

156
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA INFERENCIA FILOGENETICA COMO UNA
APROXIMACION A LA HISTORIA NATURAL DEL GENERO
DE HONGOS ENDOFITOS LOPHODERMUM CHEV.
(ASCOMYCOTA) EN DOS ESPECIES MEXICANAS
DE PINOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

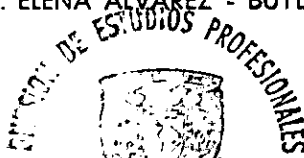
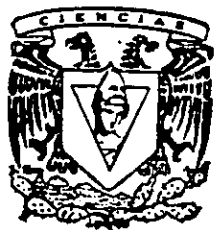
B I O L O G O

P R E S E N T A :

RODOLFO SALAS LIZANA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ELENA ALVAREZ - BUYLLA ROCES



1998

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

**TESIS CON
PALLA DE ORIGEN**

266804



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: La inferencia filogenética como una aproximación a la historia natural del género de hongos endófitos Lophodermium Chév. (Ascomycota) en dos especies mexicanas de pinos.

realizado por Rodolfo Salas Lizana

con número de cuenta 8934722-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces

Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Propietario

M. en C. Margarita Villegas Ríos

Suplente

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Suplente

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

La inferencia filogenética como
una aproximación a la historia natural
del género de hongos endófitos
Lophodermium Chév. (Ascomycota), en
dos especies mexicanas de pinos

Rodolfo Salas Lizana

1 9 9 8

Agradecimientos

Esta tesis fue financiada por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, en el proyecto IN212995.

A la Unión Forestal Zapoteco-Chinanteca (UZACHI) por permitirme coleccionar en su comunidad.

Al Recurso Micológico de Xiacuí (Oaxaca) por las facilidades para el procesamiento de algunas de las muestras.

Al personal del herbario de la Facultad de Ciencias, sección de Micología, muy especialmente a Margarita, Ricardo, Lupita y Joaquín.

A Nacho Chapela, por *presentarme* a los lophos.

A todos los miembros del Laboratorio de Genética Molecular y Evolución.

Una dedicatoria es una dádiva y todo el mundo sabe que el hecho de dar conlleva necesariamente el de recibir, todo regalo es a su vez un extender o un haber extendido las manos en un momento y unas circunstancias que eliminan por ellas mismas el tiempo, haciendo que todo se vuelva recuerdo y acaso incertidumbre. Así pues, este legajo, resultado de tantos dares y recibires, remotos y presentes, pertenece a una infinidad de hechos y personas, pero sobre todo, a mis padres y hermanas, mi familia; mis amigos de toda la vida Leonardo, Vladimir y Juan Manuel, a mi amigo y gurú Hugo y fundamentalmente al hecho terrible y hermoso de estar (¿o de ser?) vivo.

Sí, pero quién nos curará del fuego sordo, del fuego sin color que corre al anochecer por la rue de la Huchette, saliendo de los portales carcomidos, de los parvos zaguanes, del fuego sin imagen que lame las piedras y acecha en los vanos de las puertas, cómo haremos para lavarnos de su quemadura dulce que prosigue, que se aposenta para durar aliada al tiempo y al recuerdo, a las sustancias pegajosas que nos retienen de este lado, y que nos arderá dulcemente hasta calcinarnos.

Julio Cortázar, *Rayuela* 73:1.

De los cuatro puntos cardinales,
que son tres,
conozco dos:
el sur.

Aún en los lenguajes humanos no hay proposición que no implique el universo entero; decir *el tigre* es decir los tigres que lo engendraron, los ciervos y las tortugas que devoró, el pasto de que se alimentaron los ciervos, la tierra que fue madre del pasto, el cielo que dio luz a la tierra.

Jorge Luis
Borges, *El Aleph*.

Si decir *el tigre* es nombrar todo aquello que de alguna manera está en él, con la misma sencillez dialéctica debiera poder incluir en estas páginas todas aquellas maravillas de retina, martillo, piel, nariz y lengua, todo lo que de alguna manera ya está aquí: las lluvias de estrellas del desierto, el asombro de abrir los ojos, de oler el bosque, de comer: en la flor, el mercado, la madre tierra; comerse la Luna en la sierra de Oaxaca. Sentir el vértigo de un salto mortal en el caribe, de una cama de hospital, sentir la muerte y el beso, la corola, un clémiso. Aún más, ¿sería posible que a la mitad del método se describiera una luz crepuscular, diera la receta de un pastel o dibujara una espina con forma de cuernos, un caracol? ¿Cabría en la introducción un recorte de poema, una postal, un capítulo 84 que sólo fuera entendible leyendo el 125 que estuviera contenido en una palabra del último párrafo de esta tesis, cabrías tú? Sin duda sería un espectáculo digno de examen y nervios y colores y estómagos.

