

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL MEZQUITE (*Prosopis laevigata* L.) EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA DEL VALLE DE ZAPOTITLÁN, MÉXICO

ETIOLOGY OF MESQUITE DIEBACK (*Prosopis laevigata* L.) IN THE BIOSPHERE RESERVE OF ZAPOTITLÁN VALLEY, MÉXICO

Rodolfo De La Torre-Almaráz^{*1}, F. Maribel Cota-Trujillo¹, J. Lilia García-Rojas¹, Jorge E. Campos¹, Felipe San-Martín²

¹Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Laboratorio de Microbiología. UNAM. 54090. Tlalnepantla, Estado de México, México. ²BIOTA A. C. Sierra Sosa # 617 Fr. Villa Real. 87027. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. (droldolfo@servidor.unam.mx)

RESUMEN

En 2001, plantas de mezquite (*Prosopis laevigata* L.) con muerte descendente de ramas, fueron observadas en la reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla (18° 15' N y 97° 25' O). Sobre las ramas con daños se desarrolló un hongo de color pardo claro que produjo conidióforos y conidios hialinos, verdosos, elipsoides con un extremo truncado. En el estroma pulvinado y aglomerado hubo masas de peritecios negros conspicuos y globosos. Las ascosporas son pardo-oscuro, unicelulares, elipsoides desiguales, con extremos redondeados y un tubo germinativo a lo largo de la espora. Las perisporas fueron dehiscentes en tratamiento con KOH (10 %) y la epispora lisa y enrollada. El hongo fue identificado como *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm y su anamorfo como una especie del tipo *Nodulosporium*. Los síntomas de muerte descendente fueron inducidos en plantas de mezquite producidas en el invernadero, con inoculación en tallos por inserción de palillos de madera colonizados con micelio y peritecios del hongo, 15 d después de la inoculación. La caracterización molecular por secuencias nucleotídicas de la región ITS1-ITS2 de *H. diatrypeoides* de México (No. de acceso AY303629) confirmó su ubicación taxonómica dentro de la familia Xilareaceae, relacionándose con especies reportadas sólo en Sudamérica y el sur de Asia.

Palabras clave: Patosistemas silvestres, tierras áridas, xylariales.

INTRODUCCIÓN

El género *Prosopis* en México se conoce con el nombre común de mezquite, que proviene del náhuatl micuitl, y que probablemente los aztecas le dieron a estas plantas (Granados, 1996). Este género contiene poco más de 40 especies nativas de regiones áridas y semiáridas de Norte y Sudamérica, África y Asia, con individuos desde 40 cm hasta 20 m de altura, pudiendo crecer en zonas con lluvias menores a los 100 mm anuales y soportando en verano

ABSTRACT

During 2001, branch dieback (*Prosopis laevigata* L.) was observed on mesquite plants in the Tehuacan-Cuicatlán biosphere reserve, Puebla, México (18° 15' N and 97° 25' W). Developing on damaged branches was a light brown fungus tissue that produced conidiophores and hyaline conidia, greenish in mass, ellipsoid with one truncate tip and glomerate to pulvinate stromata with conspicuous perithecial mounds, black surface, and globose perithecia. Ascospores were dark-brown, single-celled, non-equilateral ellipsoid with rounded tips and a germination tube along the spore. Perisporas were dehiscent in 10 % KOH and had coiled, smooth epispore. The fungus was identified as *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm and its anamorph as a *Nodulosporium*-type species. Branch dieback symptoms were induced in mesquite plants produced in a greenhouse by inoculating branches with a wooden toothpick colonized with fungus mycelia and perithecia and inserted through a permanent wound. Symptoms appeared 15 days after the inoculation. The nucleotide sequence of the ITS1-ITS2 region of this *H. diatrypeoides* isolate from México (Accession No. AY303629) confirmed that taxonomically it belongs to the Xilareaceae family and was related to species previously reported only in South America and South Asia.

Key words: Wild plant pathosystems, arid lands, xylariales.

INTRODUCTION

The genus *Prosopis* in México is known by the common name mesquite, from the Nahuatl word "micuitl", a name the Aztecs gave to these plants (Granados, 1996). The genus comprises a little over 40 species native to arid and semiarid regions of North and South America, Africa, and Asia. They vary from 40 cm to 20 m and can grow in areas with less than 100 mm of annual rainfall, withstanding average maximum summer temperatures of more than 40 °C. Mesquite is a very important resource in arid and semiarid regions of the world; its wood is used for fuel and fences, its pods serve as forage and human food, it

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Octubre, 2007. Aprobado: Diciembre, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 197-208. 2009.

temperaturas máximas promedio superiores a 40 °C. El mezquite es un recurso natural con importancia económica en las regiones áridas y semiáridas del mundo, ya que su madera es usada como combustible, para construcción de cercas, sus vainas como forraje y como alimento para el hombre; produce resina que tiene uso en la fabricación de pegamentos, barnices, mientras sus flores son importantes en la producción de miel (Buckart, 1976; Hernández, 1992).

En México hay 10 especies de mezquite: *Prosopis palmeri*, *P. reptans* var. *cineroscens*, *P. pubescens*, *P. articulata*, *P. laevigata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *tipica*, *P. glandulosa* var. *torreyana* y *P. mexicanum*. En las regiones altas y semiáridas de los Valles Centrales de México se distribuye principalmente *P. laevigata* (Rzedowski, 1988).

Grandes poblaciones de *P. laevigata* forman parte importante de la flora nativa en el Valle de Zapotitlán, en el estado de Puebla, las cuales están en las partes bajas y en los márgenes de los ríos y arroyos del Valle, ocupando una superficie aproximada de 4000 ha (Dávila *et al.*, 1993). En la región se han observado diversas clases de daños o enfermedades que afectan a numerosas plantas *P. laevigata*; una de estas enfermedades causa una pudrición seca, negra, así como defoliación de ramas jóvenes y tiernas, y su muerte. Los daños causados por esta enfermedad se inician en la parte apical de las ramas jóvenes, avanzando hacia el centro del árbol, por lo que en el presente trabajo, este daño es descrito como muerte descendente (Figura 1A). Otro daño común en las ramas secundarias se caracteriza por la presencia de manchas redondas o alargadas, negras opacas y aspecto húmedo que causan el rompimiento y desintegración de la corteza, de la cual escurre abundante goma o resina de color rojizo; por tanto, esta enfermedad fue denominada resinosis de ramas (Figura 1B).

La muerte descendente y resinosis de las ramas son particularmente más intensas en sitios con exceso de sombra y húmedos (Obs. pers.). En México se desconocen los agentes causales que originan estos daños en mezquite; sin embargo, evidencia preliminar obtenida en nuestro laboratorio indicó que estas enfermedades probablemente eran causadas por alguna clase de hongos. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la etiología de los síntomas de la muerte descendente y resinosis que afectan al mezquite (*P. laevigata*) en el Valle de Zapotitlán, Puebla, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de recolecta de muestras

El Valle de Zapotitlán está en la porción suroeste del estado de Puebla (18° 20' N y 97° 'O) y está considerado como una de las



Figura 1. Daños en ramas y tronco de mezquite (*P. laevigata*) observados en la Reserva de la Biosfera de Zapotitlán en el estado de Puebla, México. A) Muerte descendente en ramas. B) Resinosis en ramas.

