

CARACTERIZACIÓN DE UN HONGO ASOCIADO A LA PLANTA MACHO DEL POCHOTE (*Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir) EN TEHUACÁN-CUICATLÁN, MÉXICO

CHARACTERIZATION OF A FUNGUS ASSOCIATED WITH *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir) PLANTA MACHO IN TEHUACÁN-CUICATLÁN, MÉXICO

Aidé Avendaño-Gómez¹, Rafael Lira-Saade¹, Patricia Dávila-Aranda¹, Alejandro Casas-Fernández², Rodolfo De La Torre-Almaraz¹

¹Laboratorio de Recursos Naturales. UBIPRO. FES. Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida, de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla. 54090. Estado de México. (aaide3@hotmail.com). ²Centro de investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. Campus Morelia. Apartado Postal 27-3 (Santa María de Guido), Morelia Michoacán, 58190 México.

RESUMEN

El pochote (*Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*) es una especie arbórea silvestre cuyas semillas se consumen y comercializan por las comunidades del Valle de Tehuacán, Puebla. Pero esta actividad se ha reducido debido a la presencia de árboles con proliferación de flores, pudrición y deformación de frutos, que son reconocidos como pochotes macho. Ésto causa pérdidas económicas importantes para los pobladores que dependen de este recurso natural. Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron identificar al agente causal relacionado con este síndrome y establecer los factores climáticos y de manejo que determinan su incidencia y distribución en la región. La revisión del interior de los frutos reveló la destrucción de semillas por la abundancia de esporas de color café-rojizo de un hongo, que no produjo micelio ni esporas en cultivos axénicos. La comparación y alineamiento de las secuencias de los productos de la PCR de la región ITS1-ITS2 del gen rADN 18S obtenidos del ADN de las esporas aisladas de los frutos de pochote macho, con secuencias disponibles en el Genbank, mostró una identidad nucleotídica de 87 a 75% con los géneros *Crinipellis* y *Moniliophthora*. Así, es posible que las esporas encontradas en los frutos del pochote macho pertenezcan a una especie de estos hongos. Se determinó que la distribución e incidencia del pochote macho, están relacionadas directamente con el grado de uso por los habitantes locales y no por los factores climáticos evaluados.

Palabras clave: Etnobotánica, moniliasis, recursos naturales.

INTRODUCCIÓN

El pochote (*Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*) es una especie manejada principalmente en comunidades vegetales naturales del Valle de Tehuacán, México, encontrada junto con maíz (*Zea*

ABSTRACT

Pochote (*Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*) is a wild tree species whose seeds are consumed and sold by communities of Valle de Tehuacán, Puebla. But these activities have decreased because a large number of trees have appeared with a proliferation of flowers and fruit rot and deformation. This condition is known as pochote macho and causes major economic losses for the population that depends on this natural resource. Therefore, this study was conducted to identify the causal agent related to this syndrome and to establish the climate and management factors that determine its incidence and distribution in the region. Examination of fruit interior revealed destruction of seed by abundant reddish-brown spores of a fungus that did not produce mycelium nor spores in axenic cultures. Comparison and alignment of PCR product sequences of the ITS1-ITS2 region of the rDNA 18S gene obtained from DNA of spores isolated from pochote macho fruits with sequences available in the Genbank, showed 87 to 75% nucleotide identity with the genera *Crinipellis* and *Moniliophthora*. It is thus possible that the spores found in pochote macho fruits belong to a species of these fungi. Distribution and incidence of pochote macho was determined. This was directly related to the degree local inhabitants used it and not to the evaluated climatic factors.

Key words: Ethnobotany, moniliasis, natural resources.

INTRODUCTION

Pochote (*Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*) is a species that is managed mainly in natural plant communities of the Valle de Tehuacán, México. It is found, together with corn (*Zea mays* L.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), chili (*Capsicum annum* L.) and squash (*Cucurbita pepo* L.), in the historical records in the Coxcatlán caves (Casas *et al.*, 2001; Avendaño *et al.*, 2006). The seeds are both consumed and sold in local markets, but these activities have decreased. Trees

Recibido: Octubre, 2006. Aprobado: Julio, 2007.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 205-215. 2007.

mays L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en el registro histórico en las Cuevas de Coxcatlán (Casas *et al.*, 2001; Avendaño *et al.*, 2006). Sus semillas se consumen y comercializan en los mercados locales. Pero esta actividad se ha reducido debido a la presencia entre sus fenotipos (morado, verde-cenizo y verde-rojizo) de árboles con proliferación de flores y frutos (Figura 1), que se debe al acortamiento de entrenudos en las ramas reproductivas, y que dan la apariencia de agruparse en racimos (síntoma de la enfermedad llamada escoba de bruja). El fruto afectado es globoso o esférico con engrosamiento de su cáscara y pudrición seca; al abrirse hay una gran cantidad de un polvo seco, café rojizo, fácilmente desprendible (moniliasis) y semillas destruidas (Avendaño *et al.*, 2006). Estas características contrastan con la producción de inflorescencias solitarias o en pares (Figura 1) y la forma oblonga-elipsoide de los frutos descritos para la especie (Gibbs y Semir, 2003).

Los árboles con estas irregularidades son reconocidos, en Coxcatlán, Puebla, como pochotes macho, por la ausencia en sus frutos de semillas aptas para el consumo y porque dañan la economía de los habitantes que dependen de este recurso natural (Avendaño *et al.*, 2006). Dado que no se encontraron antecedentes sobre el origen del síndrome del pochote macho y por su importancia económica para ciertos sectores sociales de la región, los objetivos de este estudio fueron identificar y caracterizar al agente causal relacionado con las anomalías del pochote macho, evaluar sus efectos en la calidad, producción y comercialización de la semilla, establecer la distribución de este tipo de árboles en las zonas de aprovechamiento y precisar algunos factores climáticos y de manejo que la condicionan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México, está localizado a una altitud de 800 a 1400 m, el clima en la región es semiárido BShw”(w)(e)g con una precipitación media anual de 440 mm, temperatura media anual de 23.8 °C, oscilando entre 16.5 °C en enero y 24.2 °C en mayo. El principal tipo de vegetación en la zona es el matorral xerófilo considerado como una de las reservas naturales con la mayor riqueza, diversidad y endemismo florístico en el mundo (Rzedowski, 1978; Valiente-Banuet *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2001).