Me pregunto si algún día me será posible incluir el caos que antecede a las palabras en ellas mismas, los pensamientos que las carecen o el silencio desconcertante de un contrariado; si los límites sólo van por

fuera o si ahora mismo, la palabra que dudo en escribir, desenvolver, una que contiene los nombres de Margarita, Nacho, Leo, Dt, Vladímil, San Cristobal, Casar, Ana, Alita, Sábado, Hugo, Gelman, Don Giovanni, Toño!, Lupita, Sanmarianos, León, Ken, Elena, Alicia, Caroline, JLB, Ángeles, Kris P., Oaxaca, Leo y Floria, Anaí, Silvio, Héctor, Sofía, Selene, Nubia, MayPa, Eneida, Escárcega, Pedro Macario, Marco, Andrés K., Daniel, Rosaura, Pablo, la muerte, Víctor, Macedonio, Marcelino C., Adrián, Adriana, El Potosí, Pati, Los tártaros (Ezequiel, Jorge, Maynor, Carlos, Saúl e Hiram), Tarín, L. Toti, Gabriela, Oliverio, Mykes, el "bola", Xiacuí, Fátima, Sofía, Adriana, Sol, Lizana's, Galeano, Galeana, Zacatecas, Cortázar, Elia, Roberto K., Thompson y Gibson, Ana y Héctor, Andrés V., Doña Petra, Jeff y Dafne, Takao, Tachito, Det Vogler, Teresa, David G., Rodrigo V., Mario B., Huitzil y que pudiera o debiera ser tigre o ciervo o tortuga, cielo, luz u horizonte tiempo, mi propio nombre.

Êstes são meus poetas.
Carlos Drummond de Andrade

en madrugada en pleno su esplendor
quién sino yo como ginebras destruyendo a sus víctimas amadas
para dar luz a la indecisa claridad de sus mesas
quién sino yo con apellidos lujosas descripciones hechas para callar
o la palabra mesa las mentiras
los metros de mentiras para vestir los codos del borracho
los sastres están tristes pero se cose y canta
se miente en cantidad hermanos míos resulta bella la fealdad
amorosas las pústulas gran dignidad la infamia
al pájaro al cantor al distrito le han crecido reptiles
con asombro contempla su gran barbaridad
hurrah por fin ninguno es inocente
caballeros brindemos las vírgenes no virgan
los obispos no obispan los funcionarios no funcionan
todo lo que se pudre en ternura dará
miro mi corazón hinchado de desgracias
tanto lugar como tendría para las bellas aventuras
Juan Gelman, *Himno a la victoria (en ciertas circunstancias)*

Toda labor intelectual es una labor humorística.
Bernard Shaw

Siete mujeres se sentaron en círculo.
Desde muy lejos, desde su pueblo de Momostenango, Humberto Ak'bal les había traído
unas hojas secas, que él había recogido al pie de un árbol.
Cada una de las mujeres quebró una hoja, suavemente, contra el oído.
Una sintió un viento soplándole la oreja.
Otra, la fronda que se hamacaba.
Otra, un batir de pájaros.
Otra dijo que en su oreja llovía.
Otra escuchó los pasos de un bichito que corría.
Otra, un eco de risas.
Otra, un rumor de aplausos.
Humberto me lo contó, y yo pensé:
¿No será que las hojas muertas susurraron al oído de las mujeres, la memoria del árbol?
Eduardo Galeano, *El árbol*.

E assim escrevo, querendo sentir a Natureza, nem sequer
como um homem,
Mas como quem sente a Natureza, e mais nada.
E assim escrevo, ora bem, ora mal,
Ora acertando com o que quero dizer, ora errando,
Caindo aqui, levantando-me acolá,
Mas indo sempre no meu caminho como um cego teimoso.
Alberto Caeiro, *O guardador de rebanhos*, XLVI
(fragmento).

*La inferencia filogenética como una aproximación a la historia natural del género de hongos endófitos
Lophodermium Chév. (Ascomycota) en dos especies mexicanas de pinos*

C o n t e n i d o

Prolegómenos	1	<i>Extracción de DNA</i>	29
Introducción	2	<i>Amplificación del ITS total</i>	29
La inferencia filogenética	2	<i>Alineación de secuencias</i>	30
El cladismo y la inferencia filogenética	3	Caracteres combinados	32
<i>Métodos de análisis filogenético usando parsimonia</i>	5	Resultados	33
<i>Sobre el uso de matrices de caracteres combinados</i>	6	Observaciones microscópicas	35
<i>El método de grupo externo para orientar filogenias</i>	7	Descripción de ejemplares	35
Los caracteres moleculares en la inferencia filogenética	8	<i>Ascomas subepidérmicos</i>	35
<i>La alineación de secuencias y la homología</i>	9	<i>Ascomas subcuticulares</i>	37
<i>Los genes ribosomales y el espaciador interno transcrito (ITS)</i>	10	<i>Ascomas subhipodérmicos</i>	38
Otras controversias	11	Inferencia filogenética	43
Historias naturales I: los pinos	13	Caracteres morfológicos	43
Los pinos mexicanos	13	Caracteres moleculares	44
<i>Pinus ayacabuite</i> Ehren.	15	Matriz de caracteres combinados	48
<i>Pinus montezumae</i> Lamb.	16	Distancias y tasas de evolución	49
Historias Naturales II: los hongos endófitos	17	Discusión	51
El endofitismo	17	La especificidad de <i>Lophodermium</i>	52
<i>Taxonomía y Ecología de los hongos endófitos</i>	18	Mapeo de caracteres morfológicos	54
<i>De la colonización y el mutualismo</i>	18	¿Evidencias con implicaciones ecológicas?	56
<i>La Fisiología de la interacción endófito</i>	19	Otras consideraciones	57
El género <i>Lophodermium</i> Chév	20	Conclusiones	59
Objetivos	24	Referencias	60
Materiales y Métodos	25	Apéndice	65
Planteamiento del Método	25	Protocolos	70
Colecta de <i>Lophodermium</i>	26		
Cultivo	27		
Observaciones microscópicas	28		
Obtención de caracteres para la inferencia filogenética	28		
Caracteres morfológicos	28		
Caracteres moleculares	29		