Figure 1. Damage in mesquite (*P. laevigata*) branches and trunk observed in the Zapotitlán Biosphere Reserve in the state of Puebla, México. A) Dieback in branches, B) Resinosis in branches.

has uses in the fabrication of adhesives and varnishes, while its flowers are important in honey production (Gómez, 1970; Buckart, 1976; García-Moya, 1986; Hernández, 1992).

In México there are ten species and three varieties of mesquite (*P. palmeri*, *P. reptans* var. *cineroscens*, *P. pubescens*, *P. articulata*, *P. laevigata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *tipica*, *P. glandulosa* var. *torreyana* y *P. mexicanum*). In the high, semiarid regions of the Central Valleys of México, *P. laevigata* is most common (Rzedowski, 1988).

Large populations of this species of mesquite are a major part of the native flora in the Zapotitlán Valley in the state of Puebla. Distributed in the lower parts of the valley and along rivers and streams, these populations cover an area of approximately 4000 ha (Dávila *et al.*, 1995). Several types of damage, or diseases, have been observed affecting numerous *P. laevigata* plants. One of these diseases causes a black dry rot and defoliation of young and tender branches, leading to death of the plant. Damage caused by this disease begins at the apex of young branches, progressing toward the center of the tree; thus the damage is described as “dieback” (Figure 1A). Another type of damage commonly observed is seen on secondary branches as round or elongated spots, muted black in color and moist-looking. These cause breakage or disintegration of the bark from which reddish gum or resin oozes abundantly. Hence, we denominated this disease as branch resinosis (Figure 1B).

reservas naturales con la mayor riqueza, diversidad y endemismo florístico en el mundo (Dávila *et al.*, 1993). El clima en la región es semiárido del tipo BShw^w(e)g con una precipitación media anual de 380 mm, una temperatura media anual de 21.4 °C (16.5 °C en enero y 24.2 °C en mayo). El principal tipo de vegetación en la zona es el matorral xerófilo, donde el mezquite es una de las especies vegetales dominantes ocupa un extenso territorio en la zona (Dávila *et al.*, 1993; Valiente *et al.*, 2001).

Del 2001 al 2004 en recorridos en las poblaciones de mezquite en el Valle de Zapotitlán, fueron recolectadas ramas y trozos de troncos de mezquite con los síntomas de muerte descendente y resinosidad de ramas, usando tijeras de podar o serruchos. El material recolectado fue etiquetado, colocado en bolsas de papel encerado (20×40 cm) y trasladado al Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores, Iztacala UNAM para herborización (Lot y Chiang, 1986) y análisis fitopatológico (Király *et al.*, 1974). En el herbario de la FES-Iztacala (FESI) y en el herbario R. H. Miller de la Universidad de Georgia, Athens, EE. UU. fueron depositadas y registradas muestras de 100 g de material previamente tratado a 45-50 °C, en donde puede ser requerido para su consulta.

Aislamiento de hongos a partir de tejido de mezquite con síntomas

Fragmentos (1 cm largo) de madera de mezquite con síntomas, recién recolectado en campo, fueron recolectados y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 2 %; se lavaron con agua destilada estéril y colocaron en papel filtro estéril en una cámara de flujo laminar hasta eliminar el exceso de humedad. Cada trozo de material desinfectado y seco se cortó en fragmentos más pequeños (aproximadamente 3 mm largo), y usando pinzas de disección estériles se colocaron al centro de una caja petri con medio de papa dextrosa agar (PDA). Las cajas con los distintos tipos de materiales de mezquite infectado estuvieron en una cámara incubadora a 37 °C o a temperatura de laboratorio (18 °C) hasta por 30 d. Las colonias obtenidas después de los periodos de incubación se transfirieron a nuevas cajas petri con medio de cultivo PDA fresco, procedimiento repetido hasta obtener un solo tipo de colonia (Király *et al.*, 1974).

Aislamiento de hongos del tejido de mezquite con signos

Se realizaron cortes de los tejidos dañados y con signos usando una hoja de rasurar de doble filo. Los cortes se montaron en portas y cubreobjetos en un microscopio estereoscópico utilizando agua destilada estéril o solución de azul de lactofenol. En algunas preparaciones se utilizó el reactivo de yodo para destacar algunos detalles estructurales típicos de importancia taxonómica y la solución KOH al 10 %.

Parte de las estructuras fúngicas (micelio, cuerpos fructíferos o esporas) encontradas en la superficie del material de mezquite con síntomas se transfirieron directamente a cajas petri con medio PDA, incubándolas a 37 °C o a temperatura de laboratorio (18 °C) (Király

Dieback and branch resinosis are particularly intense in sites that are excessively shaded and humid. In México the causes and conditions that originate these symptoms in mesquite are unknown. However, preliminary evidence obtained from a laboratory sample indicates that these diseases are probably caused by some type of fungus. Therefore, this study was conducted to determine the etiology of the diseases dieback and resinosis, which affect mesquite in the Valley of Zapotitlán, Puebla, México.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection site

The Valley of Zapotitlán is located in the southeastern part of the State of Puebla (18° 20' N y 97° W'), considered one of the natural reserves of greatest floristic wealth, diversity and endemism in the world. The region's climate is semiarid (BShw^w(e)g) with mean annual precipitation of 380 mm and mean annual temperature of 21.4 °C, which oscillates between 16.5 °C in January and 24.2 °C in May. The main vegetation type is xerophyll scrub and mesquite is one of the dominant species occupying an extensive part of the region (Dávila *et al.*, 1999; Valiente *et al.*, 2001).

From 2001 to 2004, inspections of the mesquite populations in the Zapotitlán Valley were undertaken, and branches and pieces of mesquite trunk with symptoms of dieback and branch resinosis were collected with pruning shears or saws. The collected material was labeled, placed in waxed paper bags (20×40 cm) and taken to the laboratory for herborization (Lot and Chiang, 1986) and phytopathological analysis (Király *et al.*, 1974). One-hundred-g samples of the collected material previously treated at 45-50 °C were deposited and registered in the herbarium of the FES-Iztacala (FESI) and R.H. Miller Herbarium at the University of Georgia, Athens, USA., for reference.

Isolation of the fungi from mesquite tissue exhibiting symptoms

Fragments (1 cm long) were cut from fresh mesquite wood exhibiting symptoms. The fragments of material recently collected in the field were disinfected with a 2 % sodium hypochlorite solution, washed with sterile distilled water, and placed on sterile filter paper in a laminar flow chamber to eliminate excess moisture. Each piece of dry disinfected material was cut into smaller fragments approximately 3 mm long. With sterile forceps, the small fragments were placed in the center of Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), and the dishes with the different types of infected mesquite material were kept in an incubating chamber at 37 °C or at room temperature (18 °C) for up to 30 days. The colonies obtained after incubation were transferred to new Petri dishes with fresh culture medium. This procedure was repeated several times until a colony of a single fungus type was obtained (Király *et al.*, 1974).

et al., 1974). Los hongos aislados en los medios de cultivo artificial se observaron con un microscopio compuesto (Carl Zeiss), se anotaron todas sus características morfológicas, así como el color y tamaño de sus estructuras, utilizando la escala micrométrica del ocular ajustado con un micrometro objetivo (0-1mm/100, Nikon).

Pruebas de patogenicidad

Vainas sanas de algunos árboles de mezquite fueron recolectados para obtener semillas maduras, las cuales se sembraron en almácigos con una mezcla estéril de arena, tierra de hoja y negra (2:1:1 v/v). Las plántulas fueron transplantadas a macetas (1 L de capacidad) y mantenidas en invernadero hasta una altura de 30 a 40 cm, lo que ocurrió aproximadamente cinco meses después de la siembra.

