

New hosts for *Desarmillaria caespitosa* and *Armillaria mexicana* in Veracruz and Michoacán, Mexico

Nuevos hospederos para *Desarmillaria caespitosa* y *Armillaria mexicana* en Veracruz y Michoacán, México

Dionicio Alvarado-Rosales¹; Rubén Damián Elías-Román^{2*}; Luz de L. Saavedra-Romero¹; Jeny Michua-Cedillo³; Salvador Ochoa-Ascencio⁴; John W. Hanna⁵; Ned B. Klopfenstein⁵; Mee-Sook Kim⁶; Patricia Rivas-Valencia⁷; Rafael Rojas-Rojas¹.

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Programa de Fitosanidad-Fitopatología. km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

²Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida (DICIVA), Departamento de Agronomía. Exhacienda El Copal, km 9 Carretera Irapuato-Silao. C. P. 36824. Irapuato, Guanajuato, México.

³Laboratorio de Análisis Fitosanitarios (LAFIT). Prolongación Mazatlán núm. 1533, col. La Magdalena. C. P. 60080. Uruapan, Michoacán, México.

⁴Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata. C. P. 60170. Uruapan, Michoacán, México.

⁵USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 1221 S. Main Street, Moscow, Idaho 83843, USA.

⁶USDA Forest Service, Pacific Northwest Research Station, 3200 SW Jefferson Way, Corvallis, Oregon 97331 USA.

⁷Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. km 13.5 carretera Los Reyes-Texcoco. C. P. 56250. Coatlinchán, Estado de México, México.

*Corresponding author: rd.elias@ugto.mx; tel.: +52 462 624 1889 ext. 5209.

Abstract

Introduction: The identification of *Armillaria* and *Desarmillaria* species associated with *Armillaria* root disease is important to determine management strategies, due to their variation in pathogenicity and virulence.

Objective: To identify *Desarmillaria/Armillaria* species associated with lychee (*Litchi chinensis* Sonn.), avocado (*Persea americana* Mill.), and pine (*Pinus* sp.) trees with symptoms and signs of *Armillaria* root disease.

Materials and methods: Root samples were collected from trees with signs and/or symptoms of *Armillaria* root disease from lychee trees in Veracruz, three avocado orchards in Michoacán, and a forest area in Michoacán. Eight fungal isolates were identified based on DNA sequences of the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) gene.

Results and Discussion: Based on *tef1* sequences, three isolates obtained from lychee trees in Veracruz were identified as *Desarmillaria caespitosa*; four isolates obtained from avocado trees and one from a pine tree in Michoacán were identified as *Armillaria mexicana*. Fungal isolates are deposited in the fungal culture collection of USDA Forest Service, RMRS, Moscow, Idaho, USA, and *tef1* sequences are deposited in GenBank.

Conclusions: This study represents the first reports of *D. caespitosa* on lychee in Veracruz and *A. mexicana* on avocado and pine trees in Michoacán, Mexico.

Keywords: *Persea americana*, *Litchi chinensis*, *Pinus* sp., root disease, *tef1* gene.

Resumen

Introducción: La identificación de las especies de *Armillaria* y *Desarmillaria* asociadas con la pudrición de raíces por *Armillaria* es importante para determinar estrategias de manejo, debido a su variación en patogenicidad y virulencia.

Objetivo: Identificar las especies de *Desarmillaria/Armillaria* asociadas con árboles de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.), aguacate (*Persea americana* Mill.) y pino (*Pinus* sp.) con síntomas y signos de la pudrición de raíces por *Armillaria*.

Materiales y métodos: Se colectaron muestras con signos y síntomas de la pudrición de raíces por *Armillaria* en árboles de litchi en Veracruz, en tres huertos de aguacate y en una zona forestal en Michoacán. Ocho aislamientos fúngicos se identificaron mediante la secuenciación del gen factor de elongación 1-alpha (*tef1*).

Palabras clave: *Persea americana*; *Litchi chinensis*; *Pinus* sp.; pudrición de raíces; gen *tef1*.

Resultados y Discusión: Con base en las secuencias de *tef1*, tres aislamientos de árboles de litchi en Veracruz se identificaron como *Desarmillaria caespitosa*; cuatro aislamientos de árboles de aguacate y uno de pino en Michoacán se identificaron como *Armillaria mexicana*. Los aislamientos fúngicos están depositados en la colección de hongos del Servicio Forestal del USDA, RMRS, Moscow, Idaho, EUA y las secuencias del *tef1* están depositadas en el GenBank.

Conclusion: Este trabajo constituye los primeros reportes de *Desarmillaria caespitosa* en litchi en Veracruz y *Armillaria mexicana* en aguacate y pino en Michoacán, México.

Introduction

The Armillaroid fungi have continued to undergo taxonomic revisions; among them, the incorporation of the genera *Guyanagaster* T. W. Henkel, M. E. Smith & Aime and *Desarmillaria* (Herink) R. A. Koch & Aime. The latter contains species without an annulus or ring in the basidiome stipe, which were previously grouped in the genus *Armillaria* (Fr.) Staude. *Armillaria* comprises approximately 40 species, some recently described (Elías-Román et al., 2008; Kim et al., 2022; Koch, Wilson, Séne, Henkel, & Aime, 2017).