Las poblaciones de pochote se localizan en tres altitudes: 800 a 1000 m, donde hay casas, huertos familiares y campos de cultivo; 1000 a 1200 m y más de 1400 m en los montes cercanos a las comunidades. La mayor concentración de árboles de pochote está en las comunidades de Coxcatlán, San Rafael y San José Tilapa, municipio de Coxcatlán, Puebla (Avendaño *et al.*, 2006).

on which flowers and fruits (Figure 1) proliferate because of shortening of internodes on the productive branches have appeared among its phenotypes (purple, ash green and reddish green). The flowers grouped in racemes give it the appearance of the symptom of a disease called “witch’s broom”. The affected fruit is globose or spherical with thickened shell where dry rot occurs; when opened, a large amount of dry reddish brown easily loosened powder (moniliasis) and destroyed seeds (Avendaño *et al.*, 2006) are found. These characteristics contrast with the production of single or paired inflorescences (Figure 1) and the oblong-ellipsoid shaped fruits described for the species (Gibbs and Semir, 2003).

The trees with these irregularities are known in Coxcatlán, Puebla, as pochotes macho because in the fruit edible seeds are absent, affecting incomes of the inhabitants who depend on this natural resource (Avendaño *et al.*, 2006). Given that no previous mention of the origin of the pochote macho syndrome was found and because of its economic importance for certain social sectors of the region, the objectives were to identify and characterize the causal agent related to the pochote macho abnormalities, to evaluate its effects on quality, production and marketing of the seed, to determine the distribution of this type of tree in the regions where it is used, and to identify climatic and management factors that define conditions for the development of the disease.



Figura 1. Síntomas asociados a las plantas de pochote macho en A) proliferación, pudrición y deformación de frutos; B) proliferación de flores; C) frutos sanos (en pares o individuales y fusiformes); D) flor en panículas sanas.

Figure 1. Symptoms associated with pochote macho plants: a) proliferation, fruits rot and deformation; B) proliferation of flowers; C) healthy fusiform fruits (in pairs, or single and fusiform); D) flower in healthy panicle.

De 2003 a 2005, en cada una de estas comunidades se localizaron y analizaron, en cada piso altitudinal, plantas y frutos de pochote macho. Se marcaron 30 árboles al azar de diferente fenotipo y se recolectaron sus frutos (270 árboles en total). Se recolectaron los frutos de dos a tres ramas por individuo, obteniéndose 929 frutos, de los cuales 819 fueron de árboles normales (159 para el fenotipo morado, 264 para el cenizo y 396 para el verde-rojizo) y 110 de árboles pochote macho (20 para el fenotipo morado, 36 para el verde-cenizo y 54 para el verde-rojizo), que se trasladaron al laboratorio para su análisis.

Identificación del hongo asociado con el pochote macho

Aislamiento y cultivo en medios artificiales

Se revisó el contenido de todos los frutos recolectados rompiendo la cáscara por presión manual o con un martillo, separando los frutos sanos de los que contenían esporas de aspecto polvoso de color café-rojizo. De estos últimos se separó con agujas de disección una porción de micelio y esporas, que se montaron en una solución de azul de lactofenol (4%) o en agua destilada estéril en un portaobjetos y cubreobjetos, para su observación en un microscopio compuesto y determinar sus características morfológicas. Las estructuras observadas fueron fotografiadas con aumentos de 10× y 40× (Sarasola y Sarasola, 1975; López, 1981).

Se transfirió con agujas de disección flameadas y frías micelio y esporas de los frutos de pochote en una cámara de flujo laminar a cajas de Petri con medio estéril de papa dextrosa agar (PDA) o extracto de malta agar (EMA) (Merck, Co., Germany) e incubados a temperatura de laboratorio (25 °C/12 h luz) hasta la formación de micelio y esporas (López, 1981).

Se identificó al hongo asociado a los frutos del pochote mediante la observación con microscopio compuesto de esporas, obtenidas por aislamiento en cultivo en medios artificiales o de las obtenidas directamente de los frutos. Su ubicación taxonómica se hizo por comparación con la descripción contenida en diversas claves específicas (Barnett y Hunter, 1972; Hanlin, 1990; Dugan, 2006).

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

Se obtuvo ADN total desde 1 g de esporas obtenidas directamente de frutos, uno para cada una de las tres comunidades (Dellaporta *et al.*, 1983; Lee y Taylor, 1990). Se realizó el ensayo PCR para la amplificación de las regiones intergenéticas transcripcionales (ITS1-ITS2) del componente ADN 18S ribosomal de hongos, que incluye la región 5.8 del rADN. 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'). 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 (White *et al.*, 1990; Mugnier, 1998).

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.0% en solución amortiguadora de boratos pH

MATERIALS AND METHODS

Area of study

The Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, Mexico, is located between altitudes of 800 and 1400 m. The region's climate is semiarid, of the BShw^w(e)g type with a mean annual rainfall of 440 mm and mean annual temperature of 23.8 °C, which oscillates between 16.5 °C in January and 24.2 °C in May. The main vegetation type of the region is xerophyll scrub, and the area is considered one of the natural reserves of greatest wealth, diversity and endemism of flora in the world (Rzedowski, 1978; Valiente-Banuet *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2001).

Pochote populations are located at three altitudes: 800 to 1000 m, where there are houses, gardens and fields; 1000 to 1200 m; and above 1400 m in the hills that surround the communities. In the communities of Coxcatlán, San Rafael and San José Tilapa, municipality of Coxcatlán, Puebla, the largest concentration of pochote trees are found (Avendaño *et al.*, 2006).

From 2003 to 2005 pochote macho plants and fruits were located and analyzed in each of these communities and at each altitudinal range. Thirty trees of different phenotypes were marked at random and their fruits were collected (a total of 270 trees). Fruits from two to three branches were collected from each individual, obtaining 929 fruits, of which 819 were from normal trees (159 from purple, 264 from ash green, and 396 from reddish-green phenotype), and 110 from trees pochote macho (20 from purple, 36 from ash-green and 54 from reddish green phenotype). All fruits were transported to the laboratory for analysis.

Identification of the fungus associated with pochote macho Isolation and culture in artificial media

The content of all of the collected fruits was examined, breaking the shell by manual pressure or with a hammer. Healthy fruits were separated from those that contained powdery reddish-brown spores. From the latter a portion of mycelia and spores was separated with dissection needles and mounted on a covered slide with a solution of lactophenol blue (4%) or sterile distilled water for observation under a compound microscope to determine morphological characteristics. The structures observed were photographed with magnifications of 10x and 40x (Sarasola and Sarasola, 1975; López, 1981).

Mycelia and spores from pochote fruits in a laminar flow chamber were transferred with dissection needles passed through a flame to Petri dishes with sterile potato dextrose agar (PDA) medium or malt extract agar (EMA) (Merck, Co., Germany) and incubated at laboratory temperature (25 °C/12 h light) until mycelia and spores formed (López, 1981).