Para la inoculación e inducción de los síntomas observados en mezquite en campo, se utilizó el método de inoculación de palillos de madera colonizado con micelio y cuerpos fructíferos del organismo que fue el más frecuente para aislar del material enfermo (Mengistu *et al.*, 1996), co-cultivados en medio de PDA mejorado con 10 % de cloruro de calcio, donde se obtuvo abundante micelio y cuerpos fructíferos y esporas.

Durante el verano de 2002 se hicieron pruebas de patogenicidad en invernadero (25°-35 °C) usando tres plantas jóvenes de mezquite (25 cm altura) producidas desde semilla en el invernadero, por tratamiento. Los tratamientos fueron: 1) inoculación de ramas con inserción de un palillo de madera, colonizado con micelio y peritecios del hongo en medio V8-agar; 2) aspersión de ascosporas en ramas heridas con un palillo de madera estéril; 3) aspersión de ascosporas en ramas sin herir; 4) plantas heridas sin aplicación de inóculo; 5) plantas inoculadas sin heridas. Cuando aparecieron síntomas en las plantas inoculadas se realizaron re-aislamientos del patógeno en medios de cultivos y se comparó con el aislamiento original. Se realizaron tres pruebas de patogenicidad con el mismo número de plantas y tratamientos por prueba.

Caracterización molecular por secuenciación y análisis filogenético de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se obtuvo ADN de 0.100 mg de esporas separadas de los cuerpos fructíferos encontrados en las ramas de mezquite enfermas, utilizando el reactivo de DNazol y siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogene, USA). Se obtuvo ADN total por el método de Dellaporta *et al.* (1983) con 1 g de micelio del hongo aislado del material enfermo de mezquite del *H. diatrypeoides* cultivado en caldo de papa-dextrosa (15 %) por 15 d. Se realizó el ensayo de la PCR para la amplificación de las regiones intergenéticas transcripcionales (ITS1-ITS2) del componente ADN 18S ribosomal de hongos (Lee y Taylor, 1990; Mugnier, 1998; Sogin, 1990). Los oligonucleótidos utilizados fueron ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1999). El programa de amplificación consistió de: 1 ciclo 95 °C, 1 min; 30 ciclos a 95 °C, 1 min, 57 °C, 1 min, 72 °C, 1 min; 1 ciclo a 72 °C, 12 min.

Isolation of fungi from mesquite tissue exhibiting signs

Sections of damaged tissues and signs were performed with a double edged razor under a stereoscopic microscope. Microscope slides were mounted with sterile distilled water or solution of Lactophenol Blue. In some of the preparations iodine reactive and a 10 % KOH solution were used to highlight typical structural details of taxonomic importance.

Part of the fungus structures (mycelia, fruiting bodies or spores) found on the surface of the mesquite material with symptoms were transferred directly to Petri dishes containing PDA medium and incubated at 37 °C or room temperature (18 °C) (Király *et al.*, 1974). The fungi isolated in the artificial culture mediums were observed under a compound microscope (Carl Zeiss), and all of their morphological characteristics as well as color and size of their structures were recorded.

Pathogenicity tests

Healthy pods were collected from mesquite trees and mature seeds were obtained. These were sown in seed beds with a sterile mixture of sand, decomposed forest litter and black earth (2:1:1 v/v). The seedlings obtained were transplanted to 1 L pots and kept in a greenhouse until they reached a height of 30 to 40 cm, approximately 5 months after sowing.

For inoculation and induction of symptoms, the method used was wooden toothpicks colonized with mycelium and fruiting bodies of the organism that was most frequently isolated from the diseased material and co-cultivated in PDA medium improved with 10 % calcium chloride (Mengistu *et al.*, 1996), with which abundant mycelia and fruiting bodies and spores were obtained.

During the summer of 2002, pathogenicity tests were conducted in a greenhouse (25-35 °C) using young mesquite plants (25 cm tall) produced from seed in the greenhouse. Three plants were used per treatment, which were (1) inoculation of branches by insertion of a wooden toothpick colonized with mycelia and perithecia of the fungus cultured in V8-agar medium, (2) spraying ascospores on branches previously injured with a sterile wooden toothpick, (3) spraying ascospores on branches without injury, (4) injured plants with no application of the inoculum, (5) inoculated plants without lesions. When symptoms appeared on inoculated plants, re-isolation of the pathogen was performed in culture media and compared with the original isolation. Three pathogenicity tests were performed with the same number of plants and treatments in each test.

Molecular characterization by sequencing and phylogenetic analysis of products of polymerase chain reaction (PCR)

We obtained 0.100 mg of DNA from fruiting bodies found in the diseased mesquite branches using DNazol (Invitrogene, USA.). Total DNA of *H. diatrypeoides* was obtained by the Dellaporta (1983) method from 1 g of mycelia of the fungus isolated from diseased material and cultivated in PDA (15 %) for 15 days. The polymerase chain reaction (PCR) assay was performed to amplify intergenetic

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % en solución amortiguadora de boratos pH 8.0, teñidos con bromuro de etidio para su documentación. Los productos de PCR fueron purificados con el método de Exo-sap-IT (Invitro Gene, USA) o tomados directamente del gel y purificados con Wizar SV (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron secuenciados directamente en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, USA). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se depositaron en el GenBank para obtener su número de acceso, y se compararon con las disponibles en ese mismo banco de datos (NCBI, 1999), usando el método de Blast. Las secuencias fueron alineadas a ojo con MacClade 4.06 (Maddison y Maddison, 2003). El análisis de búsquedas parsimoniosas se realizó con el programa Paup versión 4.0b10 (Swofford, 2002) usando el comando PRAP (Müller, 2004) con 10 réplicas de adiciones aleatorias de taxón y el barrido con "tree-bisection-reconnection" (TBR), con las opciones "steepest descent" y "multiple tree" sin efecto. Los "gaps" fueron tratados como datos perdidos. El soporte estadístico fue medido con la prueba no paramétrica Bootstrap implementada en PAUP. Las proporciones del Bootstrap se basaron en 10 000 réplicas usando el método "simple-taxon-addition tree" de forma inicial; las opciones TBR "steepest descent" y "multiple tree" options quedaron sin efecto. Búsquedas heurísticas más intensas no aumentaron la fiabilidad del análisis Bootstrap (Müller, 2005). Aquellos nodos que reportaron niveles BP >70 % se consideraron estadísticamente significativos (Hillis y Bull, 1993). El dendrograma final fue construido usando el programa "TreeGraph" (Müller y Müller, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, cultivo e identificación de hongos

En medio de cultivo artificial de PDA se logró aislar un hongo de los fragmentos de tejidos con los síntomas de muerte descendente y resinosidad de ramas de mezquite que crece en forma natural en el Valle de Zapotitlán, Puebla, México. El hongo aislado desarrolló una colonia micelial blanquecina y aspecto algodonoso al principio, observándose posteriormente anillos concéntricos, adquiriendo una coloración ligeramente verdosa y al final pardo claro. Después de dos semanas de crecimiento aparecieron en toda la caja petri conglomerados de micelio que formaron cuerpos globosos oscuros, en cuyo interior había ascas y ascosporas similares a las encontradas en los tejidos afectados con la enfermedad de muerte descendente. La observación directa de signos en las ramas de mezquite con muerte descendente permitió encontrar en forma natural una masa micelial pardo claro que contenía conidióforos y conidios hialinos, con forma elipsoidal y un extremo truncado, con medidas de 5.14-6.66×4.13-4.86 mm (Figura 2). Por sus características morfológicas fue identificado como un hongo del tipo *Nodulosporium* (Barnett y Hunter, 1998).

transcriptionals (ITS1-ITS2) from the fungus DNA ribosomal component 18S (Lee and Taylor, 1990; Mugnier, 1998; Sogin, 1990). The oligonucleotides used were ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') and ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1999). The amplification program consisted of 1 cycle at 95 °C, 1 min; 30 cycles at 95 °C, 1 min, 57 °C, 1 min, 72 °C, 1 min; 1 cycle at 72 °C, 12 min.