Desarmillaria comprises three species, *D. tabescens* (Scop.) R. A. Koch & Aime and *D. ectypa* (Fr.) R. A. Koch & Aime both from Eurasia, along with the recently redescribed vicariant, *D. caespitosa* (Berk.) Antonín, J. E. Stewart & Medel, from the USA and Mexico (Antonín et al., 2021). The recently established taxonomic combination, *D. caespitosa* (basonym: *Lentinus caespitosus* Berk.), was previously reported as *Clitocybe tabescens* (Fr.) Bres. by Cohen (1955) and *Desarmillaria tabescens* by Miller et al. (2020) causing tree mortality in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) and peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) orchards, respectively in the southeastern USA. In Veracruz, Mexico, *D. caespitosa* has been reported as *Armillaria tabescens* (Scop.) Emel infecting araucaria tree (*Araucaria araucana* [Molina] K. Koch) in an urban area (Kim et al., 2010); however, *D. caespitosa* has not been previously documented in association with the lychee trees in the primary lychee-production area in Mexico (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesca [SIAP], 2019). The presence of *Armillaria* spp. has been reported affecting avocado (*Persea americana* Mill.) orchards in several municipalities in the state of Michoacán, which represents the main avocado-producing area in the world; however, the presence and identification of the *Armillaria* spp. has not been confirmed in a refereed journal (Hernández-Ramos, Moreno-Velázquez, López-Buenfil, Zelaya-Molina, & Elías-Román, 2018; Michua-Cedillo et al., 2016; Ordas-Ochoa, 2017).

Accurate identification of *Armillaria* and *Desarmillaria* species is critical because these species display diverse ecological behaviors and occupy disparate geographic areas. For example, these genera contain species that vary in pathogenicity and virulence (Cleary, van der Kamp, & Morrison, 2012; Kim et al., 2022; Nowakowska

Introducción

Los hongos del grupo Armillarioide han experimentado revisiones taxonómicas, entre ellas la incorporación de los géneros *Guyanagaster* T. W. Henkel, M. E. Smith & Aime y *Desarmillaria* (Herink) R. A. Koch & Aime. Esta última incluye especies sin un anillo en el estípite del basidioma, agrupadas previamente en el género *Armillaria* (Fr.) Staude. *Armillaria* comprende aproximadamente 40 especies, algunas de las cuales fueron descritas recientemente (Elías-Román et al., 2018; Kim et al., 2022; Koch, Wilson, Séne, Henkel, & Aime, 2017).

Desarmillaria comprende tres especies, *D. tabescens* (Scop.) R. A. Koch & Aime y *D. ectypa* (Fr.) R. A. Koch & Aime ambas de Eurasia, junto con *D. caespitosa* (Berk.) Antonín, J. E. Stewart & Medel, la vicariante descrita recientemente de EUA y México (Antonín et al., 2021). La combinación taxonómica establecida recientemente, *D. caespitosa* (basónimo: *Lentinus caespitosus* Berk.), fue reportada como *Clitocybe tabescens* (Fr.) Bres. por Cohen (1955) y *Desarmillaria tabescens* por Miller et al. (2020) causando mortalidad en huertos de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) y durazno (*Prunus persica* [L.] Batsch), respectivamente, en el sudeste de EUA. En Veracruz, México, *D. caespitosa* se ha reportado como *Armillaria tabescens* (Scop.) Emel infectando un árbol de araucaria (*Araucaria araucana* [Molina] K. Koch) en una zona urbana (Kim et al., 2010); sin embargo, *D. caespitosa* no se ha observado en asociación con árboles de litchi en la principal área productora de este frutal en México (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesca [SIAP], 2019). La presencia de *Armillaria* spp. se ha reportado afectando huertos de aguacate (*Persea americana* Mill.) en varios municipios de Michoacán, que representa la principal zona productora en el mundo; sin embargo, la presencia e identificación de *Armillaria* spp. no se ha confirmado ni documentado en una revista arbitrada (Hernández-Ramos, Moreno-Velázquez, López-Buenfil, Zelaya-Molina, & Elías-Román, 2018; Michua-Cedillo et al., 2016; Ordas-Ochoa, 2017).

La identificación precisa de las especies de *Armillaria* y *Desarmillaria* es crítica porque exhiben comportamientos ecológicos diversos y ocupan áreas geográficas distintas. Por ejemplo, estos géneros contienen especies que varían en patogenicidad y virulencia (Cleary, van der Kamp, & Morrison, 2012; Kim et al., 2022; Nowakowska et al., 2020); algunas son simbioses de

et al., 2020); some *Armillaria* and *Desarmillaria* species are symbionts of orchids (*Gastrodia elata* Blume) cultivated for medicinal purposes (Guo, Wang, Xue, Zhao, & Yang, 2016) and other fungi (*Polyporus umbellatus* [Pers.]) (Xing, Men, & Guo, 2017). Among other ecological functions, one species, *Armillaria altimontana* Brazee, B. Ortiz, Banik & D. L. Lindner, was reported as a potential biological control agent against a virulent species, *Armillaria solidipes* Peck. (Warwell et al., 2019).

Because *Armillaria* and *Desarmillaria* species associated with tree disease and mortality possess differences in virulence, host range, and climatic adaptation (potential geographic range), it especially is important to identify the pathogenic species to develop/apply appropriate disease management practices. Previously, the species of these genera were identified primarily by basidiomata morphology, but basidiomata are ephemeral, produced only sporadically depending on the environmental conditions, and some species may exhibit similar morphology. Biological species defined by interfertility also contributed to the identification process for *Armillaria* and *Desarmillaria* species (Anderson & Ullrich, 1979; Korhonen, 1978), but interfertility can be observed among disparate species that have been geographically separated (Heinzelmann et al., 2019; Klopfenstein et al., 2017). In recent decades, DNA sequences have been demonstrated to be especially useful for species identification of these genera (Heinzelmann et al., 2019). The sequences of translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) allow the identification of *Armillaria* species that cannot be identified by ribosomal DNA, such as internal transcribed spacer (ITS) with the 3' end of the large subunit (LSU), and the intergenic spacer 1 (IGS1) (3' LSU-IGS1) (Kim, Klopfenstein, Hanna, & McDonald, 2006; Klopfenstein et al., 2017). For the aforementioned reasons, the objective of this study was to identify the *Armillaria/Desarmillaria* species associated with hosts (lychee, avocado, and pine) with signs and/or symptoms of *Armillaria* root disease within or in close proximity to orchards of Veracruz and Michoacán, Mexico.