The fungus associated to pochote fruits was identified by observation of spores with a compound microscope. Spores were obtained by isolation in artificial media or directly from fruits. Taxonomic placement was done by comparison with the description contained in several species keys (Barnett and Hunter, 1972; Hanlin, 1990; Dugan, 2006).

8.0, teñidos con bromuro de etidio para su documentación. Los productos de la PCR fueron tomados directamente del gel y purificados con Wizar SV (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron secuenciados directamente en un GeneticAnalyzer 3100 (Applied Biosystem, USA). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se depositaron en el GenBank para obtener su número de acceso. Las secuencias se compararon por alineamiento con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI, 2007), usando el método BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y se compararon usando Clustal W (Sogin, 1990).

Incidencia y distribución del pochote macho en las zonas de aprovechamiento y su relación con algunas variables climáticas

Se determinó el porcentaje de incidencia del pochote macho contando el número de individuos con esta anomalía y dividiéndolo entre el número total de árboles marcados para multiplicarlo por 100, por localidad y por gradiente altitudinal, obteniendo su distribución.

Se realizó un análisis bioclimático para determinar si alguna de estas variables están correlacionadas con la presencia del pochote macho en la zona de estudio, utilizando el Software del programa Bioclim (Pearce y Lindenmayer, 1998).

Se obtuvieron las coordenadas geográficas de los sitios donde se encontraban los individuos muestreados utilizando un GPS. Del estudio se identificaron 19 variables climáticas (Cuadro 1) que incluyen índices de temperatura y precipitación, los cuales se introdujeron en una matriz de 19 columnas (variables bioclimáticas) y 160 hileras (sitios donde se encuentran los individuos muestreados). La información se analizó por componentes principales (Rohlf, 1997), para buscar posibles agrupaciones entre las zonas de estudio debidas

Molecular characterization by sequencing polymerase chain reaction (PCR) products

Total DNA was obtained from 1 g of spores collected directly from fruits, one fruit from each of the three communities (Dellaporta *et al.*, 1983; Lee and Taylor, 1990). The PCR assay was performed for amplification of the transcriptional intergenetic regions (ITS1-ITS2) of the 18S ribosomal DNA component of fungi, which includes region 5.8 of rDNA. The oligonucleotides used were ITS4(5'-TCC TTC GCT TAT TGA TAT GC-3') and ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'). The amplification program consisted of 1 cycle at 95 °C, 1 min; 30 cycles at 95 °C, 1 min, at 57 °C, in min, at 72 °C, 1 min; 1 cycle at 72 °C, 12 min (White *et al.*, 1990; Mugnier, 1998).

The amplified products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels in a borate buffer solution pH 8.0, dyed with etidium bromate for their documentation. PCR products were taken directly from the gel and purified with Wizar SV (Promega, USA), following manufacturer's instructions. The fragments were sequenced directly in a GeneticAnalyzer 3100 (Applied Biosystems, USA). The nucleotide sequences obtained were deposited in the GeneBank to obtain an access number. The sequences were compared by alignment with sequences available in the database of the GeneBank (NCBI, 2007), using the BLAST method (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and were compared using Clustal W software (Sogin, 1990).

Incidence and distribution of pochote macho in the areas and its relationship with climatic variables

Percentage of pochote macho incidence was determined by counting the number of individuals with the abnormalities and dividing

Cuadro 1. Valores promedio de temperatura y precipitación de las tres comunidades estudiadas y sus altitudes. Table 1. Average temperatures and rainfall of the three communities studied and their elevation.

Índices bioclimáticos	Coxcatlán			San Rafael			San José Tilapa		
	Zona1	Zona2	Zona3	Zona1	Zona2	Zona3	Zona1	Zona2	Zona3
Temperatura promedio anual	23.36	22.36	21.35	23.88	22.89	20.73	23.89	23.86	19.6
Oscilación diaria promedio	15.60	15.25	14.32	16.17	15.82	14.00	16.12	16.50	13.36
Isotermalidad	0.65	0.65	0.64	0.65	0.65	0.64	0.65	0.65	0.64
Estacionalidad de la temperatura	0.74	0.71	0.68	0.75	0.72	0.67	0.75	0.75	0.64
Temperatura máxima del mes más cálido	35.23	34.06	32.41	36.26	35.07	31.64	36.35	36.60	30.26
Temperatura mínima del mes más frío	11.26	10.60	10.20	11.34	10.81	9.88	11.47	11.34	9.33
Oscilación anual de la temperatura	24.03	23.46	22.19	24.91	24.27	21.73	24.88	25.30	20.90
Temp prom del cuatrimestre más húmedo	24.56	23.26	22.22	25.01	23.81	21.51	25.28	24.82	20.36
Temp prom del cuatrimestre más seco	20.90	20.44	19.48	21.47	20.96	18.96	21.80	21.84	18.10
Temp prom del cuatrimestre más caluroso	26.00	24.90	23.8	26.58	25.53	23.14	26.62	26.60	22.03
Temp prom del cuatrimestre más frío	20.30	19.44	18.53	20.74	19.93	18.00	20.76	20.80	17.06
Precipitación anual	555.3	558.0	667.5	488.5	526.8	738.6	550.6	5526.0	862.6
Precipitación del mes más húmedo	30.33	30.63	36.75	27.04	28.77	40.2	29.53	28.00	45.33
Precipitación del mes más seco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Estacionalidad de la precipitación	99.33	98.26	95.75	100.18	99.22	95.50	98.71	99.00	94.66
Precp del cuatrimestre más húmedo	320.33	312.93	372.12	280.18	297.83	414.3	315.53	300.40	487.33
Precp del cuatrimestre más seco	0.00	0.00	18.12	0.00	0.00	26.80	0.00	0.00	34.00
Precp del cuatrimestre más caluroso	181.66	154.30	176.37	152.02	145.44	187.3	159.17	141.80	208.66
Precipitación del cuatrimestre más frío	17.00	21.13	29.87	14.18	18.77	35.50	18.85	18.00	44.00

Zona 1=800-1000 m; Zona 2=1000-1200 m; Zona 3=1200-1400 m; Precp=precipitación; Temp=temperatura; Prom=promedio.

a sus características ambientales y relacionarlas con la presencia del pochote macho.

Evaluación de los efectos de la presencia del Pochote macho en fruto y en la producción y comercialización de las semillas

Se utilizaron los porcentajes de incidencia del pochote macho por fenotipo, el análisis morfológico de sus frutos y las pruebas de germinación para evaluar las pérdidas biológicas y económicas causadas por este síndrome.