**Abreviaturas comúnmente
utilizadas**

AFLP	Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción Amplificados.
CI	Índice de Consistencia.
DNA	Ácido Desoxi-Ribonucleico.
ETS	Espaciador Externo Transcrito
Indel	Inserción-Delección. Sinónimo de <i>gap</i> .
ITS	Espaciador Interno Trascrito.
MGE	Método de Grupo Externo.
N	Nucleótido no identificado.
NTS	Espaciador No Transcrito.
OTU	Unidad Taxonómica Operacional.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PAUP	Análisis Filogenéticos Usando la Parsimonia (Phylogenetic Analysis Using Parsimony).
PVP	Alcohol polivinílico
RAPD	Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción de Amplificaciones al Azar.
RC	Índice de Consistencia Reescalado.
rDNA	DNA ribosomal.
RFLP	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción.
RI	Índice de Retención.
RNA	Ácido Ribonucleico.
S	Svedbergs
ssu	Subunidad ribosomal pequeña (5S; small sub-unit).

Prolegómenos

En 1994, Smith y Klein reportaron una hipótesis filogenética basada en secuencias de la subunidad 18S y del espaciador interno transcrito de DNA ribosomal (rDNA) para el género *Picea* de coníferas, tiempo después Liston y Álvarez-Buylla (1995) notaron que dichas secuencias en realidad pertenecían a hongos filamentosos de la División Ascomycota. Las relaciones filogenéticas inferidas a partir de dichas secuencias eran congruentes, en cierta medida, con las encontradas por Sigurgeirsson y Szmidt (1993) para las mismas especies de *Picea* utilizando los fragmentos de restricción del DNA de cloroplasto como fuente de caracteres, por lo que no se trataba de un simple accidente de contaminación, seguramente los hongos venían de las hojas que se utilizaban durante la extracción de DNA. No podían venir de la superficie de las acículas porque se esterilizaban, así que debían provenir del interior de éstas. La topología de la filogenia hecha con estos hongos sugería cierta especificidad hacia su hospedero, las diferentes especies de *Picea*. Este resultado sugería la hipótesis de que ambos grupos de organismos pudieran haber coevolucionado o, al menos, coespeciado (figura 1).

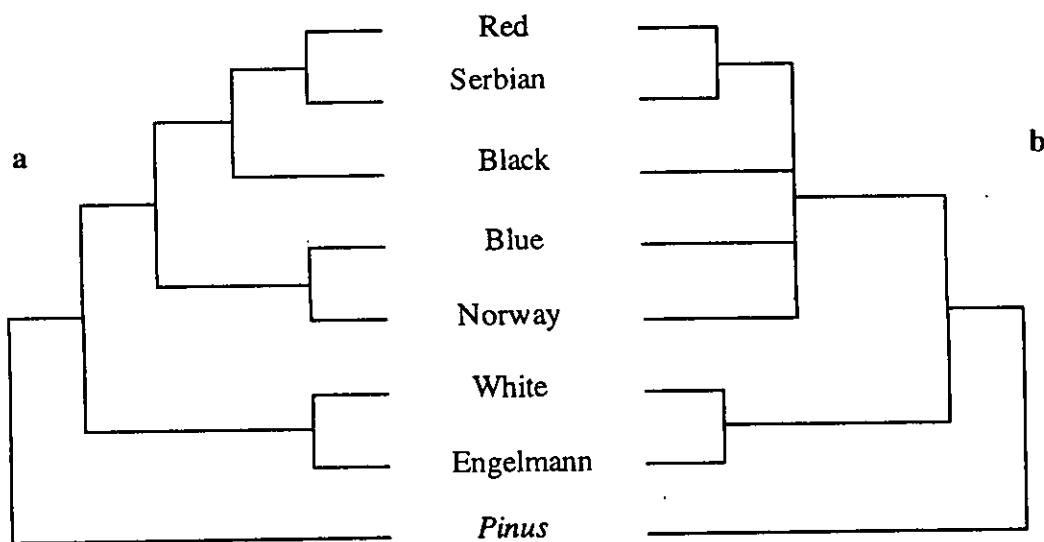


Figura 1. Comparación de la filogenia para *Picea* reconstruida con a) Fragmentos de restricción de DNA de cloroplasto (Sigurgeirsson y Szmidt, 1993) y b) con secuencias de rDNA de hongos (Smith y Klein, 1994). Nótese la congruencia de los clados resultantes.

De esta manera surgió el proyecto “Filogenia molecular y especificidad de hongos endófitos en el género *Pinus* L.” (Álvarez-Buylla y Espinosa-García, 1996; del cual forma parte esta tesis), en donde se pretenden evidenciar patrones coevolutivos existentes entre los hongos endófitos y los pinos con diferentes aproximaciones. Dentro de este proyecto, el trabajo de Vázquez Lobo (1996) ha implementado las técnicas necesarias para la extracción y amplificación de rDNA de hongos endófitos y ha demostrado que existe especificidad a nivel de subgénero de pinos para un universo de hongos endófitos no identificados.

Por su parte, esta tesis busca evidenciar la especificidad de un género de hongos endófitos¹, *Lophodermium* Chév., en representantes de cada uno de los dos subgéneros de *Pinus* L. de coníferas, sus hospederos. El punto de partida es la reconstrucción de la filogenia de los primeros con base en caracteres moleculares y morfológicos. Al mismo tiempo, contribuye en alguna medida con la incipiente exploración de la diversidad de este género de hongos en los pinos de México, así como a su sistemática.

En la introducción a este trabajo se da una breve explicación de lo que la inferencia filogenética refiere, con especial énfasis en la utilización de caracteres moleculares y la utilización de matrices con caracteres combinados. También se habla de las historias naturales de los pinos y hongos endófitos y finalmente resalta la utilización de la inferencia filogenética como aproximación a las historias naturales que están relacionadas a niveles ecológicos y quizás evolutivos.