Amplified products were analyzed by electrophoresis in 1.0 % agarose gel in a buffer solution of Boratos pH 8.0 dyed with ethidium bromide for documentation. The PCR products were purified with the Exo-sap-IT method (Invitro Gene, USA) or taken directly from the gel and purified with Wizar SV (Promega, USA), following the instructions of the manufacturer. The fragments were sequenced directly in a Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem). The nucleotide sequences obtained were deposited in the GeneBank to obtain its access number and later compared with those available in the GeneBank (NCBI, 1999) using the Blast method. Sequences were aligned by eye, using MacClade 4.06 (Maddison and Maddison, 2003). Parsimonious searches were conducted with PAUP version 4.0b10 (Swofford, 2002) using the PRAP command (Müller, 2004) with ten random taxon-addition replicates and tree-bisection-reconnection (TBR) swapping, with the 'steepest descent' and 'multiple tree' no-effect options. Gaps were treated as missing data. Statistical support was measured by non-parametric bootstrapping as implemented in PAUP. Bootstrap proportions were based on 10 000 replicates using a simple-taxon-addition tree as the starting point, TBR swapping, steepest descent and multiple tree options not in effect, and one tree held in memory. More intensive heuristic searches did not increase the reliability of bootstrapping (Müller, 2005). Those nodes that reported BP levels >70 % were considered statistically significant (Hillis and Bull, 1993). The final tree was drawn with "TreeGraph" (Müller and Müller, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation, culture and identification of fungi

A fungus from tissue fragments with dieback symptoms and branch resinosis from mesquite that grow naturally in the Valley of Zapotitlán in the state of Puebla, México, was isolated in artificial PDA culture medium. The isolated fungus developed a mycelium colony that was white and cottony initially; later, slightly greenish concentric rings, which finally turned light brown, were observed. After two weeks of growth, conglomerates of mycelia covered the entire Petri dish and later formed dark globose structures with asci and ascospores similar to those found in tissues affected by the dieback disease. Direct observation of the signs in mesquite branches with dieback revealed a light brown mycelial mass that contained conidiophores and hyaline conidia, which were ellipsoidal with one truncate end, measuring 5.15-6.66×4.13-4.86 mm (Figure 2). By its morphological characteristics, it was identified as a *Nodulosporium*-like fungus (Barnett and Hunter, 1998).

Bajo la masa de conidioforos y conidios se desarrolló un estroma aglomerado o pulvinado formando peritecios globosos negros y labios periteciales conspicuos (-1.5) 2 mm longitud × 2 mm anchura (-3.5); superficie negra brillante, de consistencia serosa (Figura 3). Los peritecios frecuentemente estaban cubiertos por conidioforos y conidiosporas del tipo *Nodulosporium*. Los peritecios globosos a subglobosos (0.32-0.48 mm diámetro) con ostiolos umbilicados (Figura 3) contenían gránulos rojizos a negruzcos dispersos inmediatamente bajo la gruesa capa peritecial y entre las paredes. Las ascas tenían una media de 153.1-173.37 μm longitud total × 10.2-12.83 μm anchura, la parte del alineamiento de esporas de 82.37-99.96 μm y el tallo de la asca de 59.08-83.36 μm longitud (Figura 4). No se observó anillo apical ni la presencia de almidón en las ascas con el tratamiento de solución de yodo.

Las ascosporas eran pardo-oscuras, unicelulares, elipsoides-inequilaterales, con extremos ligeramente redondeados con las siguientes medidas: (13.56-) 14.90 (-16.24) × (-6.99) 8.04 (-9.08) μm, con la longitud de la abertura germinal alargada del lado convexo. Se precisó la presencia de una periespora dehiscente al tratar las ascosporas con una solución de KOH al 10 %, y la epispora de aspecto cristalino y lisa (Figura 5) (Hanlin, 1998; Ulloa y Hanlin, 2000).

Considerando las características morfológicas registradas, este segundo hongo aislado y separado en medios artificiales a partir de los síntomas de muerte descendente y resinosidad, que fructifica en forma natural sólo en las ramas con el síntoma de muerte descendente, fue identificado como *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm. (Ascomycete: Xylariales) considerando los criterios taxonómicos de Ju y Rogers (1996), así como los de San Martín y Lavin (1999) y San Martín *et al.* (1998).

El hongo *Nodulosporium* es considerado como el anamorfo o la fase asexual de varias especies del género *Hypoxylon* (Ju y Rogers (1996). Por tanto, se concluye que ambos hongos están relacionados con la inducción de los síntomas observados en mezquite, probablemente en diversas etapas del desarrollo de las enfermedades en el Valle de Zapotitlán. Muestras de ramas de mezquite con estromas de *H. diatrypeoides* y masas conidiales de *Nodulosporium* se depositaron y registraron en el herbario J. H. Miller de la Universidad de Georgia (No. de acceso GAM16048).

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad mostraron que 15 d después de las inoculaciones de las plantas de mezquite en el invernadero, se observaron síntomas de muerte descendente y pudrición del tronco en todas las plantas

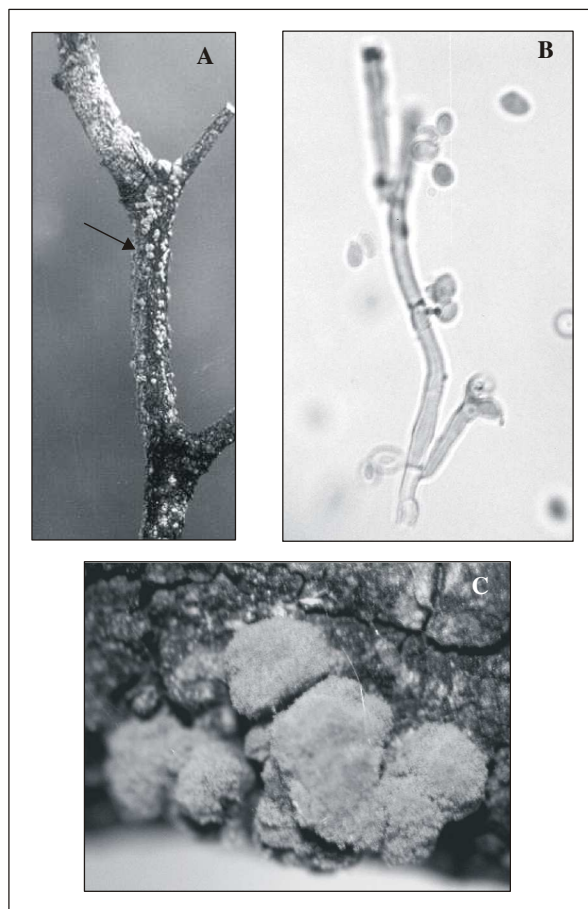


Figura 2. A) Síntomas y signos de muerte descendente en ramas primarias de mezquite. B) Conidioforo y conidios del tipo *Nodulosporium*. C) Conglomerados peritesoides cubiertos por conidioforos de *Nodulosporium*.