Análisis morfológico de los frutos

Se midieron 13 características morfológicas de los frutos recolectados (Cuadro 2), con los que se calculó el promedio y la desviación estándar. Las diferencias significativas de las características morfológicas, entre los individuos machos y los árboles sanos, se obtuvieron con un análisis de varianza con el programa SYSTAT 7.0 (SYSTAT, 1997).

Para evaluar la asociación entre las características de los frutos y su estado de salud se elaboró una matriz de 270 columnas (árboles) y 13 hileras (características morfológicas analizadas), la cual se analizó por componentes principales (ACP) (Rohlf, 1997). Los eigenvectores resultantes se usaron para identificar las características que contribuyeron significativamente a la separación de los individuos.

Efecto del hongo en la germinación de semillas de pochote

Se seleccionaron 10 semillas de frutos sanos y deformes de cada uno los tres fenotipos de pochote, las que se desinfectaron con una

by the total number of marked trees. This was multiplied by 100, for each site and altitude, obtaining the distribution.

A bioclimatic analysis was performed with Bioclim software (Pearce and Lindenmayer, 1998) to determine whether any of these variables correlated with the presence of "pochote macho" in the study area.

Geographic coordinates were obtained with GPS for the sites where the individuals were sampled. The analysis identified 19 climate variables (Table 1) that include temperature and precipitation indexes. These were introduced into a matrix of 19 columns (bioclimatic variables) and 160 rows (sites where the sampled individuals were found). The information was analyzed by main components (Rohlf, 1997) to find possible groupings of the study areas by environmental characteristics to relate them to the presence of pochote macho.

Evaluation of the effects of the presence of pochote macho on fruit and on production and marketing of seeds

Percentages of incidence of "pochote macho" by tree phenotype, morphological analysis of fruit and germination tests were used to evaluate biological and economic losses caused by this syndrome.

Morphological analysis of fruit

Thirteen morphological characteristics of collected fruit (Table 2) were measured; with these, average and standard deviation were calculated. The significant differences in morphological characteristics between diseased and healthy trees were obtained by analysis of variance with SYSTAT 7.0 software (SYSTAT, 1997).

Cuadro 2. Valores promedio (\pm desviación estándar) de 13 características de 949 frutos de individuos machos y sanos. Resultados del análisis de varianza.

Table 2. Average values (\pm standard deviation) of 13 characteristics of 949 fruits sampled from diseased and healthy individuals. Results of analysis of variance.

Característica del fruto	Fenotipo					
	1 Morado-Rojizo		2 Verde-Cenizo		3 Verde-Rojizo	
	Macho	Sano	Macho	Sano	Macho	Sano
1. Longitud (cm)	11.1 \pm 0.6	12.1 \pm 1.6	8.7 \pm 1.34	9.4 \pm 1.14	7.0 \pm 1.12	8.4 \pm 1.08
2. Diámetro [†] (cm)	10.0 \pm 0.19	4.3 \pm 0.36	7.7 \pm 1.42	4.4 \pm 0.62	6.1 \pm 0.97	4.4 \pm 0.45
3. Longitud del pedúnculo [†] (cm)	2.4 \pm 0.28	1.8 \pm 0.47	2.6 \pm 0.49	1.9 \pm 0.41	2.7 \pm 0.56	1.8 \pm 0.37
4. Diámetro del pedúnculo [†] (cm)	1.4 \pm 0.31	0.6 \pm 0.12	1.4 \pm 0.30	0.6 \pm 0.08	1.2 \pm 0.25	0.6 \pm 0.09
5. Longitud del cáliz (cm)	1.5 \pm 0.28	1.3 \pm 0.22	1.33 \pm 0.09	1.3 \pm 0.28	1.3 \pm 0.11	1.3 \pm 0.23
6. Peso seco del fruto (g)	25 \pm 5.16	27 \pm 6.82	15 \pm 5.70	18.6 \pm 6.07	13 \pm 5.88	18.1 \pm 5.17
7. Peso seco de la cáscara (g)	9.2 \pm 7.25	13 \pm 3.67	9.1 \pm 4.66	9.6 \pm 2.33	7.1 \pm 3.71	8.6 \pm 2.72
8. Peso seco fibra (g)	3.6 \pm 1.41	5.5 \pm 2.97	2.5 \pm 0.96	4.3 \pm 1.22	1.9 \pm 0.75	3.8 \pm 1.57
9. Peso seco de semillas [†] (g)	1.7 \pm 0.44	9.3 \pm 3.28	1.3 \pm 0.30	5.4 \pm 2.42	1.3 \pm 0.32	4.9 \pm 2.04
10. Grosor de cáscara [†] (cm)	1.1 \pm 0.28	0.3 \pm 0.05	0.8 \pm 0.10	0.3 \pm 0.05	0.8 \pm 0.25	0.3 \pm 0.0
11. Longitud semillas [†] (cm)	0.3 \pm 0.03	0.7 \pm 0.05	0.3 \pm 0.04	0.7 \pm 0.07	0.2 \pm 0.06	0.6 \pm 0.06
12. Diámetro semillas [†] (cm)	0.2 \pm 0.14	0.5 \pm 0.05	0.1 \pm 0.06	0.4 \pm 0.05	0.1 \pm 0.05	0.5 \pm 0.05
13. Número de semillas (N=30 por individuo)	117 \pm 22.7	118 \pm 22.8	108 \pm 23.07	99 \pm 23.07	91 \pm 25.1	92 \pm 25.1

[†] Diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La diferencia entre genotipos se describe en Avendaño *et al* (2006).

solución de hipoclorito de sodio al 2%, se lavaron con agua destilada estéril y se transfirieron con pinzas de disección a cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua destilada estéril. Las cajas se mantuvieron a temperatura de laboratorio (25 °C/12 h luz) hasta la germinación de las semillas.

Cálculo de pérdidas económicas

Se calcularon las posibles pérdidas económicas considerando el grado de incidencia de los individuos macho encontrados, así como en la producción y el precio comercial de las semillas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del hongo asociado con el pochote macho

Aislamiento y cultivo en medios artificiales

Se observó en el interior de todos los frutos clasificados como pochote macho la presencia de una masa pulverulenta de color rojo ladrillo, con destrucción de semillas, que contrastó claramente con el desarrollo normal de las semillas de los frutos fusiforme sanos, donde no se observó este tipo de polvo rojizo.

La observación de las preparaciones al microscopio reveló la presencia de un hongo con esporas libres, unicelulares hialinas a amarillentas, globosas, ovaladas y de cojín, con un tamaño de 38 a 45 μm (N=83), truncadas y en ocasiones con una pequeña prolongación de la pared gruesa de la espora (Figura 2a). Las esporas se produjeron en cadenas cortas de micelios cortos y hialinos.