¹ Ver más adelante en el texto para una discusión sobre el término *endófito*.

Introducción

Todo lenguaje es un alfabeto de símbolos cuyo ejercicio presupone un pasado que los interlocutores comparten.

JLB, *El Aleph*.

La inferencia filogenética

De una manera simple, la evolución se puede definir como los cambios que han ocurrido en las especies a lo largo del tiempo (Richards, 1992), de tal modo que es posible distinguir dos elementos importantes en ella; uno de ellos son los cambios por sí mismos (los procesos por los que suceden) y el otro se refiere únicamente a la descripción histórica, resultado de los cambios mencionados. Si se conocieran los procesos por los cuales las especies cambian, entonces la historia de los cambios debería ser cognoscible; sin embargo, aún no se ha escrito la última palabra a este respecto.

Por otra parte, está claro que el pasado de alguna manera ha devenido en el presente, es decir, existe conectividad entre ellos; de tal forma que el conocimiento adquirido a partir de los hechos del presente puede generar premisas que serían aplicables para conocer del pasado. Dicha conexión es un continuo de posibilidades epistemológicas, premisas de posibles principios y posibles subsecuentes, de modo que el pasado es cognoscible en la medida que las propiedades contingentes del proceso evolutivo nos lo permitan (Sober, 1993). En otras palabras, el pasado puede descubrirse hasta donde el conocimiento empírico de sus procesos, o el resultado de ellos, llegue; el método que se utilice para inferir el pasado debe corresponder con los supuestos hasta ahora conocidos de los procesos evolutivos (Sober, 1988).

La inferencia filogenética, como un método para conocer el pasado, trata de resolver las relaciones filogenéticas (la descripción histórica de ellas) existentes entre la diversidad de los organismos (Sober, 1988), es utilizada ampliamente en la biología evolutiva actual y puede tener como base epistemológica al cladismo.

El cladismo y la inferencia filogenética

En biología, el cladismo es un método que se usa para reconstruir genealogías de los organismos y construir clasificaciones; sin embargo, también es una aproximación generalista que permite organizar cualquier información comparada, como la lingüística y la biogeográfica. Por lo general, la organización de las relaciones que guarda dicha información es representada en un diagrama con forma de árbol o cladograma.

La homología o las hipótesis de homología son las premisas de conectividad entre el pasado y el presente para los cladistas, es decir, la manera en que las relaciones históricas entre los objetos biológicos de estudio pueden descubrirse. Por ello, siempre que se habla de homología hay que establecer a qué es homólogo aquello de lo que se habla y el nivel jerárquico al cual se da dicha homología. Cabe resaltar aquí que toda homología, como un tipo especial de similitud cuyo origen está en la ancestría común y cercana, parte del parecido entre los objetos de estudio, es decir de las similitudes en una versión amplia. Con el fin de que el lenguaje a este respecto fuera más preciso, Hennig (1966) distinguió varios tipos de similitud, así, la similitud entre los caracteres puede ser ancestral o reciente, plesiomórfica o apomórfica, respectivamente. Si la similitud entre los caracteres es ancestral y es compartida por algunos descendientes, se trata de simplesiomorfias y si es reciente, derivada y compartida por los descendientes se llama sinapomorfia. Si hay similitudes que surgieron a partir de convergencia evolutiva o de paralelismo se trata de homoplasias (Farris, 1983).

El cladismo supone que la relación más cercana depende también de la ancestría más cercana, que en sí misma es determinada solamente por las sinapomorfias en los organismos estudiados, las plesiomorfias no pueden indicar relaciones entre los grupos. Asimismo, la congruencia de caracteres es para los cladistas el criterio decisivo para distinguir a la homología (sinapomorfia) de la homoplasia, como lo es el principio de parsimonia para maximizar la congruencia de los caracteres (Scotland, 1992).

Los tipos de similitudes de que se habla son interpretados con base en el principio de la parsimonia. El principio de parsimonia es anterior al cladismo, supone en su más puro nivel que, de entre dos o más hipótesis que resuelvan un problema, la que sea más sencilla es la que debe considerarse (Rieppel, 1988). En el cladismo, la parsimonia sencillamente es la idea de que las similitudes derivadas son evidencia de relaciones entre los objetos de estudio y de que las ancestrales no lo son en el nivel ulterior (Sober, 1992); por lo que la parsimonia es el criterio para elegir entre hipótesis igualmente sustentadas por la evidencia empírica.

Por otra parte, el cladismo distingue a los grupos que incluyen a todos los descendientes de un ancestro común como grupos monofiléticos, a los que no incluyen a todos como parafiléticos, (Hennig, 1966) y a los grupos cuyo ancestro más anterior ha sido asignado a otro grupo y no al mismo como grupos polifiléticos (Farris, 1977; en Forey *et al.*, 1992). Cabe anotar el cuidado que debe tenerse al emplear estos términos, pues la ancestría común es algo que está por descubrirse y entonces resulta imposible o impropio hablar de grupos con ancestría común sin el análisis ulterior (Platnick, 1979; Patterson, 1982).