Figure 2. A) Symptoms and signs of dieback in primary branches of mezquite. B) Conidiophores and conidia of *Nodulosporium*-type. C) Perithecia conglomerates covered by conidiophores of the *Nodulosporium*.

Below the mass of conidiophores and conidia, an agglomerate or pulvinate stroma developed forming black globose perithecia and conspicuous perithecial labia (-1.5) 2 mm long × 2 mm wide (-3.5); the shiny black surface had a waxy consistency (Figure 3). Perithecia were frequently covered by *Nodulisporium*-like conidiophores and conidiospores. The globose to subglobose perithecia, measuring 0.32-0.48 mm in diameter with umbilicate ostioles (Figure 3), contained reddish to blackish granules dispersed just below the thick perithecial layer and between the walls. The asci had a mean of 153.1-173.37 μm total length × 10.2-12.83 μm wide, spore alignment part was 82.37-99.96 μm, and ascum stem 59.08-83.36 μm long (Figure 4). No apical ring was observed nor was starch detected in the asci with the iodine solution treatment.

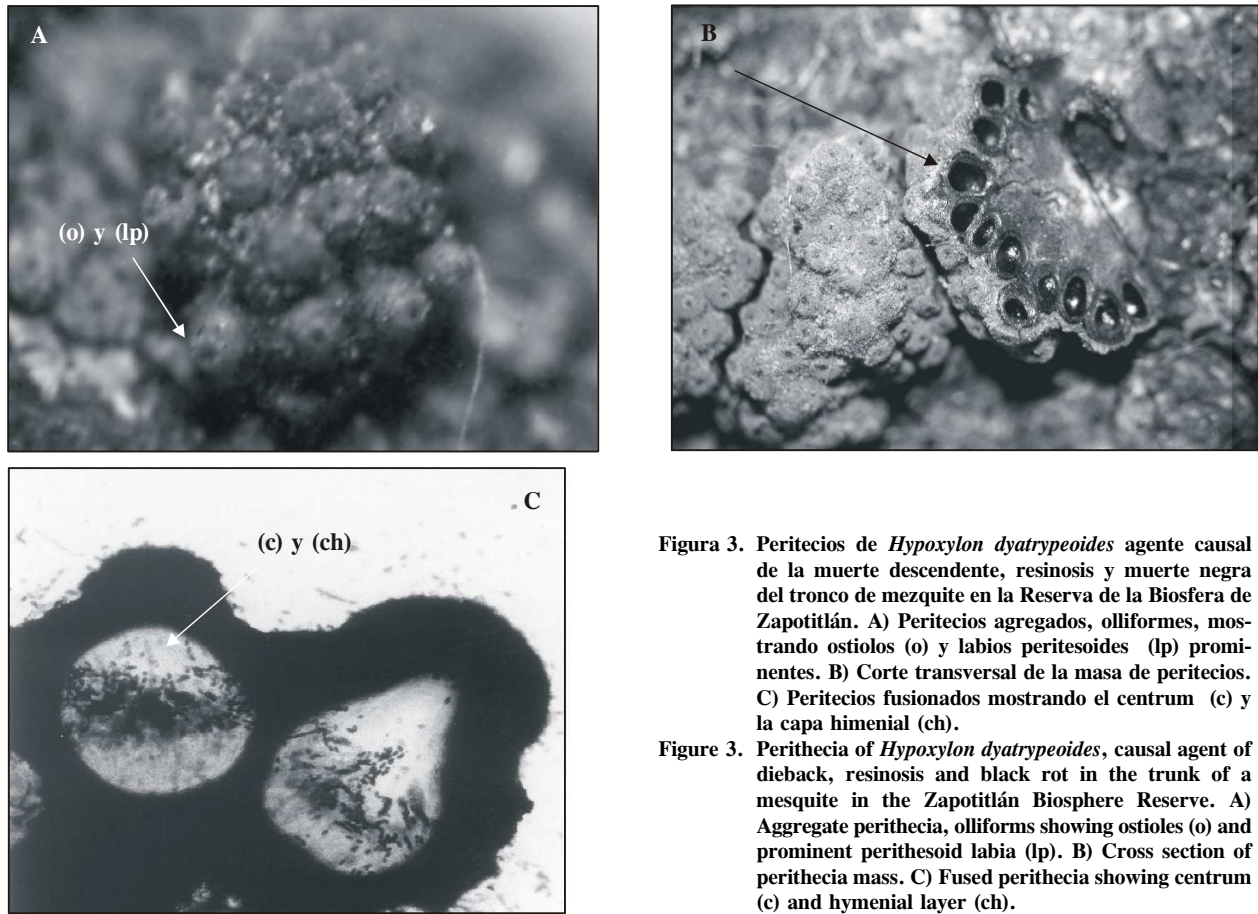


Figura 3. Peritecios de *Hypoxylon dyatrypeoides* agente causal de la muerte descendente, resinosis y muerte negra del tronco de mezquite en la Reserva de la Biosfera de Zapotitlán. A) Peritecios agregados, olliformes, mostrando ostiolos (o) y labios peritesoides (lp) prominentes. B) Corte transversal de la masa de peritecios. C) Peritecios fusionados mostrando el centrum (c) y la capa himenial (ch).

Figure 3. Perithecia of *Hypoxylon dyatrypeoides*, causal agent of dieback, resinosis and black rot in the trunk of a mesquite in the Zapotitlán Biosphere Reserve. A) Aggregate perithecia, ocelliforms showing ostioles (o) and prominent perithesoid labia (lp). B) Cross section of perithecia mass. C) Fused perithecia showing centrum (c) and hymenial layer (ch).

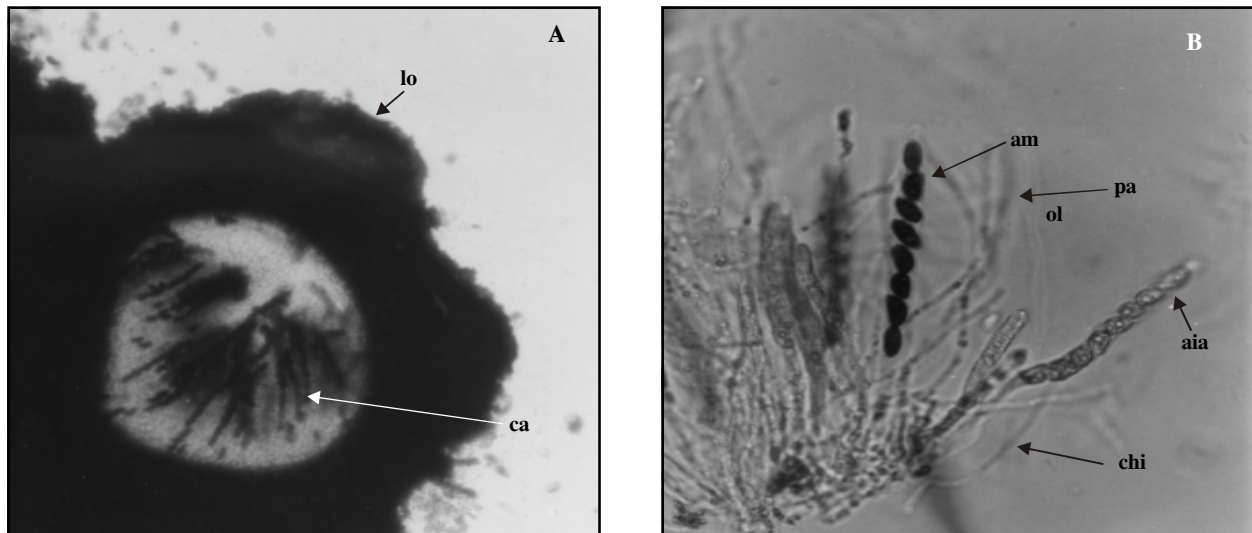


Figura 4. A) Cuerpo fructifero de *H. diatrypeoides*. Mostrando el labio ostiolar (lo) y el centrum tipo xylaria con la capa ascas (ca) en la parte inferior. B) Capa ascas con ascas y ascosporas maduras (am), paráfisis (pa), asca y ascosporas inmaduras (ain) y capa himenial (chi).