Este hongo no produjo micelio o esporas en ningún medio usado, por lo que cabe la posibilidad que sea un saprófito estricto que crece sólo en ciertos sustratos o bien un parásito desconocido. No se observó otra clase de cuerpos fructíferos o esporas diferentes a las descritas fuera o dentro de las flores, frutos o ramas de los árboles analizados. Es posible que en el pochote macho se presente únicamente una fase asexual o anamórfica de un hongo, y que la fase teleomórfica (sexual) ocurra sólo bajo ciertas condiciones climáticas y en alguna época desconocida.

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

Se obtuvieron tres secuencias de los productos de la PCR del hongo de los frutos de pochote macho, una por localidad, que se depositaron en el Genbank (No de acceso EF593115, San Rafael; No de acceso EF593116, Tilapa; No de acceso EF593117, Coxcatlán). Los resultados del alineamiento y comparación de las

To assess the association between fruit characteristics and fruit health, a matrix of 270 columns (trees) and 13 rows (analyzed morphological characteristics) was constructed and analyzed by main components (ACP) (Rohlf, 1997). Resulting eigenvectors were used to identify the characteristics that contributed significantly to the grouping of individuals.

Effect of the fungus on pochote seed germination

Ten seeds from healthy fruits and ten from deformed fruits of each of the three pochote phenotypes. Seeds were disinfected with a 2% sodium hypochlorite solution, washed with sterile distilled water and transferred with forceps to Petri dishes lined with filter paper moistened with sterile distilled water. The Petri dishes were kept at laboratory temperature (25 °C/12 h light) until seeds germinated.

Determination of economic losses

Possible economic losses were calculated considering the incidence of the pochote macho individuals found, production and market price of the seeds.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of the fungus associated with pochote macho Isolation and culture in artificial media

A powdery brick-red mass and destroyed seeds were observed inside all of the fruits classified as pochote macho. This clearly contrasts with normal seed development in healthy fusiform fruits, in which this type of reddish powder was not observed.

Observation of the preparations under the microscope revealed a fungus with free, one-celled hyaline to yellowish, globose, oval and pillow-shaped spores 38 to 45 μm (N=83), truncate and occasionally with a small protuberance of the thick spore wall (Figure 2a). The spores were produced in short chains of short hyaline mycelia.

This fungus did not produce mycelia or spores in any of the media used, and thus, there is a possibility that it is a strict saprophyte that grows only in certain substrates, or an unknown parasite. No other class of fruiting bodies or spores different from those described on or in flowers, fruits or branches of the analyzed trees was observed. It is possible that in pochote macho, only an asexual or anamorphic phase occurs, and that the teleomorphic (sexual) phase occurs only under certain climatic conditions and in some unknown period.

Molecular characterization by sequencing polymerase chain reaction (PCR) products

Three sequences of PCR products of the fungus from pochote macho fruits were obtained, one per site,

tres secuencias obtenidas de las esporas separadas del interior de los frutos del pochote macho, con las disponibles en el GenBank, mostraron una identidad de 87 a 75% únicamente con los hongos *Crinipellis roreri* var. *roreri* (No de acceso AY230254.1) y *Moniliophthora roreri* (Número de acceso DQ222927.1). Sin embargo, a pesar de que el registro fue bajo y el error del alineamiento muy alto, se puede señalar que los porcentajes de identidad obtenidos son suficientes para establecer una relación taxonómica del hongo del pochote macho con estas dos especies.

Crinipellis pertenece a un gran orden de Basidiomycetes, los Euagaricales, con pocos patógenos conocidos. Producen cuerpos fructíferos del tipo basidiocarpo, mientras que *M. roreri* se consideró mucho tiempo como un anamorfo de ascomycetes, que produce sólo esporas (moniliasis) y ningún cuerpo fructífero conocido. A pesar de las aparentes diferencias físicas entre ambos hongos se ha confirmado que ambas especies están estrechamente relacionadas (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=12661>).

En las plantas de cacao, *C. roreri* vive dentro de las ramas y produce los síntomas de escoba de bruja (proliferación de flores y frutos) y eventualmente emergen basidiocarpos de color rosa de las ramas. *M. roreri* cubre los frutos del cacao con una capa algodonosa compuesta de micelio y esporas (pudrición gris o moniliasis) y nunca produce cuerpos fructíferos (Griffith *et al.*, 1994). Es posible que esporas del hongo encontrado en el interior de los frutos del pochote, descrito como pochote macho, pertenezcan a alguna especie relacionada con los géneros *Crinipellis* y *Moniliophthora*, por los daños observados en las plantas de pochote en campo (proliferación de flores y frutos, moniliasis o producción excesiva de esporas en el interior de frutos) y a la identidad de las secuencias obtenidas del hongo presente en sus frutos.

Establecimiento de la distribución del Pochote Macho en las zonas de aprovechamiento y su relación con algunas variables climáticas

Se observó que en el segundo nivel altitudinal se concentra la mayoría de los árboles de pochote macho (Cuadro 3). El análisis de ACP de los datos bioclimáticos de las zonas estudiadas reveló que no hay una diferenciación entre comunidades, pero sí entre gradientes altitudinales. Los dos primeros niveles son los más parecidos entre sí, por sus temperaturas más elevadas y menores precipitaciones (Figura 3).

Análisis morfológico de los frutos

El análisis morfológico mostró que los individuos macho son significativamente diferentes en siete de los

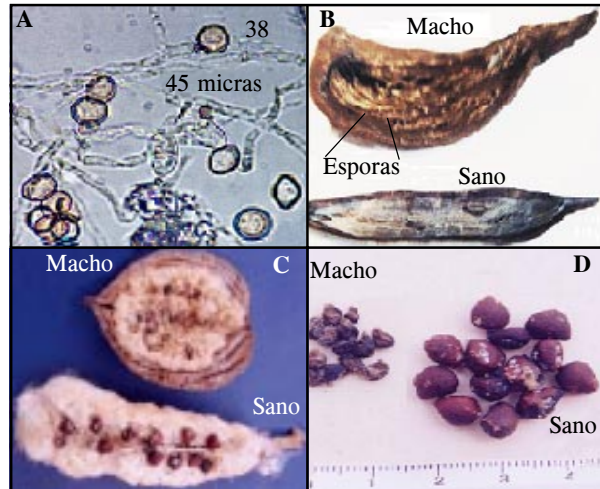


Figura 2. A) Esporas de un hongo encontrado en el interior de frutos de pochote macho. B) y C) Comparación de la morfología externa de frutos de pochote macho y sano. D) Comparación de los estados sanitarios de semillas procedentes de pochote macho y sano.

