in several forest types. *Mycologia*, 86, 401–407.

**Worrall**, J.J., Sullivan, K.F., Harrington, T.C. y Steimel, J.P. 2004. Incidence, host relations and population structure of *Armillaria ostoyae* in Colorado campgrounds. *Forest Ecol. Manag.* 192, 191–206.

**Xu** Q., Liu Y., Wang X., Gu H. y Chen Z. 1998. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 899–905.

## APÉNDICE

### SFC1

ATGGACTGTTATAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCCA  
TTAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGG  
ACAAGTATCTCCTCAATAAAGGGAGAAAGGAAAAAGAGCCGTTAAGCGAC  
CCTCCAAACCGATGTAATCGGACAGGTGCTCCGAAAGGGAGAAACAGAGA  
GAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAACCACAGTTAAACTA  
CTCTTATAACACACTCAAGCCCTCGGACAGGCATCTCCTCAATAAAGGGAT  
AAAGGGAAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATCTTGAGCCCAATC  
CTGGTTATCCCTACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGGCCACCACCAA  
GGCGTAGATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCCTACGGTTTCCG  
CGAATGCATTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCAAACCCAACAT

CCACTCCGCCACACTCCTACTCTCAGAATAGGGAGGTTGATAAGTAAATGA  
CTCTCAGACAGGCATGCCCTTAGGAATACCGAAGGGCGCAAGGTGCGTTCA  
CATACTCAATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGCTATCGCATTTTCG  
CTGCGTTCTTCATCGATGCGACAGCCAAAAGAT

**SFC2**

CTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCCATTAAG  
GTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGGACAAG  
TATCTCCTCAATAAATGAATAAAGGGAGAAAGCAGAAGGAGCCGTTAAGCA  
ACCCTCCGTACCGATGTTAGCGGACAGGTACTCCGAAAGGGAGAAACAGAG  
AGAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAGCCAAAGTTAAACT  
ACACTTAAAGCACACTCAAACCATCGGACAAGTATCTCCTCGATAAAGGGA  
GAAGGCAGAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAAGCGATCTTGAGCGCAAT  
CCTGGTTATCCCGACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGGCCAGCACCA  
AGGCGTACATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAATAGTCAAACGGATTCC  
GCTAATGCATTTAAGAGGAGCTGAGATCGTTATATACCTTCCACCCTCCCCT  
CCAATCAGCTACTTTCTAATAGTAAGTA

**SFC3**

ATGGACTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCCA  
TTAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGG  
ACAAGTATCTCCTCAATAAAGGGAGAAAGCAAAAGGAGCCGTTGAGCAAC  
CCTCCATACCGATGTTATCGGACAGGTACTCCGAAAGGGAGAAACGGAGAG  
AGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAGCCAAAGTTAAACTAC  
ACTTAAAACACACTCAAGCCATCGGACAGGTATCTCCTCAATAAAGGGAGA  
AAGGAGAAGGAGCCGTTGAGCAACCCTCCAAACCGATCTTGAGCCCAATCC  
TGGTTATCCCTACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGGCCACCACCAAG  
GCGTAGATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCAAACGGTTTCCGC  
TAATGCATTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCAACCCCCACATC  
CAATCCGCCACACTCCTAATATAAGAAGAGGGAGGTTGATAATTAATGAC  
ACTCAGACAGGCATGCCCTTCGGAATACCGAAGGGCGCAAGGTGCGTTTCGA  
AGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCG  
TGCGTTCTTCATCGATG

**SAZ1**

AATTGTCCAAGTCAATGGACTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGT  
CCTAGCGATATCCATTAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGA  
GACCAGGTATCGGACAAGTATCTCCTCAATAAAGGGAGAAAGCAGAAGGA  
GCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATGTTATCGGACAGGTACTCCGAAAGG  
GAGAAACAGAGAGAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAGCC  
AAAGTTAAACTACACTTAAAACACACTCAAGCCATCGGACAGGTATCTCCT  
CAATAAAGGGAGAAAGCAGAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGAT  
CTTGAGCCCAATCCTGGTTATCCCTACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACA

CGGCCACCACCAAGGCGTAGATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGT  
CAAACGGTTTCCGCTAATGCATTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCA  
GCAACCCCCACATCCAATCCGCCACACTCCTAATAAAAAGAAGAGGGAGGTT  
GATAATTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCGAAGGGCG  
CAAGGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAG  
TTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTG  
TTGAAAGTTGTATAATATTTA

**SAZ2**

TCCTCACAGTGTACAATGGACTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTG  
TCCTAGCGATATCCATTAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAG  
AGACCAGGTATCGGACAAGTATCTCCTCAATAAATCAATAAAGGGAGAAAG  
CAGAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATGTTATCGGACAGGTACT  
CCGAAAGGGAGAAACAGAGAGAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATAA  
TCCTAAGCCAAAGTTAAACTACACTTAAAGCACACTCAAGCCATCGGACAA  
GTATCTCCTCAATAAAGGGAGAAAGCAGAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCC  
AAACCGATCTTGAGCCCAATCCTGGTTATCCCTACTCTCTGACTCCGTATTCT  
GACAACACGGCCACCACCAAGGCGTAGATATTATCACAGCCTAGCAGCACC  
CAAAGTCAAACGGTTTCCGCTAATGCATTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTA  
GAGACCAGCAACCCCCACATCCAATCCGCCACACTCCTAATAAAAAGAAGAG  
GGAGGTTGATAATTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCG  
AAGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATT  
CACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC

**SJN**

TCAATGGACTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATAT  
CCATTAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTAT  
CGGACAAGTATCTCCTCAATAAATCAATAAAGGGAAAAAGCACAAGGAGC  
CGTTAAGCAACCCTCCATACCGATGTTAGCGGACAGGTACTCCGAAAGGGA  
GAAACAGAGAGAGCCGCTAAGCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAGCCAA  
AGTTAAACTACACTTAAAGCACACTCAAGCCATCGGACAAGTATCTCCTCG  
ATAAAGGGAAAAAGCACAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATCTT  
GAGCGCAATCCTGGATATCCCTACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGG  
CCAGCACCAAGGCGAAGATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCAA  
ACGGATTCCGCTAATGAATTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCA  
ACCCCCACATCCAATCCGCCACACTCCTAATAAGAGAGGAGGGAGGTTGAT  
GATTAATGACACTCATAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCGAAGGGCGCAA  
GGTGCATTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTA  
TCGCATTTTCGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAGC

## HTA1

AATGGACTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCC  
ATTAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCG  
GACAAGTATCTCCTCAATAAATCAATAAAGGGAGAAGGCACAAGGAGCCGT  
TAAGCAACCCTCCATACCGATGTTATCGGACAGGTACTIONCCGAAAGGGAGAA  
ACCCATAGAGCCGTTAATCATCCCTCCATACCGATAATCCTAAGCCACAGTT  
AAACTACTTAAAGAACACTIONCAAGCCATCGGACAAGCATCTCCTCAATAA  
AGGGAAAAACACAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATCTTGAGC  
CCAATCCTGGATATCCCTACTCTCTGACTCCGCATTCTGACTACACGGCCAG  
CACCAAGGCGTACATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCAAACGG  
TTTCCGCTAATGCATTTATGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCAATCCC  
CACATCCAATCTGCCACACTIONCCTAATAAGAGAATAGGGAGGTTGATGATTA  
AATGACACTIONCACAGGCATGCCCTTCGGAATACCGAAGGGCGCAAGGTGC  
ATTCAAAGACTCGATGATTCACTIONGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCA  
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT

## HTA2

TGAAGCTTCTACAAGTCTGTCCTAGCGATATCCATTAAGGTACGTGCCATCT  
TAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGGACAAGTATCTCCTCAATA  
AATCAATAAAGGGAGAAAGCACAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACC  
GATGTTATCGGACAGGTACTIONCCGAAAGGGAGAAACAGAGAGAGCCGTTAA  
GCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAGCCAAAGTTAAACTACTTAAAGC  
ACACTCAAACCATCGGACAAGTATCTCCTCAATAAAGGGAGAAAGCAGAAG  
GAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATCTTGAGCGCAATCCTGGTTATCCC  
TACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGGCCAGCACCAAGGCGTACATAT  
TATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCAAACGGTTTCCGCTAATGCATTTA  
AGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCAACCCCCACATCCAATCCGCCAC  
ACTCCTAATAAGAGAAGAGGGAGGTTGATGATTAATGACACTIONCAAACAGG  
CATGCCCTTCGGAAGCCGAAGGGCGAAGGTGCGTTCAAGACTCGATGATTCT  
CTGAATTCTGCATTCACATTAGTTTCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCTCGATGCG  
AGAGCCAGAGATCCGTTGTTGAAATTGTAA