Figure 4. A) Fruiting body of *H. diatrypeoides* showing ostiolar labium (lo) and xylaria-type centrum with ascus layer (ca) in the lower part. B) Ascus layer with asci and mature ascospores (am), paraphysis (pa), ascus and immature ascospores (ain) and hymenial layer (chi).

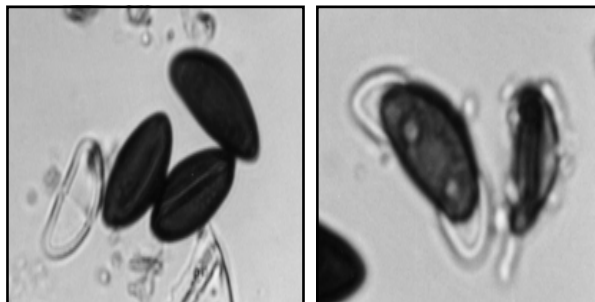


Figura 5. A) Asca y ascosporas de *H. diatrypeoides*. B) Hendidura germinativa en el lado ventral de la ascospora. C) Epispora dehiscente, cristalina y lisa en solución de KOH al 10 %.

Figure 5. A) Ascus and ascospores of *H. diatrypeoides*. B) germinative cleft on the ventral side of the ascospore. C) Dehiscent, crystalline, smooth epispora in 10 % KOH solution.

inoculadas con palillos de dientes colonizados con micelio y peritecios (Figura 6), y en la mitad de los individuos inoculados con ascosporas. No se observaron síntomas en plantas sin heridas y en los tratamientos testigo (Cuadro 1). El hongo *H. diatrypeoides* fue reaislado consistentemente de las ramas sintomáticas. Entonces, *H. diatrypeoides* es el agente causal de la muerte descendente y pudrición negra del tronco del mezquite en el Valle de Zapotitlán y aunque son comunes otras especies del género *Hypoxylon* en México (Mendel y Chacón, 1997; Guzmán y Medel, 1999; San Martín *et al.*, 1999), se confirma su función como patógeno en mezquite (De La Torre *et al.*, 2003). Previamente, este hongo sólo había sido reportado como saprofito en madera de encinos en Brasil y Nueva Zelanda (Ju y Rogers, 1996).

Cuadro 1. Pruebas de patogenicidad con *H. diatrypeoides* en plantas de mezquite (*Prosopis leavigata* L.) en invernadero.

Table 1. Pathogenicity tests on *H. diatrypeoides* in mesquite plants (*Prosopis leavigata* L.) in a greenhouse.

Tratamientos	No. plantas con síntomas/ No. plantas sanas
A. Plantas inoculadas con palillos y hongo. heridas	36a/36b
B. Plantas inoculadas con esporas. heridas	18/36
C. Plantas sólo heridas con palillos estériles	0/36
D. Plantas inoculadas con esporas sin heridas	0/36
E. Plantas sin inocular/sin heridas. totalmente sanas	0/36

a/ plantas con síntomas de pudrición seca, muerte descendente.

/b plantas totales.



Figura 6. Síntomas de muerte descendente y marchitez en una planta de mezquite inoculada con esporas y micelio de *H. diatrypeoides* en invernadero.

Figure 6. Symptoms of dieback and wilting in a mesquite plant inoculated with *H. diatrypeoides* spores and mycelia under a greenhouse.

Ascospores were dark brown, single-celled, non-equilateral ellipsoid with slightly rounded tips, and had the following measurements: (13.56–) 14.90 (–16.24) × (–6.99) 8.04 (–9.08) μm , with lengthened germinal opening on the convex side. When the ascospores were treated with a 10 % solution of KOH, a dehiscent perispore and the epispora crystalline and smooth were clearly seen (Figure 5) (Hanlin, 1998; Ulloa and Hanlin, 2000).

Considering the registered morphological characteristics, the second fungus isolated and separated in artificial media from the symptoms of dieback and resinosis, which fructifies naturally only on branches with dieback symptoms, was identified as *diatrypeoides* Rehm. (Ascomycete: Xylariales), following the taxonomic criteria of Ju and Rogers (1996) and those of San Martín and Lavin (1999) and San Martín *et al.* (1998).

The fungus *Nodulosporium* is considered anamorph or the asexual phase of several species of the genus *Hypoxylon*, and therefore, it is concluded that both fungi are related to induction of the symptoms observed in mesquite, probably in diverse stages of development of the diseases observed in the Valley of Zapotitlán. Samples from mesquite branches with *H. diatrypeoides* stromata and *Nodulosporium* conidial masses were deposited and registered in the J.H. Miller Herbarium of the University of Georgia (Access No. GAM 16048).

Pathogenicity tests

Pathogenicity tests showed that 15 days after inoculations of the greenhouse mesquite plants dieback

Caracterización molecular por secuenciación y análisis filogenético de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se obtuvo regularmente un producto de 600-650 pb en la PCR con los oligonucleótidos ITS4-ITS5, del ADN obtenido de las esporas y del micelio cultivado en medio líquido. Tres secuencias directas de los productos de la PCR, fueron obtenidas: una procedente del ADN de esporas (No. de acceso AY303629) y dos del micelio (No. de acceso DQ985380 y DQ985381).

Los resultados de la comparación entre las secuencias obtenidas de ADN de esporas y micelio de los aislados de *H. diatrypeoides* del mezquite de Zapotitlán, con los síntomas de muerte descendente y pudrición negra del tronco, mostró una homología lo suficientemente alta para considerarlos como la misma especie. La comparación de estas secuencias con las disponibles en el GenBank permitió confirmar que el hongo aislado de plantas de mezquite sólo se agrupa con la secuencia de un aislado de *Hypoxylon*, aún no descrito hasta especie, procedente de Tailandia (No. de acceso DQ223765) (Figura 7).

Las secuencias más relacionadas al grupo de *H. diatrypeoides* pertenecen a *H. ochraceum* y con *H. perforatum*, especies distribuidas en el hemisferio sur, particularmente en Sudamérica y Nueva Zelanda. El único reporte morfológico anterior de la especie *H. diatrypeoides* se encuentra en Brasil (Ju y Rogers, 1996) lo que sugiere que la distribución de esta especie sea continua entre los hemisferios norte y sur en América y posiblemente en el sur de Asia (Katleen *et al.*, 1997). El dendrograma presenta dos grupos cuya separación no está bien sustentada, pero sus agrupamientos interiores si lo están; uno de ellos agrupa secuencias de especies de los géneros *Daldinia* y *Entonaema*; el segundo está conformado principalmente por especies del género *Hypoxylon*. Sin embargo, una secuencia de la especie *D. loculata* y otra de *H. fuscopurpureum* no se agrupan con los de su misma especie, lo cual podría sugerir una clasificación errónea del organismo de origen de estas secuencias (Figura 7).