Métodos de análisis filogenético usando parsimonia

Siguiendo con lo expuesto anteriormente sobre la inferencia y la parsimonia, se han generado varios algoritmos para la búsqueda de filogenias basados en el principio de máxima parsimonia. Esto, concretizado en la construcción de cladogramas, es el buscar la filogenia con el menor número de cambios posibles de un carácter a otro (Hillis *et al.*, 1996). El uso de cada uno de los métodos para la construcción de árboles depende del paquete computacional que se utilice y del número de caracteres y unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés) que se tengan para el análisis. El programa PAUP v. 3.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Swofford, 1993), que es quizás el mayormente utilizado, tiene varias opciones de búsqueda de filogenias, dependiendo de las necesidades del usuario.

Cuando se tienen pocos OTUs (once como máximo) se puede realizar una búsqueda *Exhaustiva*, que busca en todas las topologías posibles al árbol más parsimonioso. Este tipo de búsqueda comienza por generar la única topología posible con los primeros tres OTUs de la matriz, para luego adicionar el siguiente OTU a cada una de las ramas del árbol inicialmente construido, generando tres topologías diferentes a las cuales se adiciona el siguiente OTU, produciendo a su vez los árboles correspondientes hasta aglutinar a todos los OTUs, entonces se cuentan los pasos requeridos para cada topología y se retienen el o los árboles más parsimoniosos.

Cuando se tienen más de once OTUs se puede elegir una búsqueda llamada *Branch and Bound*, que es muy parecida a la anterior, sólo que evalúa las topologías mientras las genera, es decir que si en la adición del siguiente OTU se obtiene una topología con mayor número de pasos que en cualquier otra generada al momento, la búsqueda borra esos árboles de la memoria y continúa con otra topología más parsimoniosa.

Cuando se tienen matrices muy grandes no es posible hacer una búsqueda precisa y se utilizan algoritmos con aproximaciones heurísticas, que, aunque disminuyen la precisión del análisis, minimizan el tiempo computacional y en muchos casos hace posible el análisis mismo (Swofford, 1993). Este método consiste en la construcción azarosa de un árbol sobre el cual se hacen rearrreglos para disminuir el número de pasos en él; cuando esto ya no es posible la búsqueda se detiene y genera el o los árboles más cortos que encontró. Con este método se corre el riesgo de no obtener el árbol más parsimonioso, por lo que se recomienda hacer varios análisis con diferentes topologías como partida, en diferentes órdenes de adición de ramas o con otras condicionantes de búsqueda.

Existen algunas pruebas estadísticas diseñadas para estimar la robustez de la filogenia que se obtiene. Una de ellas es el llamado *Bootstrap* (Li y Zharkikh, 1994) que es una técnica de muestreo o submuestreo consistente en generar el error por muestreo que pudiera haber en la matriz original de caracteres. Lo anterior se logra submuestreando y

reemplazando caracteres de cualquier OTU por datos al azar, generando una matriz diferente a la original y realizando nuevamente la búsqueda filogenética, lo que corresponde a una réplica de *bootstrap*. Por lo general se hacen cien o mil réplicas, aunque no hay un número límite para ellas. Al final se obtiene un árbol que representa el consenso de todos los encontrados en cada una de las réplicas con un número en cada internodo que corresponde al porcentaje de topologías en los cuales ese clado permaneció igual. En teoría, los valores de *Bootstrap* más altos le dan una confiabilidad igual al árbol; aunque se sabe que no se pueden tener como un porcentaje de confianza estadística (Sanderson, 1995).

Además, existen índices descriptores de los árboles obtenidos, que también pueden ser interpretados para estimar la confianza en ellos. El índice de consistencia o índice de homoplasia total (CI), estima la sumatoria del menor número de cambios de estado en cada carácter entre la sumatoria del número de cambios vistos, cuando el CI es igual a uno, se dice que no hay homoplasia; tiene la desventaja de ser sensible a los caracteres no informativos, lo que hace aumentar el CI. El índice de retención (RI; Farris, 1988) refleja la cantidad de sinapomorfia calculando la homoplasia, sin tomar en cuenta los caracteres no informativos, el valor del RI es alto cuando la mayoría de los cambios están en las ramas basales y es bajo cuando la mayoría de los cambios están en las ramas terminales. Finalmente, el índice reescalado de retención (RC; Farris, 1989) que es el producto del CI por el RI; cuya interpretación no ha sido explícita (Archie, 1996).

Sin embargo, la única manera de saber si una filogenia es lo suficientemente robusta es corroborándola o refutándola con los mismos principios utilizados para construirla, es decir, con la adición de más caracteres o de más OTUs (y el reanálisis de la nueva matriz). A este respecto, la generación de matrices combinadas de caracteres (también llamadas de evidencia total) puede ser una manera de ejercer el falsacionismo y la parsimonia en el contexto cladista cuando se prueban hipótesis filogenéticas.

Sobre el uso de matrices de caracteres combinadas

Existe una cierta controversia acerca del uso de matrices combinadas (Luckow y Bruneau, 1997), se ha dicho que los atributos biológicos cuya evolución se está estudiando no deben incluirse en las matrices sobre las cuales se está haciendo el análisis filogenético, aduciendo que se trata de una circularidad en el tratamiento del problema (Coddington, 1988), que se *sesga* el análisis utilizando caracteres ecológicos o con presunta significación adaptativa (Brooks y McLennan, 1960) o que se corre el riesgo de *circularidad* si los cladogramas se contruyen con datos que *no* son independientes de los ecológicos a analizar (Armbuster, 1992). Por lo anterior, es muy común que se evite incluir en una misma filogenia caracteres moleculares y morfológicos y se decida "mapear" los caracteres morfológicos sobre la filogenia molecular sin

incluirlos o simplemente comparar filogenias construidas con diferentes tipos de datos con métodos específicos para estos menesteres (Brooks, 1981). Algunos de los problemas con la segunda aproximación son: la asimetría en el número de caracteres, la confiabilidad en los datos moleculares, la homoplasia en los datos morfológicos, la resolución de los árboles, o que se empleen técnicas de consenso inapropiadas. (Eernise y Kluge, 1993).