Materials and methods

Collection sites

During October and November 2019, surveys were conducted on a) trees of lychee variety 'Racimo Rojo' (average stem circumference at 40 cm above ground level = 48.5 cm; 15 years after plantation establishment) within orchard #1 (18.659528, -96.920972, 609 m) in Zacatal Chico, Zongolica, Veracruz; b) three orchards of avocado 'Hass' variety on rootstocks of the Mexican landrace *Persea americana* var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S. F. Blake, with trees of 3-3.5 m height and 4-5 years average age since establishment in Michoacán: orchard #2 (19.334982, -102.165026; 1 674 m); orchard

orquídeas (*Gastrodia elata* Blume) cultivadas con fines medicinales (Guo, Wang, Xue, Zhao, & Yang, 2016) y de otros hongos (*Polyporus umbellatus* [Pers.]) (Xing, Men, & Guo, 2017). Entre otras funciones ecológicas, *Armillaria altimontana* Brazee, B. Ortiz, Banik & D. L. Lindner fue reportada como agente potencial de control biológico contra la especie virulenta *Armillaria solidipes* Peck. (Warwell et al., 2019).

Debido a que las especies de *Armillaria* y *Desarmillaria* asociadas con la enfermedad y mortalidad de árboles poseen diferencias en virulencia, rango de hospedantes y adaptación climática (rango geográfico potencial), es especialmente importante la identificación de las especies patógenas para el desarrollo y aplicación de prácticas apropiadas de manejo de enfermedades. Anteriormente, las especies de dichos géneros se identificaban principalmente por la morfología de basidiomas, pero estos son efímeros, se producen esporádicamente según las condiciones ambientales y algunas especies pueden exhibir morfología similar. Las especies biológicas definidas por la interfertilidad contribuyeron al proceso de identificación de las especies de *Armillaria* y *Desarmillaria* (Anderson & Ullrich, 1979; Korhonen, 1978), pero también se puede observar interfertilidad entre especies separadas geográficamente (Heinzelmann et al., 2019; Klopfenstein et al., 2017). En las últimas décadas, las secuencias de ADN han demostrado ser útiles para la identificación de especies de estos géneros (Heinzelmann et al., 2019). Las secuencias del factor de elongación 1-alpha (*tef1*) permiten la identificación de especies de *Armillaria* que no pueden ser identificadas mediante ADN ribosómico, tales como espaciador transcrito interno (ITS) con el extremo 3' de la subunidad grande (LSU) y el espaciador intergénico 1 (IGS1) (3' LSU-IGS1) (Kim, Klopfenstein, Hanna, & McDonald, 2006; Klopfenstein et al., 2017). Por las razones antes mencionadas, el objetivo de este trabajo fue identificar las especies de *Desarmillaria/Armillaria* asociadas a hospederos (litchi, aguacate y pino) con signos y síntomas de pudrición de raíces por *Armillaria* dentro o cerca de huertos de Veracruz y Michoacán, México.

Materiales y métodos

Sitios de colecta

Durante octubre y noviembre del 2019 se inspeccionaron a) árboles de litchi 'Racimo Rojo' (48.5 cm de circunferencia promedio de tallo, a 40 cm sobre el nivel del suelo) en un huerto de 15 años de establecido (huerto #1: 18.659528, -96.920972, 609 m) en Zacatal Chico, Zongolica, Veracruz; b) tres huertos de aguacate 'Hass' injertado sobre portainjertos de la raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S. F. Blake, con árboles de 3 a 3.5 m de altura y alrededor de cuatro a cinco años edad promedio del

#3 (19.34375, -102.17336; 1 667 m) in La Escondida, Uruapan; and orchard #4 (19.384093, -102.18279; 2 115 m) located in Los Lobos, Nuevo Parangaricutiro, and c) a root of pine stump (unidentified *Pinus* species) in a forest area (19.38106, -102.18420, 2 052 m) adjacent to orchard #4 in Nuevo Parangaricutiro, Michoacán.

Sampling and isolation of *Armillaria/Desarmillaria*

Recently dead trees or trees with wilt symptoms were selected for sampling. The root system of the trees was inspected and excavated to observe signs (rotten wood, mycelial fans, rhizomorphs, and/or basidiomata) typical of *Armillaria* root disease (Figure 1). The fungus was isolated from infected roots of trees following the procedure described by Harrington, Worrall, and Baker (1992) in Benomyl-Dichloran-Streptomycin (BDS) medium, and incubated for 3-5 weeks at room temperature (20-26 °C). Subsequently, the fungal isolates were transferred to a nylon filter overlaying 3

establecimiento, localizados en Michoacán: huerto #2 (19.334982, -102.165026; 1 674 m) y huerto #3 (19.34375, -102.17336; 1 667 m) en La Escondida, Uruapan, y huerto #4 localizado en Los Lobos, Nuevo Parangaricutiro (19.384093, -102.18279; 2 115 m); y c) una raíz de un tocón de pino (especie de *Pinus* no identificada) en un área forestal (19.38106, -102.18420, 2 052 m) aledaña al huerto #4 en Nuevo Parangaricutiro, Michoacán.