CONCLUSIONES

Se determinó que el agente causal de la muerte descendente y la resinosidad del mezquite, que crece naturalmente en el Valle de Zapotitlán, en el estado de Puebla, México, es causada por un hongo Ascomycete perteneciente al orden Xylariales. El hongo fue identificado como *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm, considerando las características morfológicas de sus peritecios, ascas y ascosporas. El hongo se aisló y cultivó en medios artificiales de los tejidos con los

symptoms and trunk rot were observed in 100 % of those inoculated with toothpicks colonized with mycelia and perithecia (Figure 5), and in only 50 % of the individuals inoculated with ascospores. No symptoms were observed in plants without lesions or in the control treatments (Table 1). *H. diatrypeoides* was re-isolated consistently from symptomatic branches. It is therefore concluded that *H. diatrypeoides* is the causal agent of dieback and black trunk rot in mesquite in the Valley of Zapotitlán. Although other *Hypoxylon* species are common in México (Mendel and Chacón, 1997; Guzmán and Medel, 1999; San Martín *et al.*, 1999), this is the first report of *H. diatrypeoides* in México, and particularly as a plant pathogen. The fungus had been reported previously only as a saprophyte in oak wood in Brazil and New Zealand (Ju and Rogers, 1996).

Molecular characterization by sequencing and phylogenetic analysis of polymerase chain reaction (PCR) products

From PCR with the oligonucleotides ITS4-ITS5 (Figure 7), using *H. diatrypeoides* mycelia cultivated in liquid medium and spores obtained directly from fruiting bodies as the source of DNA, 600-650 pb product was obtained regularly. Three direct sequences of the PCR products were obtained: one from Spore DNA (Access num AY303629) and two from mycelia (Access no. DQ985389 and DQ985381).

The results of the comparison between the sequences obtained from spore and mycelium DNA from the *H. diatrypeoides* isolates from mesquite from Zapotitlán with dieback and black trunk rot symptoms showed sufficiently high homology to consider them the same species. Comparison of the obtained sequence with those available in the GeneBank confirm that the fungus isolated from mesquite plants can only be grouped with the sequence of an isolate of *Hypoxylon*, still not described to species, from Thailand (Access no. DQ223765) (Figure 7).

Furthermore, the sequences most related to the group of *H. diatrypeoides* belong to *H. ochraceum* and *H. perforatum*, species that are distributed in the southern hemisphere, particularly South America and New Zealand. The only previous morphological report on *H. diatrypeoides* was reported in Brazil (Ju and Rogers, 1996), suggesting that distribution of this species is continuous between the northern and southern hemispheres in the American continent and possibly southern Asia (Katleen *et al.*, 1997). The dendrogram presents two groups that, although their separation is not well-supported, the interior groupings are. One of them groups sequences of species of the genera *Daldinia* and *Entonaema*, while the second group comprises

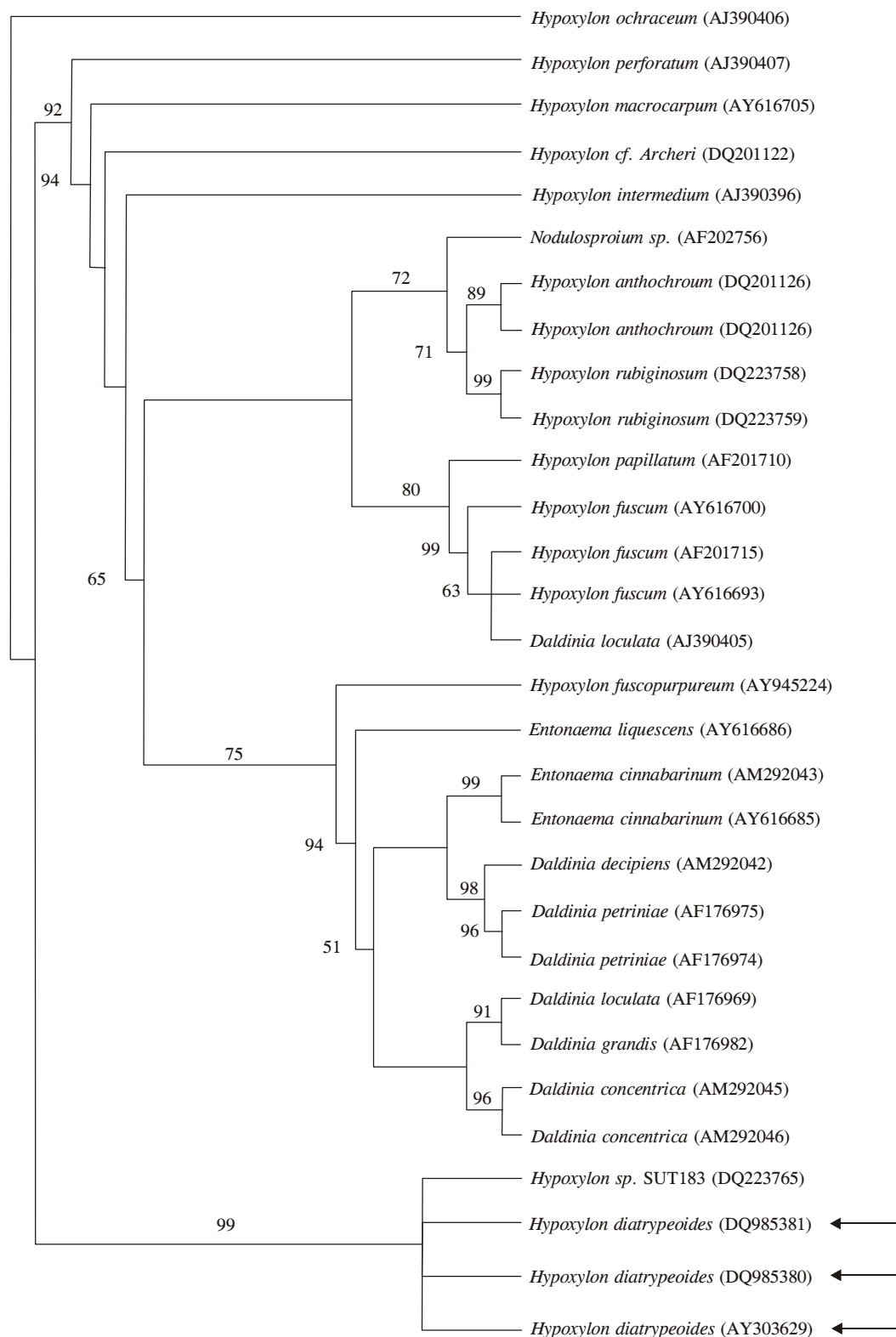


Figura 7. Dendrograma más parsimonioso obtenido de la comparación de las secuencias obtenidas de *H. diatrypeoides*-Tehuacán (←) que infecta mezquite en el Valle de Zapotitlán con otras especies de Xylareales. Las proporciones del análisis bootstrap se muestran encima de la rama o a la izquierda del nodo. En paréntesis se especifica el número de acceso en el GenBank.