Figure 2. A) Fungus spores found inside pochote macho fruits. B) and C) Comparison of external morphology of pochote macho and healthy fruits. D) Comparison of health state of seeds from pochote macho and healthy fruits.

which were deposited in the GenBank (Access num. EF593115, San Rafael; Access num. EF593116, Tilapa; Access num. EF593117, Coxcatlán). The results of alignment and comparison of the three sequences obtained from the spores separated from inside the pochote macho fruit with those available in the GenBank showed 87 to 75% identity only with the fungi *Crinipellis roreri* var. *roreri* (Access num. AY230254.1) and *Moniliophthora roreri* (Access num. DQ222927.1). However, even though the register was low and the alignment error very high, the percentages of identity obtained are sufficient to establish a taxonomic relationship of the pochote macho fungus with these two species.

Crinipellis belongs to a large order of Basidiomycetes, the Euagaricales, with few known pathogens. They produce basidiocarp-type fruiting bodies, while *M. roreri* was long considered an anamorph of ascomycetes, which only produces spores (moniliasis) and no know fruiting body. In spite of the apparent physical differences between the two fungi, it has been confirmed that both species are closely related (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=12661>).

In cacao plants, *C. roreri* lives inside the branches and produces witch's broom symptoms (proliferation of flowers and fruits) and eventually rose-colored basidiocarps emerge from the branch. *M. roreri* covers the cacao fruit with a cottony layer composed of mycelia and spores (gray rot or moniliasis) and never produces

Cuadro 3. Incidencia del pochote macho en las comunidades y gradientes altitudinales estudiados. N= 270 árboles estudiados (90 por comunidad). Los datos están expresados como la razón entre individuos machos entre individuos sanos.
Table 3. Incidence of "pochote macho" in the communities by studied altitudinal levels. N=270 trees studied (90 per community). Data expressed as the ratio of diseased to healthy individuals.

Nivel altitudinal	Comunidad		
	Coxcatlán	San Rafael	San José Tilapa
	Razón entre individuos macho y sanos	Razón entre individuos macho y sanos	Razón entre individuos macho y sanos
800 a 1000 m	0:30	2:28	1:29
1000 a 1200 m	7:23	8:22	9:21
1200 a 1400 m	1:29	4:26	2:28
Total por comunidad	8:82	14:76	12:78

13 caracteres del fruto evaluados (Cuadro 2). Lo anterior se confirmó por el análisis de ACP, donde el componente uno, separa a los individuos por su estado de salud, mientras que el componente dos lo hace por su fenotipo (Figura 4), confirmando los resultados anteriormente descritos sobre la variación fenotípica (Avenidaño *et al.*, 2006). En el primer componente, los individuos macho se concentran del lado derecho de la gráfica, mientras que todos los sanos están en el lado izquierdo (Figura 4). Entre las características que diferencian a los frutos de los árboles machos, están su mayor grosor y diámetro en las cáscaras y frutos, se-

fruiting bodies (Griffith *et al.*, 1994). It is possible that spores found inside the pochote fruit described as pochote macho belong to a species related to the genera *Crinipellis* and *Moniliophthora* because of the damage observed on pochote plants in the field (proliferation of flowers and fruits, moniliasis or excessive spore production inside the fruit) and the identity of the obtained sequences of the fungus present in the fruit.

Determination of distribution of pochote macho in the areas of utilization and its relationship with climatic variables

It was observed that most of the pochote macho trees are concentrated in the second altitude level (Table

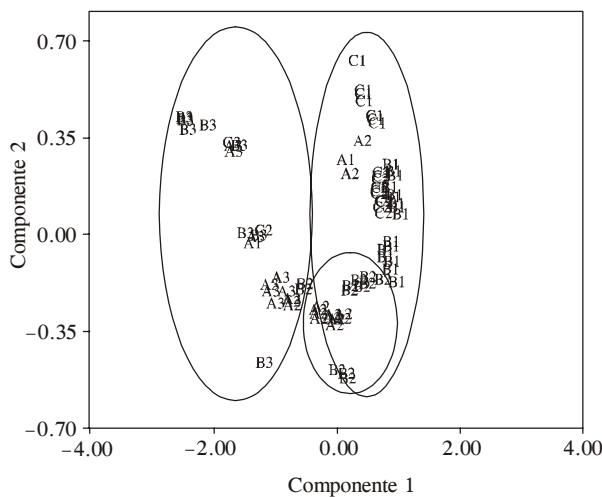


Figura 3. Análisis de los datos bioclimáticos de la zona de estudio, 19 columnas (variables) y 160 hileras (sitios). Las letras indican la comunidad de estudio A=Coxcatlán, B=San Rafael, C=Tilapa, mientras que el número al lado de la letra indica el nivel altitudinal: 1=800-1000 msnm, 2=1000-1200, 3=1200-1400.

Figure 3. Analysis of bioclimatic data of the study area, 19 columns (variables) and 160 rows (sites). Letters indicate the community: A=Coxcatlan, B=San Rafael, C=Tilapa, while the number beside the letter indicates the altitudinal level 1=800-1000 m, 2=1000-1200 m, 3=1200-1400 m.

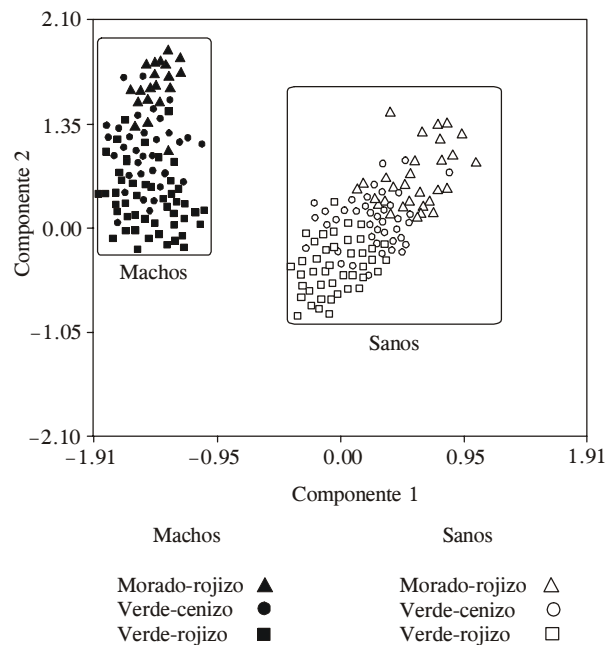


Figura 4. Análisis de componentes principales de 270 individuos (machos y sanos) y 13 características del fruto.