Muestreo y aislamiento de *Armillaria/Desarmillaria*

Se muestrearon árboles muertos recientemente o con síntomas de marchitez. El sistema radical de cada árbol se excavó e inspeccionó con el propósito de observar signos típicos (madera podrida, abanicos miceliales, rizomorfos y basidiomas) de la pudrición de raíces por *Armillaria* (Figura 1). El hongo se aisló de raíces infectadas de árboles siguiendo el procedimiento descrito por Harrington, Worrall, y Baker (1992) en el medio Benomilo-Dicloran-Estreptomicina (BDS)

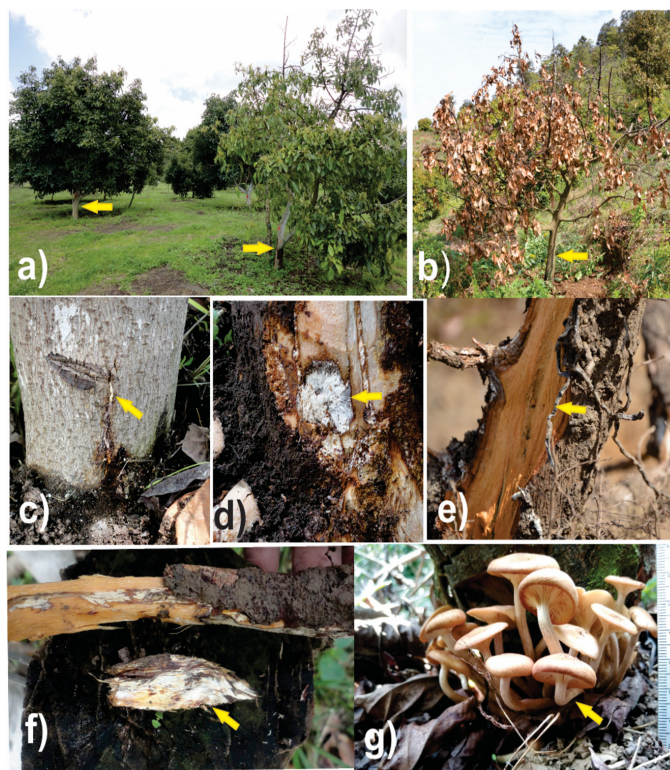


Figure 1. Symptoms and signs of *Armillaria* root disease in lychee (*Litchi chinensis*) and avocado (*Persea americana*). a) Avocado orchard with an asymptomatic tree and another symptomatic (chlorosis and decline) tree; b) Sudden mortality of an avocado tree; c) Cortical cracking with dark-colored exudate due to *Armillaria mexicana* infection near the base of avocado stem; d) Mycelial fan in symptomatic avocado tree crown; e) Rhizomorphs attached to an avocado root; f) Mycelial fan of *Desarmillaria caespitosa* on the root of a recently dead lychee tree; and g) *D. caespitosa* basidiomata on lychee tree base

Figura 1. Síntomas y signos de pudrición de raíces por *Armillaria* en litchi (*Litchi chinensis*) y aguacate (*Persea americana*). a) Huerto de aguacate con un árbol asintomático y otro sintomático (clorosis y declinación), b) muerte repentina de un árbol de aguacate, c) agrietamiento cortical con exudado color oscuro por infección de *Armillaria mexicana* cerca de la base del tallo de aguacate, d) abanico micelial en corona de raíz y base del tallo de árbol de aguacate sintomático, e) rizomorfos adheridos a una raíz de aguacate, f) abanico micelial de *Desarmillaria caespitosa* en raíz de árbol de litchi muerto recientemente y g) basidiomas de *D. caespitosa* en la base de un árbol de litchi.

% malt-agar medium to obtain abundant mycelial from which DNA was extracted.

Tef1 amplification, sequencing and sequence analyses

PCR amplification and sequencing of translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) gene followed the protocol of Elías-Román et al. (2018); and DNA sequences were manually edited and aligned with BioEdit 7.1 (Hall, 1999). Polymorphic sites were coded using the IUPAC codes for ambiguous nucleotides. Edited *tef1* sequences of isolates obtained from avocado, lychee, and pine trees were compared with sequences available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database using BLAST nucleotide search and deposited in GenBank. Isolates derived from mycelial fans were deposited at the USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station (RMRS), Forest Sciences Laboratory in Moscow, Idaho, USA.

Results and Discussion

Detection of Armillaria root disease

Eight isolates were obtained from mycelial fans of infected roots. The three isolates (Ver2, Ver4, and Ver5) that were collected from recently dead lychee trees of orchard #1, displayed cottony, whitish growth, without the presence of rhizomorphs in 3% malt-agar medium after approximately 4 weeks of culture. Four other isolates (Mich32, Mich35, Mich51, and Mich52) were obtained from recently dead and symptomatic 'Hass' avocado trees grafted on *P. americana* var. *drymifolia* rootstocks: The isolates Mich32 and Mich35 were collected from orchards #2 and 3, respectively, in La Escondida, Uruapan, Michoacán; isolates Mich51 and Mich52 were collected in orchard #4 in Los Lobos, Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Mich51 was isolated from an avocado tree with symptoms of decline and cortical cracking, with a dark-colored exudate near the base of the stem (Figures 1a, 1c, and 1d), and other isolates (Mich32, Mich35, and Mich52) were obtained from recently dead trees. Another isolate (Mich4) was obtained from a pine stump in an area adjacent to orchard #4 of avocado. Isolates obtained from avocado trees and pine stump formed crustose mycelium of variable color (light to dark brown) that produced abundant rhizomorphs, and culture exudates that produced a brown stain in the culture medium.

Tef1 sequence analyses

Three isolates (Ver2, Ver4, and Ver5) collected from roots (Figure 1f) of lychee trees from orchard #1 in Zongolica, Veracruz were identified as *D.caespitosa* based on 1215 bp sequences of *tef1* (GenBank accession numbers: MZ851975, MZ851976, and MZ851977 for

y se incubó por tres a cinco semanas a temperatura ambiente (20 a 26 °C). Posteriormente, los aislamientos fúngicos se transfirieron a un filtro de nailon sobre medio de malta-agar al 3 % para obtener micelio abundante del cual se extrajo el ADN.