Figure 7. Most parsimonious dendrogram obtained by comparison of the sequences from *H. diatrypeoides*-Tehuacán (←) infecting mesquite at the Zapotitlán Valley with other Xylareales species. The proportions of the bootstrap analysis are shown above the branch or to the left of the node. The access number at the GenBank is shown between parenthesis.

síntomas de muerte descendente y pudrición negra del tronco, aunque se observó la producción en condiciones naturales de peritecios de *H. diatrypeoides*, junto con conidios y conidiosporas de una especie de *Nodulosporium*, que se consideró la fase anamorfa asexual de *H. diatrypeoides*.

Se reprodujeron los síntomas de muerte descendente y resinosidad del tronco en plantas jóvenes de mezquite producidas en el invernadero, cuando se inocularon con el micelio y peritecios inoculadas del hongo *H. diatrypeoides* aislado de mezquite y cultivado en medio artificial.

La secuencia nucleotídica de la región ITS1-ITS2 del rADN del aislamiento de *H. diatrypeoides* de México confirmó que este hongo pertenece al orden Xylariales con relaciones filogenéticas con otras especies de *Hypoxylon* reportadas en el hemisferio sur (Brasil y Nueva Zelanda), pero éste es el primer reporte en el hemisferio norte y en México, causando una enfermedad en mezquite.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado totalmente por la CONABIO (Proyecto BK-041).

LITERATURA CITADA

- Buckart, G. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosidae) in North America. Acta Mex. 3: 7-19.
- Barnett, H. L., and B. B., Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, U.S.A. 100 p.
- Dávila, A. P., J. L. Villaseñor R., R. Medina, L., A. Ramírez R., A. Salinas T., J. Sánchez K., y P. Tenorio L. 1993. Listado Florístico de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Departamento de Botánica. Instituto de Biología. UNAM. México. pp. 10-30.
- Dellaporta, S. L., J. Woods, and J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparations, version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.
- De La Torre-Almaraz. R., F. M. Cota-Trujillo, and F. San Martín. 2003. First report of *Hypoxylon diatrypeoides* inducing Dieback and Black Trunk Rot on Mesquite (*Prosopis laevigata*) in Mexico. Plant Dis. 87:447.
- Guzmán, G., y R. Medel. 1999. Especies de Macromicetos citadas de México IX. Ascomycetes parte III. Acta Bot. Mex. 46: 57-72.
- Granados, S. D. 1996. El Mezquite: El árbol del desierto. Ciencias Forestales 1: 37-51.
- Hanlin, T. R. 1998. Illustrated Genera of Ascomycetes. Vol. I. The American Phytopathological Society. USA. pp: 118-119.
- Hernández, R.A. 1992. El Mezquite. Vinculación 4: 23-26.
- Hillis, D.M., and J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing 814 confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42: 182-192.
- Ju, Y. M., and J. D. Rogers. 1996. A Revision of the Genus *Hypoxylon*. Mycologia Memoir No 20. American Phytopathological Society of America, St. Paul. Minnesota. pp: 107-108.
- Van der Gucht, M. Y. Ju, and K., D. J. Rogers. 1997. New *Hypoxylon* species from Papua New Guinea and notes on some of the taxa. Mycology 89 (3): 503-511.

mainly species of the genus *Hypoxylon*. However, a sequence of the species *D. loculata* and another of *H. fuscopurpureum* do not group with those of their same species; this may suggest erroneous classification of these sequences.

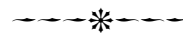
CONCLUSIONS

It was determined that the causal agent of dieback and resinosidad in mesquite, which grows naturally in the Valley of Zapotitlán, state of Puebla, México, is caused by the Ascomycete fungus, belonging to the order Xylariales. The fungus was identified as *Hypoxylon diatrypeoides* Rehm, considering the morphological characteristics of its perithecia, asci and ascospores. The fungus was isolated and cultivated in artificial media from tissues exhibiting dieback and black trunk rot symptoms. Although production of *H. diatrypeoides* perithecia was observed with conidia and conidiosporas of a species of *Nodulosporium*, this was considered the anamorphic or asexual phase of *H. diatrypeoides*.

Dieback and trunk resinosidad symptoms were reproduced in young mesquite plants grown in a greenhouse when these were inoculated with *H. diatrypeoides* mycelia and perithecia isolated from mesquite and cultivated in artificial medium.

The nucleotide sequence of the ITS1-ITS2 region of rDNA from the *H. diatrypeoides* isolate of México confirmed that this fungus belongs to the order Xylariales with phylogenetic relationships with other species of *Hypoxylon* reported in the southern hemisphere (Brazil and New Zealand); this, however, is the first report in the northern hemisphere and México of this fungus causing disease in mesquite.

End of the English version—



- Király, Z., Z. Klement, F. Solymosy, and J. Voras. 1974. Methods in Plant Pathology. Elsevier Scientific Publishing Company. New York, USA. pp: 30-40.
- Lee, B. S., and J.W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M.A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego. pp: 282-287.
- Lot, A., y F. Chiang. 1986. Manual de herbario. Departamento de Botánica. Instituto de Biología. UNAM. México. pp: 103-111.
- Maddison, D. R., and W. P. Maddison. 2003. MacClade 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Mendel, R. I., y S. Chacón 1997. Ascomycetes poco conocidos de México. VII, algunas especies del bosque mesófilo de Veracruz. Acta Bot. Mex. 39: 43-52.
- Mengistu, A., Curt B.H., Williams P. H. 1996. A toothpick method for mating *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of Blackleg of Crucifers. Plant Dis. 79: 755-756.

- Mugnier, J. 1998. Molecular evolution and phylogenetic implications of ITS sequences in plants and in fungi. *In*: Bridge, P., Y. Cousteaudier, and J. Clarkson (eds). *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB international. UK. pp: 253-277.
- Müller, K., 2004. PRAP - Computation of Bremer support for large data sets. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 780-782.
- Müller, K., 2005. The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, bootstrap, and Bremer support. *BMC Evol. Biol.* 5: 58.
- Müller, J. and K. Müller. 2004. TreeGraph: automated drawing of complex tree figures using an extensible tree description format. *Mol. Ecol. Notes* 4: 786-788.
- Rzendowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosidae) en Norteamérica. *Acta Bot. Mex.* 3: 7-19.
- San Martín, F., Rogers J. D., y Yu-Min Ju. 1998. Clave dicotómica provisional para los géneros de la familia Xylariaceae (PYRENOMYCETES, SPHAERIALES) de México. *Acta Bot. Mex.* 42: 35-41.
- San Martín, F., J. D. Rogers, y Ju Yu-Min. 1999. Algunas especies de *Hypoxylon* (PYRENOMY-CETES, XYLARIACEAE) de México. *Acta Bot. Mex.* 47: 31-57.
- San Martín, F., and P. Lavin. 1999. Two new species of *Hypoxylon* from Mexico. *Mycotaxon* 72: 159-162.
- Sogin, L. M. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. *In*: Innis, M. A., D. H., Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. pp: 307- 314.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Ulloa, M., and R. T. Hanlin. 2000. *Illustrated Dictionary of Mycology*. The American Phytopathological Society. Minnesota. pp: 75-77.
- Valiente-Banuet A., A. Casas, A. Alcántara-Egúren, P. Dávila, N. Flores-Hernández, J. L. Villaseñor, J. Ortega-Ramírez, y J. A. Soriano. 2001. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 67: 25-74.
- White, J. T., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. pp: 315-322.