Figure 4. Analysis of main components of 270 individuals (pochote macho and healthy) and 12 fruit characteristics.

millas de menor tamaño y diámetro (Figuras 2 b, c y d) y pedúnculos más gruesos (Cuadro 4).

Efecto del hongo en la germinación de semillas de pochote macho

Se observó que las semillas de planta macho de los tres genotipos no germinaron. En contraste, el porcentaje de germinación obtenido para las semillas de los árboles normales fue 43% para el fenotipo verde-rojizo y 8% y 17% para los fenotipos verde pálido y morado.

Pérdidas económicas

Se determinó que el número de frutos es mayor en los individuos enfermos: en vez de uno o dos frutos por rama se presentaron de cuatro a ocho, pero éstos no son usados para el consumo ni comercialización de semillas. Dado lo anterior y que de cada árbol hembra o sano se recolectan cerca de 80 frutos, y si cada fruto produce en promedio 15 g de semilla (Cuadro 1), se perderían 1200 g de semillas por árbol macho. Se calculó por tanto que de cada diez árboles enfermos se pierden aproximadamente \$ 600 pesos al mes (Avendaño *et al.*, 2006).

La distribución de los pochotes macho sugiere que la incidencia en los dos primeros niveles altitudinales depende más de las actividades humanas que de las características climáticas. Así, a pesar de que los dos primeros pisos altitudinales son muy parecidos, los pochotes macho de los tres fenotipos son más abundantes en el segundo nivel (Cuadro 3), principalmente porque en el primer piso se cortan, por considerarlos

3). The ACP analysis of bioclimatic data from the studied areas revealed that there is no differentiation among communities, while among altitude levels differences do exist. The first two levels are more similar between them, due to their higher temperatures and lower rainfall (Figure 3).

Morphological analysis of fruits

The morphological analysis showed that pochote macho individuals are significantly different in seven of the 13 fruit traits evaluated (Table 2). This was confirmed with the ACP analysis where component one groups individuals by state of health, while component two groups do so by phenotype (Figure 4), confirming the results on phenotypic variation (Avendaño *et al.*, 2006) described above. With the first, the macho individuals concentrate on the left side of the graph, while all of the healthy individuals are on the right (Figure 4). Among the characteristics that differentiate the fruits of the macho trees are thicker shells and larger diameter of the fruits, while seeds show smaller size and diameter (Figures 2b, c and d) and peduncles are thicker (Table 4).

Effect of the fungus on pochote macho seed germination

It was observed that seeds from “macho” plants of the three genotypes did not germinate. In contrast, germination percentages obtained for seeds from normal trees were 43% for reddish-green and 8% and 17% for the pale green and purple phenotypes.

Cuadro 4. Eigenvalores para los tres primeros componentes principales del análisis de ACP, para 13 características del fruto de 270 individuos machos y sanos.

Table 4. Eigenvalues for the first three main components of the PCA analysis for 13 characteristics of the fruit from 270 diseased and healthy individuals.

Varianza acumulativa %	Característica del fruto	Eigenvalor
ACP1 39.371	1. Longitud de la semilla	0.900
	2. Diámetro de la semilla	0.871
	3. Grosor de la cáscara	-0.789
	4. Diámetro del pedúnculo	-0.787
	5. Diámetro del fruto	-0.681
ACP2 61.078	1. Grosor de la cáscara	-0.681
	2. Peso del fruto	0.736
	3. Número de semillas	0.573
	4. Longitud del fruto	0.554
	5. Diámetro del fruto	0.495
ACP3 69.218	1. Longitud del cáliz	-0.974
	2. Longitud del pedúnculo	0.159
	3. Longitud del fruto	0.147
	4. Peso del fruto	0.104
	5. Grosor de la cáscara	0.103

peligrosos para la salud y por ser inútiles para el consumo de la semilla (Avendaño *et al.*, 2006). En contraste, en el segundo nivel, donde se localizan las comunidades vegetales naturales (transformadas por la introducción de animales de carga y de pastoreo), se conservan los árboles macho como fuentes de leña. Ocasionalmente se cortan y queman los frutos en racimo para evitar que contagien a otros árboles.

En el tercer nivel altitudinal la frecuencia de los pochotes macho es muy baja, así, como la interacción del hombre con la especie y el medio donde se localiza debido a la distancia (2 h caminando) y a lo inaccesible de la zona. Según Avendaño *et al.* (2006), lo anterior sugiere que posiblemente las personas sean las causantes de la introducción y dispersión de los pochote macho, a través del aprovechamiento y manejo sobre la especie y el medio. Este supuesto se apoya también en lo reportado por Harlan (1995) de que las personas y los cambios climáticos han sido factores fundamentales en la inserción y distribución de enfermedades en los ambientes manejados (Crain y Pratt, 1995; Anderson *et al.*, 2004). Este fenómeno, conocido como contaminación patogénica, es además un indicador del estrés y disfuncionalidad de un ecosistema, el cual afecta no solo a los servicios que se obtienen de ellos, sino también la conservación de las especies silvestres (Crain y Pratt, 1995).

Las poblaciones naturales de Pochote pueden afectarse por la falta de viabilidad en las semillas de los pochotes macho, en su mayoría atrofiadas, de poco peso y tamaño (Figura 3d). Hasta el momento se desconocen los efectos en la estructura de la población en las zonas de mayor incidencia de los pochotes macho. En cuanto a las pérdidas económicas, la cifra de \$600 pesos mensuales calculada como pérdida, puede considerarse baja, pero adquiere significado cuando se relaciona con el hecho de que la mayor parte de la población de la región estudiada se mantiene con ingresos de aproximadamente dos salarios mínimos, por lo que obtiene ingresos y complementa su dieta a través de los productos de recolección, un ejemplo de los cuales es el pochote (Avendaño *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Se determinó que la proliferación de flores y frutos, así como la deformación de frutos y destrucción de semillas, que la gente reconoce como pochote macho, están asociados con la presencia de un hongo no descrito previamente en esta planta, el cual no produce cuerpos fructíferos conocidos, ni crece en medios de cultivo artificiales. El alineamiento y comparación de secuencias obtenidas por PCR de las regiones ITS1-ITS2 del ADN obtenido directamente de las esporas

Economic losses

It was determined that the number of fruits produced by diseased individuals is higher: instead of one or two fruits per branch, four to eight were produced. The seeds of these, however, are not consumed or sold. Given that from each healthy female tree nearly 80 fruits are collected, and if each fruit produces an average of 15 g seed (Table 1), each diseased tree represents a loss of 1200 g. It is thus calculated that \$600 pesos per month is lost for every 10 diseased trees at 2007 prices (Avendaño *et al.*, 2006).