Amplificación, secuenciación y análisis de secuencias del tef1

Para la amplificación por PCR y la secuenciación del gen factor de elongación 1-alpha (*tef1*) se siguió el protocolo descrito por Elías-Román et al. (2018); las secuencias de ADN se editaron y alinearon manualmente con BioEdit 7.1 (Hall, 1999). Los sitios polimórficos se codificaron empleando el código IUPAC para nucleótidos ambiguos. Las secuencias del *tef1* editadas de los aislamientos de árboles de aguacate, litchi y pino se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2021), utilizando la búsqueda de nucleótidos con BLAST y se depositaron en el GenBank. Los aislamientos derivados de abanicos miceliales se depositaron en el laboratorio de Ciencias Forestales, Estación de Investigación de las Montañas Rocosas del Servicio Forestal (RMRS), Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en Moscow, Idaho, EUA.

Resultados y discusión

Detección de la pudrición de raíces por Armillaria

Se obtuvieron ocho aislamientos de abanicos miceliales de raíces infectadas. Tres aislamientos (Ver2, Ver4 y Ver5) de árboles de litchi, muertos recientemente del huerto #1, mostraron crecimiento algodonoso y blanquecino, sin presencia de rizomorfos en el medio 3 % agar-malta después de aproximadamente cuatro semanas de cultivo. Otros cuatro aislamientos (Mich32, Mich35, Mich51 y Mich52) se obtuvieron de árboles de aguacate 'Hass' injertados en portainjertos de *P. americana* var. *drymifolia*, sintomáticos y muertos recientemente: Mich32 y Mich35 se colectaron de los huertos #2 y #3, respectivamente, en La Escondida, Uruapan, Michoacán, y los aislamientos Mich51 y Mich52 se colectaron en el huerto #4 en Los Lobos, Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. El aislamiento Mich51 se obtuvo de un árbol de aguacate con síntomas de declinación y agrietamiento cortical, con exudado color oscuro cerca de la base del tallo (Figuras 1a, 1c y 1d) y los aislamientos Mich32, Mich35 y Mich52 se obtuvieron de árboles muertos recientemente. Otro aislamiento (Mich4) se obtuvo de un tocón de pino en un área adyacente al huerto #4 de aguacate. Los aislamientos de árboles de aguacate y del tocón de pino formaron micelio crustoso de color variable (marrón claro a oscuro) que produjo rizomorfos abundantes y exudados que provocaron una tinción café en el medio de cultivo.

Ver2, Ver4 and Ver5, respectively), which displayed a very high similarity (99.7 %) with available *tef1* sequences in GenBank BLAST that were derived from *D. caespitosa* isolates, such as GenBank Accession No. MT232068 from isolate OOI-210 obtained from peach (Antonín et al., 2021). *Armillaria* root disease due to *D. caespitosa* (reported as *Clitocybe tabescens*) has been associated with the mortality of lychee trees, and management strategies were subsequently recommended, such as reducing inoculum sources, among other measures (Cohen, 1955). Volk & Burdsall (1995) previously considered *C. tabescens* as a synonym for *A. tabescens*; however, the North American vicariant of *A. tabescens* s. l. is currently recognized as *D. caespitosa* (Antonín et al., 2021).

The five isolates collected from avocado and pine were identified as *A. mexicana* R. Elías, Medel, Alvarado, Hanna, Ross-Davis, Kim, & Klopfenstein (Elías-Román et al., 2018) based on *tef1* sequences (GenBank Nos. MZ851978, MZ851979, MZ851980, MZ851981, and MZ851982 for isolated Mich4, Mich32, Mich35, Mich51, and Mich52, respectively). A *tef1* sequence length of 1 150 bp was obtained from isolate Mich32, and 1202 bp sequences were obtained from isolates Mich4, Mich35, Mich51, and Mich52. The GenBank nucleotide Blast displayed an extremely high similarity (99.9 %) for *tef1* from these five isolates with that of *A. mexicana* (GenBank Accession No. KR061313). This species, first reported as *Armillaria* sp., was previously found in Zinapécuaro, Michoacán causing mortality of peach and plum (reported as *Prunus domestica*) trees (Rivas-Valencia et al., 2017), and *A. mexicana* was also previously found to be pathogenic and more virulent than *A. mellea* (Vahl) P. Kumm on four *Prunus* spp. evaluated in greenhouse and field conditions in the State of Mexico (Elías-Román et al., 2019), where it was also previously reported on an oak (*Quercus* sp.) stump in a forest area (Elías-Román et al., 2018). Other investigations mentioned the presence of *A. mexicana* on trees of 'Hass' avocado grafted onto Mexican landrace seedling rootstocks; however, *tef1* sequences were not deposited in GenBank to allow verification of these previous identifications (Hernández-Ramos et al., 2018; Michua-Cedillo et al., 2016). Of note is that sequences of 3' LSU-IGS1 of ribosomal DNA in GenBank (Accession Nos. KU378660, KU378658, KU378657, KU378654, KU378655, KU378659) show high similarity with *A. mexicana* (GenBank Accession No. KR061306); however, those GenBank accessions are not associated with in any publication that discusses their origins. The 3' LSU-IGS1 region is useful in the identification of *A. mexicana* (Elías-Román et al., 2013), but it cannot distinguish among some *Armillaria* species such as *A. gallica* Marxm. & Romagn., *A. sinapina* Bérubé & Dessur. and *A. cepistipes* Velen. (Kim et al., 2006). Additionally, several *Armillaria* species have very diverse 3' LSU-IGS1 sequences that could not be aligned unambiguously for phylogenetic analysis.