Por otra parte, el mismo análisis cladista puede ser una herramienta poderosa que pruebe las hipótesis *a priori* sobre transformaciones históricas cuando los atributos necesarios se incluyen desordenadamente (De Pinna, 1996). Además, el incluir datos provenientes de varias fuentes o cuyos atributos quieran probarse, permite que las sinapomorfias (como única prueba histórica de adaptación) minimicen las hipótesis homoplásicas *ad hoc* (Kluge, 1997), lo que, dicho sea de paso, sigue la lógica del análisis parsimonio cladista (Farris, 1983) al maximizar el poder explicativo de la evidencia con simplicidad.

Un argumento fuerte para el uso de las matrices combinadas es que cada uno de los caracteres tiene un determinado *valor* filogenético en niveles diferentes que pueden ser complementarias entre los caracteres morfológicos y moleculares (De Quiroz *et al.*, 1994; Eernise y Kluge, 1993).

A este respecto, se ha escrito sobre la congruencia de caracteres en las matrices combinadas (Doyle *et al.*, 1994; Eernise y Kluge, 1993, Sanderson y Donoghue, 1989) y sobre las maneras de probar la robustez de este tipo de matrices: el PTP (*Permutation tail probability*; Faith y Cranston, 1991), el índice de soporte total (*Total Support Index*; Brewer, 1994; Kälesjö, 1992) y el índice de decaimiento o de soporte de las ramas (*Decay or Branch support index*; Brewer, 1994), entre otros.

Finalmente, es claro que el cladograma no debe estar basado únicamente en caracteres que involucren hipótesis de adaptación, sino que preferentemente debe ser corroborado o refutado por caracteres adicionales. También resulta de vital importancia el planteamiento de las preguntas a resolver, pues de ellas depende en gran parte la *circularidad* y no de los caracteres que se utilicen, mucho menos del análisis cladista (Luckow y Bruneau, 1997; Kluge, 1997).

El Método de Grupo Externo para orientar filogenias

El método de grupo externo (MGE) es utilizado en la sistemática para polarizar caracteres. Sin embargo, la manera en que opera y por lo tanto, la base lógica para su utilización permanecen sin mucha investigación al respecto (De Pinna, 1996). Existen trabajos que opinan que el MGE opera polarizando caracteres individualmente cuando todos los caracteres del grupo externo se vuelven plesiomórficos (Nelson y Platnik, 1981; Kitching, 1992). También se ha dicho

que sirve para enraizar filogenias localizando el sitio de la topología donde se encuentra la raíz con una explicación parecida a la anterior (Scotland, 1992; Williams, 1992). Otros más aducen que más bien funciona orientando las ramas del cladograma sin aportar nueva información sobre la polarización de caracteres o el enraizamiento *pero* revelando grupos monofiléticos (De Pinna, 1994; Weston, 1994).

Una revisión reciente del método, Keller (1998) descubre que ni la polarización individual de caracteres, ni el enraizamiento de filogenias son el resultado directo de la utilización del MGE, sino consecuencia de lo que realmente ocurre cuando se le utiliza: la optimización de la filogenia mediante su orientación. En otras palabras, cuando se utiliza un grupo externo se descubren grupos monofiléticos por contrastación con éste (Sober, 1988) e, indirectamente, se revelan raíces *parciales* y se polarizan los caracteres del grupo interno, exclusivamente (Keller, 1998).

Los caracteres moleculares en la inferencia filogenética

Como se refirió anteriormente, el cladismo puede utilizar cualquier información comparada y organizarla según sus principios, por lo que la utilización de datos moleculares en la construcción de filogenias no sólo es muy popular, sino que crece día con día.

La homología significa parecido por ancestría común, al tratarse de biología comparada la homología es el concepto central, sin embargo, ésta no puede descubrirse *a priori* (Williams, 1992). En la sistemática molecular pueden *descubrirse* diferentes niveles de homología. Por ejemplo, hay relación entre los genes de un mismo genoma, además hay una correspondencia entre los aminoácidos y/o las secuencias de nucleótidos dentro de los genes individuales, generando todas ellas caracteres potencialmente informativos (Forey *et al.*, 1992).

En la sistemática molecular temprana, la homología era equivalente a la similitud (Patterson, 1988). Pero aún cuando dos secuencias fueran muy parecidas entre sí, digamos un 95%, existe la posibilidad de que muchos de esos caracteres sean homoplásicos o que no sean útiles en la inferencia filogenética (p.e. si se trata de simplesiomorfias o autoapomorfias). Asimismo, existen diferentes fuentes de datos utilizables como fuente de caracteres en la reconstrucción filogenética, como el Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP; Sagahai Maroof *et al.*, 1995; Dowlin *et al.*, 1996), el Polimorfismo en la Amplificación al azar de DNA (RAPD; Williams *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1993) y la secuenciación de nucleótidos (Gardes *et al.*, 1993; Berbee *et al.*, 1992). Todos ellos pueden aportar información diferente, por lo que su uso debe corresponder a los objetivos o los planteamientos iniciales del problema que se quiera resolver.