The distribution of pochote macho trees suggests that their incidence in the first two altitudinal levels depends more on human activities than on climatic conditions. Thus, although the first two levels are very similar, the pochote macho trees of the three phenotypes are more abundant in the second level (Table 3), mainly because in the first level they are cut down since they are considered dangerous to health and do not produce edible seeds (Avendaño *et al.*, 2006). In contrast, in the second level, where natural plant communities exist (transformed by the introduction of grazing animals), pochote macho trees are conserved for firewood. Occasionally, they are cut down, and the racemes of fruits are burned to prevent them from spreading the disease to other trees.

In the third altitudinal level, frequency of the pochote macho trees is very low, as is the interaction between man and the species in this level because of the distance (2 h walk) and inaccessibility. According to Avendaño *et al.* (2006), this could suggest that humans are the agents of introduction and dispersion of pochote macho through use and management of the species and its environment. This assumption is also supported by Harlan (1995), who mentions that people and climatic changes have been fundamental factors in the insertion and distribution of diseases in managed environments (Crain and Pratt, 1995; Anderson *et al.*, 2004). This phenomenon, known as pathogenic contamination, is also an indicator of stress and dysfunction of an ecosystem, affecting not only the services it renders but also the conservation of wild species (Crain and Pratt, 1995).

Natural populations of pochote can be affected by the unviable pochote macho seeds, most of which are atrophied, lightweight and small (Figure 3d). The effects on the structure of the populations in areas of higher pochote macho incidence are still unknown. Regarding economic losses, the \$600 pesos estimated as the loss per month could be considered low, but it acquires meaning when we consider that most of the population of the region under study has incomes of approximately two minimum wages, and gathering wild

presentes en las plantas macho, mostró que este hongo tiene una identidad nucleotídica del 87 al 75% con los géneros *Crinipellis* y *Moniliophthora*, que en cacao causan síntomas similares a los encontrados en el pochote macho.

Se encontró que la viabilidad de las semillas de las plantas macho es nula. El monto de las pérdidas económicas ocasionadas por la inutilidad de las semillas para la comercialización es relativamente bajo, pero tiene alto impacto en los ingresos y la dieta de la población.

Se determinó que la distribución del pochote macho está relacionada con el manejo de la especie y no con los factores ambientales evaluados.

LITERATURA CITADA

- Anderson, P. K., A. Cunningham, N. Paten, F. Morales, P. Epstein and P. Dazzat. 2004. Emerging infectious diseases of plants, pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecol. and Evol.* 19 (10): 535-545.
- Avendaño, A., A. Casas, P., Dávila, and R. Lira. 2006. Use forms, management and commercialization of "Pochote" *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir (Bombacaceae) in the Tehuacán Valley, Central, México. *J. Arid Environ.* 67: 15-35.
- Barnett, H.L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS. St Paul, Minnesota. 240 p.
- Casas, A., A. Valiente-Banuet, J. Viveros, J. Caballero, L. Cortés, P. Dávila, R. Lira, and I. Rodríguez. 2001. Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Econ. Bot.* 55 (1): 129-166.
- Crain, J. R., and Jr. Pratt. 1995. The relationship between ecosystem health and delivery of ecosystem services. In: Rapport, D., J. Gaudet, and P. Calow. (eds). Evaluating and monitoring the health of large-scale ecosystem. Springer- Verlag. Berlin, Heidelberg. pp: 273-294.
- Dellaporta, S. L., J. Woods, and J.B. Hicks. 1983. A plant minipreparations, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Dugan, M. F. 2006. The Identification of Fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 176 p.
- Galindo, J. 1986. Enfermedades del cacao, importancia económica en América. *Rev. Mex. Fitopatol.* 4 (1): 76-88.
- Gibbs, P., and J. Semir. 2003. A taxonomic revision of the genus *Ceiba* Mill (Bombacaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 60 (2):295.
- Griffith, G., E. Bravo, F. Wilson, D. Lewis, and J. Hedger. 1994. Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. In: *Ecology of Plant Pathogens* Oxon: CAB International. pp: 245-267.
- Harlan, J. 1995. The living fields. Cambridge University press. Cambridge. United Kingdom. 288 p.
- Hanlin, T. R. 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. Vol. II. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. pp: 146-148.
- Lee, B. S., and J.W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M. A., Gelfand, J. J., Sninsky, and T. J., White, (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego. USA. pp: 282-287.
- López, A. G. 1981. Manejo de Hongos Fitopatógenos. Departamento Parasitología Agrícola. UACH. México. 135 p.
- Mugnier, J. 1998. Molecular evolution and phylogenetic implications of ITS sequences in plants and in fungi. In: Bridge, P., Y. products is then an important manner of obtaining income and complementing the diet; one example of this is gathering pochote (Avendaño *et al.*, 2006).

CONCLUSIONS

It was determined that the proliferation of flowers and fruits, the deformation of fruits and destruction of seed, recognized by the local human population as pochote macho, are associated with the presence of a fungus, not previously described, in this plant. The fungus does not produce known fruiting bodies nor does it grow in artificial culture media. Alignment and comparison of sequences obtained by PCR of the ITS1-ITS2 DNA regions obtained directly from the spores present in pochote macho plants showed that this fungus has an 87 to 75% nucleotide identity to the genera *Crinipellis* and *Moniliophthora*, which in cacao cause symptoms similar to those found in pochote macho.

It was found that pochote macho seeds are unviable. The economic losses caused by the unmarketable seeds are relatively low but are of high impact in terms of incomes and diet of the local population.

It was determined that the distribution of pochote macho is related to management of the species and not to the environmental factors evaluated.

End of the English version—



- Couteaudier, and J. Clarkson (eds). *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International. pp: 253-277.
- National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. 19 Noviembre 2007.
- Pearce, J., and D. Lindenmayer. 1998. Bioclimatic Analysis of Helmeted Honeyeater. *Restoration Ecology*. Vol 6(3): 238-243.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 p.
- Rohlf, J. 1997. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) version 2.0*, Manual Applied Biostatistics Inc., USA.
- Sarasola, A. A., y Ma R. De Sarasola. 1975. *Fitopatología. Curso Moderno. Hemisferio Sur*, Buenos Aires. Argentina. pp: 189-204.
- Sogin, L. M. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In: Innis, M.A., Gelfand, Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego. USA. pp: 307-314.
- SYSTAT. 1997. *Systat, version 7.0*. SPSS Inc. Chicago, IL, USA.
- Valiente-Banuet, A., A. Casas, A. Alcántara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, M del C. Arizmendi, J. Villaseñor, and J. Ramírez. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. México. D.F. pp: 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., Gelfand, Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego. USA. pp: 315-322.