Análisis de secuencias del *tef1*

Los aislamientos colectados de las raíces (Figura 1f) de árboles de litchi (Ver2, Ver4 y Ver5) del huerto #1 en Zongolica, Veracruz, se identificaron como *Desarmillaria caespitosa* con base en las secuencias de 1215 pb del *tef1* (GenBank accesiones en MZ851975, MZ851976 y MZ851977 para Ver2, Ver4 y Ver5, respectivamente), las cuales tuvieron similitud muy alta (99.7 %) con secuencias del *tef1* disponibles en GenBank BLAST que fueron derivadas de aislamientos de *D. caespitosa*, como la accesión del GenBank MT232068 del aislamiento OOI-210 obtenido de durazno (Antonín et al., 2021). La pudrición de raíces por *Armillaria* debido a *D. caespitosa* (reportada como *C. tabescens*), se ha asociado con la mortalidad de árboles de litchi y se han recomendado estrategias de manejo como la reducción de fuentes de inóculo, entre otras medidas (Cohen, 1955). Volk y Burdsall (1995) consideraron previamente a *C. tabescens* como sinónimo de *A. tabescens*; sin embargo, la vicariante norteamericana de *A. tabescens* s. l. es reconocida actualmente como *D. caespitosa* (Antonín et al., 2021).

Los cinco aislamientos colectados de aguacate y pino se identificaron como *A. mexicana* R. Elías, Medel, Alvarado, Hanna, Ross-Davis, Kim, & Klopfenstein (Elías-Román et al., 2018) con base en secuencias del *tef1* (accesión en GenBank con números MZ851978, MZ851979, MZ851980, MZ851981 y MZ851982 para los aislamientos Mich4, Mich32, Mich35, Mich51 y Mich52, respectivamente). La longitud de las secuencias del *tef1* fue de 1 150 pb para el aislamiento Mich32 y 1 202 pb para los aislamientos Mich4, Mich35, Mich51 y Mich52. El BLAST de nucleótidos del GenBank tuvo similitud extremadamente alta (99.9 %) en *tef1* para esos cinco aislamientos con el de *A. mexicana* (accesión en GenBank número KR061313). Esta especie, reportada por primera vez como *Armillaria* sp. se encontró en Zinapécuaro, Michoacán causando mortalidad de árboles de durazno y ciruelo (reportado como *Prunus domestica* L.) (Rivas-Valencia et al., 2017). Por otra parte, se demostró que *A. mexicana* fue patógena y más virulenta que *A. mellea* (Vahl) P. Kumm en cuatro especies de *Prunus* evaluados en condiciones de invernadero y campo en el Estado de México (Elías-Román et al., 2019), donde también *A. mexicana* fue reportada previamente en una zona forestal sobre un tocón de encino (*Quercus* sp.) (Elías-Román et al., 2018). Otras investigaciones mencionaron la presencia de *A. mexicana* en árboles de aguacate 'Hass' injertados sobre portainjertos mexicanos de semilla; sin embargo, las secuencias del *tef1* no se depositaron en el GenBank para permitir la verificación de estas identificaciones (Hernández-Ramos et al., 2018; Michua-Cedillo et al., 2016). Cabe destacar que las secuencias de 3' LSU-IGS1 del ADN ribosómico en el GenBank (accesiones KU378660, KU378658, KU378657, KU378654, KU378655 y KU378659) muestran similitud alta con *A. mexicana*

Climate-change projections suggest that *Armillaria* root disease will likely increase in areas where the climate will become less suitable for hosts, while remaining suitable for pathogens (Kim et al., 2021; Klopfenstein, Kim, Hanna, Richardson, & Lundquist, 2011). In addition, we consider that incidence and severity of *Armillaria* root disease could increase in several fruit-growing areas of Mexico due to multiple factors, such as 1) use of substrates contaminated with *Armillaria/Desarmillaria* propagules for plant propagation in nurseries; 2) change of land use (e.g., replacement of pine-oak forest with fruit orchards) that could promote the spread of pathogenic *Armillaria/Desarmillaria* species from previously occupied forested sites; 3) use of trees that are maladapted to the site or become maladapted due to climate change; and/or 4) other biotic and abiotic disturbances that create conditions suitable for *Armillaria* root disease.

Conclusions

Armillaria root disease in 'Hass' avocado trees on Mexican landrace rootstocks *Persea americana* var. *drymifolia* in orchards in Michoacán was associated with the presence of *A. mexicana*. This species was also isolated from a pine tree roots in a forest near avocado orchards, which could represent an inoculum source for infection in avocado orchards established in areas where the natural forest was cleared. In addition, *Desarmillaria caespitosa* was identified in association with *Armillaria* root disease of recently dead lychee trees in Zongolica, Veracruz. This study represents the first reports of *A. mexicana* causing *Armillaria* root disease on avocado and pine in Michoacán, and *D. caespitosa* causing *Armillaria* root disease on lychee in Veracruz. These results add to baseline information on the distribution and host associations of these *Armillaria* root disease pathogens.

Acknowledgements

All authors appreciate the funding provided by SENASICA (National Health, Safety and Food Quality Service) and USDA Forest Service, State and Private Forestry, Forest Health Protection, Region 5. We also thank Ing. Jaime Domínguez Pérez for allowing sample collection of lychee tree samples from orchard #1.

(accesión del GenBank KR061306); no obstante, dichas accesiones de GenBank no están asociadas con alguna publicación que discuta su origen. La región 3' LSU-IGS1 es de utilidad en la identificación de *A. mexicana* (Elías-Román et al., 2013), pero no permite distinguir entre algunas otras especies de *Armillaria*, como *A. gallica* Marxm. & Romagn., *A. sinapina* Bérubé & Dessur. y *A. cepistipes* Velen. (Kim et al., 2006). Adicionalmente, varias especies de *Armillaria* tienen secuencias 3' LSU-IGS1 muy diversas que no pueden alinearse sin ambigüedad para efectuar análisis filogenéticos.