En la sistemática molecular existen tipos particulares de homología entre las secuencias: las secuencias ortólogas (Fitch, 1970) son secuencias homólogas que reflejan la descendencia de las especies en tanto que la duplicación que les da origen ocurre justo antes de un evento de especiación, es la equivalencia a los caracteres sinapomórficos en morfología. En contraste, las secuencias parálogas (Fitch, 1970) son secuencias homólogas que reflejan la historia del gen y pueden coexistir en un mismo organismo, se trata de secuencias que se duplican independientemente al evento de especiación. También existen otros tipos de secuencias, como las xenólogas (Gray y Fitch, 1983) que son *adquiridas*, es el caso de decirlo, mediante la transferencia horizontal de genes, por lo que mostrarían resultados incongruentes en una filogenia (como si se tratara de homoplasias en caracteres morfológicos); y las plerólogas (Patterson, 1988), que son secuencias parálogas cuya similitud está dada por la transformación de secuencias, consecuencia de la evolución concertada (Zimmer *et al.* 1980).

La alineación de secuencias y la homología

Tratándose específicamente de la alineación de secuencias de nucleótidos para la obtención de caracteres, debe resaltarse que el apareamiento de cada una de las bases es una hipótesis de homología (homología de posición), por lo que el algoritmo de alineación que se utilice debe ser lo suficientemente poderoso como para lograr la mejor alineación posible. Esto es, durante la alineación de secuencias, existen bases apareadas que coinciden exactamente y otras que no; asimismo, existe un tercer caso en donde se encuentran nucleótidos que no son alineados con los de la secuencia o las secuencias que se comparan, generando un "hueco" en estas últimas (fig. 2). Dicho hueco recibe el nombre de "indel" (apócope de inserción/delección)¹ porque a este nivel es imposible decir si el "hueco" generado en la secuencia que no se alinea es una inserción en ésta o una delección en las otras. Resulta claro que cualquier nucleótido que no tenga correspondencia en alguna de las secuencias con las que se le compara podría convertirse en un "indel". Así pues, la mejor alineación es aquella que equilibre el número de "indels" con el de nucleótidos apareados pero diferentes.

¹ También conocidos como *GAP* en textos anglosajones.

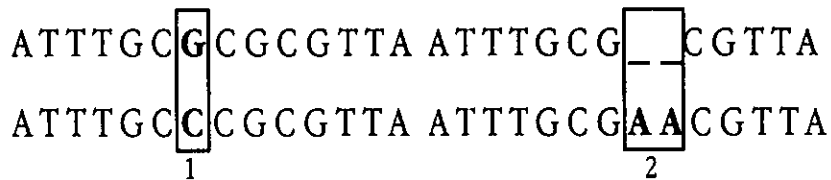


Figura 2. Alineación de dos secuencias de nucleótidos en donde se muestran aquellos que están alineados sin corresponder (1) y aquellos cuya alineación produce un "indel" (2).

Un algoritmo que busca la generación de alineaciones con las propiedades antes mencionadas es el desarrollado por Thompson, Higgins y Gibson (1994), que consiste en la alineación por separado de todas las secuencias por pares, a partir de la cual se construye una matriz de distancias y se calcula el grado de divergencia de las secuencias; después se erige un "árbol guía" (un árbol construido a partir de distancias) y se alinean todas las secuencias progresivamente de acuerdo a las relaciones que el árbol construido refleja. Debido a que el algoritmo puede conservar preferentemente "indels" de las secuencias más parecidas y alinear sobre ellos a las que lo son menos, generando errores, es necesario revisar visualmente la alineación.

Los genes ribosomales y el espaciador interno transcrito (ITS)

La familia de los genes ribosomales es una de las más utilizadas para la sistemática molecular y en particular de los hongos (p.e. Bruns *et al.*, 1991; Briard *et al.*, 1995; Jaslavich *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 1995), se trata de genes parálogos dispuestos en serie dentro de un mismo genoma (figura 3). A pesar de tratarse de genes parálogos, su uso es factible porque presentan evolución concertada (Zimmer *et al.*, 1980). Es decir, un proceso por el que existen muchos loci relacionados en los cuales las secuencias repetidas se homogeneizan tal que las relaciones de ortología/paralogía se enmascaran. En familias de genes completamente concertadas, como la de los genes ribosomales, los genes parálogos dentro de un individuo son más similares entre ellos que con sus presumibles ortólogos en los individuos de otras especies, haciéndolos parecer derivados por descendencia reciente más que por una duplicación ancestral. Los mecanismos principales responsables de la evolución concertada son: i) la recombinación desigual en secuencias repetidas contiguas y ii) la conversión génica que no está limitada a las secuencias contiguas (Li y Graur, 1991).

El uso extendido de los genes ribosomales en la sistemática molecular se debe a que en la misma región del genoma se pueden encontrar secuencias muy conservadas y otras altamente variables, lo que permite hacer aproximaciones filogenéticas a diferentes niveles jerárquicos. Su estructura (figura 3) los hace de fácil clonación, pues se

pueden anclar *primers*² "universales" (i.e. que pueden ser utilizados en organismos muy diversos) que lo mismo son utilizables para amplificar las subunidades ribosomales que los espaciadores flanqueándolas.

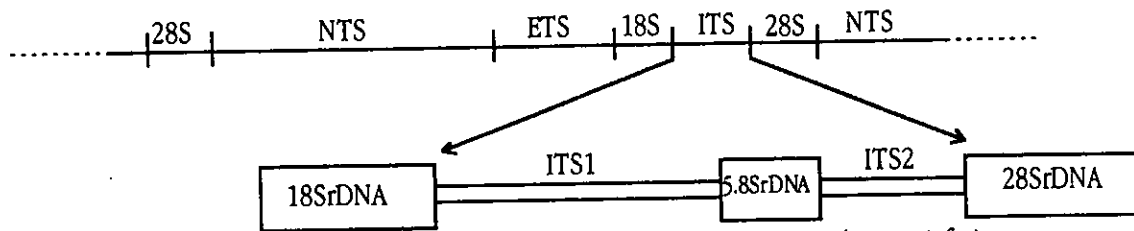


Figura 3. Disposición de los genes ribosomales y sus espaciadores en el genoma. En la parte inferior se representa con más detalle la región del ITS. El esquema no es proporcional a los tamaños reales; rDNA: DNA ribosomal; NTS: espaciador interno no transcrito; ETS: espaciador externo transcrito.