## CHA1

CTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCCATTAAG  
GTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGGACAAG  
TATCTCCTCAATAAATCAATAAAGGGAGAAAGCAGAAGGAGCCGTTAAGCA  
ACCCTCCATACCGATGTTATCGGACAGGTACTIONCCGAAAGGGAGAAACAGAG  
AGAGCCGTTAAGCAACCCTCCATACCGATAATCCTAAGCCAAAGTTAAACT  
ACACTTAAAGCACACTIONCAAGCCATCGGACAAGTATCTCCTCAATAAAGGGA  
GAAAGCAGAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATCTTGAGCCCAAT  
CCTGGTTATCCCTACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGGCCACCACCA

AGGCGTAGATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCAAACGGTTTCC  
GCTAATGCATTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCAACCCCCACA  
TCCAATCCGCCACACTCCTAATAAAAAGAAGAGGGAGGTTGATAATTAATG  
ACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCGAAGGGCGCAAGGTGCGTTC  
AAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTC  
GCTGCGTTCTTCATC

## **CHA2**

CCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCCATTAAGGTACGTGCCATCTTAA  
GCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGGACAAGTATCTCCTCAATAAAG  
GGAGAAAGCAAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAACCGATGTTATCGGA  
CAGGTACACCGAAGGGGACTATTAGAGAAAAAGGGTAAATGGGCCTCCTCT  
TATATAATCCTTCACGAAAACTAACTACAAATATAAAATACTCATGCGACT  
GGAGAGGTATCTCTTCCCAGACCCCCATAACTTTCTTAGGAGAGGTTGACCC  
CCTCCTCCAAAATTTGATTCTGTATTCAGGTTTACACCGCCCCCTTGCCAA  
ACCGCTGGAAAAGACTAGCCCCAGGAAGGGGAAAGAAACAACCCCGCAT  
CAAAAAAAAAAAGAGGGAAACGGTTTCGCCTAAGAGTTTTTTTTTTTTTTGGG  
GAAGAGTGAAGTGACCCTCCCCCTGCATCTTATCCAGCAGAACATTTAAAA  
AAAAGAG

## **CHA3**

TGGACTGTTAGAAGCTGAACCCTTCTACAAAGTCTGTCCTAGCGATATCCAT  
TAAGGTACGTGCCATCTTAAGCGCTACGCTACACAGAGACCAGGTATCGGA  
CAAGTATCTCCTCAATAAATGAATAAAGGGAAAAGACACAAGGAGCCGTTA  
AGCAACCCTCCATACCGATGTTAGCGGACAGGTACTCCGAAAGGGAGAAAC  
AGAGAGAGCCGTTAACCAACCCTCCATACCGATAATCCTAATCCAAAGTTA  
AACTACACTTAAAGCACACTCAAACCATCGGACAAGTATCTCCTCAATAAA  
GGGAAAAGGCACAAGGAGCCGTTAAGCAACCCTCCAAAGCGATCTTGAGC  
GCAATCCTGGTTATCCCGACTCTCTGACTCCGTATTCTGACAACACGGCCAG  
CACCAAGGCGTACATATTATCACAGCCTAGCAGCACCCAAAAGTCTCACGG  
TTCCGCTAATGCAGTTAAGAGGAGCTGACCTCGTTAGAGACCAGCCACCC  
CCACATCCAATCCGCCACACTCCTAATAAGAGAGGAGGGAGGTTGATGATT  
AAATGACACGCATCTGGCATGCCCATCGGATTCCGAAGGGCAATTGAGCGT  
TCATGACTCATTGAATCCTGAATTCAGCTATCTAAAAATTTCAAATTTCACT  
GATTAACATAGAGTAAAATCA