Las proyecciones del cambio climático sugieren que, probablemente, la pudrición de raíces por *Armillaria* aumentará en zonas donde el clima será menos adecuado para los hospederos, pero seguirá siendo adecuado para los patógenos (Kim et al., 2021; Klopfenstein, Kim, Hanna, Richardson, & Lundquist, 2011). Además, la incidencia y severidad de la pudrición de raíces por *Armillaria* podrían multiplicarse en varias zonas frutícolas de México debido a los factores siguientes: 1) empleo de sustratos contaminados con propágulos de *Armillaria/Desarmillaria* en la propagación de plantas en viveros; 2) cambio de uso de suelo de bosque de pino-encino que podría promover la propagación de especies patógenas de *Armillaria/Desarmillaria* en huertos frutícolas recién establecidos; 3) uso de árboles que no se adaptan al sitio o se vuelven inadaptados debido al cambio climático; y 4) otras perturbaciones bióticas y abióticas que crean condiciones adecuadas para la pudrición de raíces por *Armillaria*.

Conclusiones

La pudrición de raíces por *Armillaria* en árboles de aguacate 'Hass' sobre portainjertos de raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* en huertos de Michoacán estuvo asociada con la presencia de *Armillaria mexicana*. Esta especie se aisló de raíces de un árbol de pino en un bosque cercano a huertos de aguacate, lo que podría representar una fuente de inóculo para la infección de estos en áreas donde el bosque natural fue talado. Además, *Desarmillaria caespitosa* se identificó en asociación con la pudrición de raíces por *Armillaria* en árboles de litchi muertos recientemente en Zongolica, Veracruz. Este trabajo representa los primeros reportes de *A. mexicana* causando la pudrición de raíces por *Armillaria* en aguacate y pino en Michoacán y *D. caespitosa* causando la pudrición de raíces por *Armillaria* en litchi en Veracruz. Dichos resultados complementan la información de referencia sobre la distribución y asociación de hospederos de estos patógenos de la pudrición de raíces por *Armillaria*.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento proporcionado por el SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad,

End of English version

References / Referencias

- Anderson, J. B., & Ullrich, R. C. (1979). Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia*, 71(2), 402–414. doi: 10.1080/00275514.1979.12021018
- Antonín, V., Stewart, J. E., Medel Ortiz, R., Kim, M.-S., Bonello, P., Tomšovský, M., & Klopfenstein, N. B. (2021). *Desarmillaria caespitosa*, a North American vicariant of *D. tabescens*. *Mycologia*, 113(4), 776–790. doi: 10.1080/00275514.2021.1890969.
- Cleary, M. R., van der Kamp, B. J., & Morrison, D. J. (2012). Pathogenicity and virulence of *Armillaria sinapina* and host response to infection in Douglas-fir, western hemlock and western redcedar in the southern Interior of British Columbia. *Forest Pathology*, 42(6), 481–491. doi: 10.1111/j.1439-0329.2012.00782.x
- Cohen, M. (1955). Clitocybe rot of lychee trees. *Florida State Horticultural Society*, 68, 329–332.
- Elías-Román, R. D., Calderón-Zavala, G., Guzmán-Mendoza, R., Vallejo-Pérez, M. R., Klopfenstein, N. B., & Mora Aguilera, J. A. (2019). 'Mondragon': a clonal plum rootstock to enhance management of *Armillaria* root disease in peach orchards of Mexico. *Crop Protection*, 121, 89–95. doi: 10.1016/j.cropro.2019.03.011
- Elías-Román, R. D., Guzmán-Plazola, R. A., Klopfenstein, N. B., Alvarado-Rosales, D., Calderón-Zavala, G., Mora-Aguilera, J. A., ...García-Espinosa, R. (2013). Incidence and phylogenetic analyses of *Armillaria* spp. associated with root disease in peach orchards in the State of Mexico, Mexico. *Forest Pathology*, 43(5), 390–401. doi: 10.1111/efp.12043
- Elías-Román, R. D., Medel, R., Klopfenstein, N. B., Hanna, J. W., Kim, M. S., & Alvarado-Rosales, D. (2018). *Armillaria mexicana* (Agaricales, Physalacriaceae), a newly described species from Mexico. *Mycologia*, 110(2), 347–360. doi: 10.1080/00275514.2017.1419031
- Guo, T., Wang, H. C., Xue, W. Q., Zhao, J., & Yang, Z. L. (2016). Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLoS ONE*, 11(5), e0154794, doi: 10.1371/journal.pone.0154794
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/ 98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harrington, T. C., Worrall, J. J., & Baker, F. A. (1992). *Armillaria*. In L. L. Singleton, J. D. Mihail, & C. M. Rush (Eds.), *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. (pp. 81–85). St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Heinzelmann, R., Dutech, C., Tsykun, T., Labbé, F., Soularue, J.-P., & Prospero, S. (2019). Latest advances and future perspectives in *Armillaria* research. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(1), 1–23. doi: 10.1080/07060661.2018.1558284
- Hernández-Ramos, L., Moreno-Velázquez, M., López-Buenfil, J. A., Zelaya-Molina, L. X., & Elías-Román, R. D. (2018). Identificación molecular de aislamientos de *Armillaria* sp. de aguacate en Michoacán. *Revista Mexicana de Inocuidad y Calidad Alimentaria*) y el Servicio Forestal del USDA, Silvicultura Estatal y Privada, Protección de Salud Forestal, Región 5. También, agradecemos al Ing. Jaime Domínguez Pérez por permitir la colecta de muestra de árboles de litchi del huerto #1.

Fin de la versión en español

- Fitopatología*, 36, S5-6. Retrieved from <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen362018/S362018.pdf>
- Kim, M.-S., Hanna, J. W., Stewart, J. E., Warwell, M. V., McDonald, G. I., & Klopfenstein, N. B. (2021). Predicting present and future suitable climate spaces (potential distributions) of and *Armillaria* root disease pathogen (*Armillaria solidipes*) and its host, Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), under changing climates. *Frontiers in Forests and Global Change*, 4, 740994. doi: 10.3389/ffgc.2021.740994
- Kim, M.-S., Heinzelmann, R., Labbé, F., Ota, Y., Elías-Román, R. D., Pildain, M. B., ... Klopfenstein, N. B. (2022). *Armillaria* root diseases of diverse trees in wide-spread global regions. In F. O. Asiegbo, & A. A. Kovalchuk (Eds.), *Forest microbiology forest tree health* (vol. 2, pp. 361–378). London, UK: Academic Press (Elsevier). doi: 10.1016/B978-0-323-85042-1.00004-5
- Kim, M. -S., Klopfenstein, N. B., Hanna, J. W., Cannon, P., Medel, R., & López, A. (2010). First report of *Armillaria* root disease caused by *Armillaria tabescens* on *Araucaria araucana* in Veracruz, México. *Plant Disease*, 94(6), 784. doi: 10.1094/PDIS-94-6-0784B
- Kim, M.-S., Klopfenstein, N. B., Hanna, J. W., & McDonald, G. I. (2006). Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology*, 36(3), 145–164. doi: 10.1111/j.1439-0329.2006.00441.x
- Klopfenstein, N. B., Kim, M. -S., Hanna, J. W., Richardson, B. A., & Lundquist, J. E. (2011). Approaches to predicting potential impacts of climate change on forest disease: An example with *Armillaria* root disease. In D. M. Chavarriga H. (Ed.), *Protección fitosanitaria forestal* (pp. 101–117). Colombia: Divegraficas Ltda.
- Klopfenstein, N. B., Stewart, J. E., Ota, Y., Hanna, J. W., Richardson, B. A., Ross-Davis A. L., ...Kim, M. -S. (2017). Insights into the phylogeny of Northern Hemisphere *Armillaria*: neighbor-net and Bayesian analyses of translation elongation factor 1-1 gene sequences. *Mycologia*, 109(1), 75–91. doi: 10.1080/00275514.2017.1286572
- Koch, R. A., Wilson, A. W., Séné, O., Henkel, T. W., & Aime, C. (2017). Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster*. *BMC Evolutionary Biology*, 17, 33. doi: 10.1186/s12862-017-0877-3
- Korhonen, K. (1978). Interfertility and clonal size in the *Armillaria mellea* complex. *Karstenia*, 18(2), 31–42. doi: 10.29203/ka.1978.135
- Michua-Cedillo, J., Teliz-Ortiz, D., Ochoa-Ascencio, S., Rodríguez-Guzmán, M. P., Alarcón, A., De León, C., & Vázquez-Marrufo, G. (2016). *Armillaria gallica* agente causal de la pudrición de raíz y muerte de árboles de aguacate en Michoacán, México. Retrieved from <https://docplayer.es/168754986-Armillaria-gallica-agente-causal-de-la-pudricion-de-raiz-y-muerte-de-arboles-de-aguacate-en-michoacan-mexico-resumen.html>
- Miller, S. B., Gasic, K., Reighard, G. L., Henderson, W. G., Rollins, P. A., Vassalos, M., & Schnabel, G. M. (2020). Preventative root-collar excavation reduces peach tree mortality caused by *Armillaria* root rot on replant sites. *Plant Disease*, 104(5), 1274–1279. doi: 10.1094/PDIS-09-19-1831-RE
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2021). Basic Local Alignment Search Tool-Gen Bank overview. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Nowakowska, J. A., Stocki, M., Stocka, N., Slusarski, S., Tkaczyk, M., Caetano, J. M., ... Oszako, T. (2020). Interactions between *Phytophthora cactorum*, *Armillaria gallica* and *Betula pendula* Roth. Seedlings subjected to defoliation. *Forest*, 11(10), 107. doi: 10.3390/f11101107
- Ordas-Ochoa, J. A. (2017). Identificación genética y patogénica de especies de *Armillaria* (Vahl.:Fr.) Karsten asociadas a *Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schlttdl. y Cham) S. F. Blake. Tesis de Maestría, Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Retrieved from http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2072
- Rivas-Valencia, P., Almaraz-Sánchez, A., Cano-Salgado, A., Hernández-Ramos, L., Alanís-Martínez, I., & Fernández-Montes, M. R. (2017). Muerte descendente de *Prunus* sp. asociada a *Armillaria* spp. en huertas comerciales de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 463–475. doi: 10.18781/r.mex.fit.1702-1
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Anuario estadístico de la producción agrícola. Retrieved from <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Volk, T. J., & Burdsall, H. H. Jr. (1995). *A nomenclatural study of Armillaria and Armillariella species (Basidiomycotina, Tricholomataceae)*. Oslo, Norway: Fungiflora.
- Warwell, M. V., McDonald, G. I., Hanna, J. W., Kim, M.-S., Lalande, B. M., Stewart, J. E., & Klopfenstein, N. B. (2019). *Armillaria altimontana* is associated with healthy western white pine (*Pinus monticola*) planted in northern Idaho: Evidence for *in situ* biological control of *A. solidipes*. *Forests*, 10(4), 294. doi: 10.3390/f10040294
- Xing, X., Men, J., & Guo, S. (2017). Phylogenetic constrains on *Polyporus umbellatus*-*Armillaria* associations. *Scientific Reports*, 7, 4226. doi: 10.1038/s41598-017-04578-9