El ITS está constituido por dos regiones traducibles no codificantes llamadas ITS1 e ITS2, localizadas a ambos lados de la subunidad ribosomal pequeña (ssu rDNA), todo lo anterior en conjunto es llamado el ITS total (ITS1, ssu rDNA e ITS2).

Para el caso particular de los hongos, el ITS ha sido utilizado para distinguir entre géneros diferentes e incluso entre especies de un mismo género (Gardes y Bruns, 1993). Por lo general tienen una longitud de 600 a 800 pares de bases (pb), lo que permite su secuenciación completa.

Cabe señalar que dentro del genoma fúngico son muy comunes los intrones, secuencias de variable tamaño que se integran en el genoma interrumpiendo genes o aumentando su longitud, se conocen de dos tipos. Los intrones del tipo uno pueden transmitirse vía horizontal, mientras que los del tipo dos se transmiten sólo por vía parental (Voet y Voet, 1995).

Otras controversias

Los grandes avances en biología nos han permitido analizar directamente la variación genética para la reconstrucción filogenética. Muy por el contrario de convertirse en una panacea, la sistemática molecular ha engendrado nuevas controversias (Doyle, 1996). Una de ellas es la de inferir filogenias de organismos a partir de filogenias de genes.

² También llamados sondas o cebadores en algunas traducciones.

A este respecto, Roth (1991), señala la desconexión existente entre estos niveles de organización y la dificultad de extrapolar información de uno nivel a otro. Por ejemplo, la utilización de genes redundantes o de genes involucrados en la ontogenia, en donde las redes de interacciones entre ellos "desconecta" el nivel genético con el nivel morfológico. En resumen, los genes y la morfología no tienen una relación directa; por lo general, los genes interactúan entre ellos y sus productos antes de dar como resultado una morfología dada. Además, la homoplasia en la función de los genes está póbaramente relacionada con la homoplasia total del árbol construido con el gen.

Por otra parte, la influencia de la evolución concertada en la homoplasia de árboles de genes depende del grado al cual opere. Cuando la evolución concertada homogeneiza las secuencias completamente y todas las copias de un gen dado son iguales dentro de una especie, entonces la familia completa actúa como si fuese una sola. En tales casos, la homoplasia todavía puede estar presente debido a paralelismo y a errores en la alineación. La probabilidad para fijarse de cualquier secuencia dada debe ser la misma, sea o no un estado homoplásico cuando se la compara con un carácter homólogo en otro grupo de arreglos homogeneizados.

Todo lo anterior adquiere un significado más práctico desde que la primera aproximación a los organismos y aún su identificación siguen siendo mayormente desde el punto de vista morfológico.

Historias naturales I: los pinos

Los pinos mexicanos

Los pinos son plantas gimnospermas perennes con unas 90-120 especies (Perry, 1991) y comprenden un grupo natural bien separado de otras coníferas. Son nativos solamente del hemisferio norte, con la excepción de una especie, *Pinus merkusii*, que se encuentra al sur del ecuador, en Sumatra. Los pinos están excelentemente distribuidos en zonas boreales o frías aunque con poca diversidad de especies, mientras que en zonas montañosas más tropicales la distribución es limitada y contrastante con la gran diversidad de especies (McCune, 1988): México es un centro de diversificación de los pinos (Styles, 1993), aquí existen entre 43 y 51 especies y taxa infraespecíficos (dependiendo del autor), casi la mitad de las especies de pinos conocidas en todo el mundo.

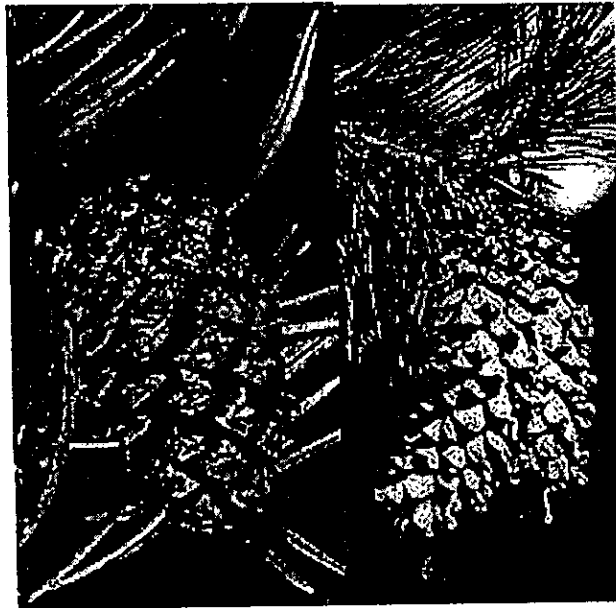


Figura 4. Estróbilos femeninos maduros de *P. monticola* y de *P. contorta*, de los subgéneros *Pinus* y *Strobos*, respectivamente. (Tomado de Maddison, 1998).

Los pinos son un grupo bastante antiguo, sus ancestros ya poblaban la Tierra hace más de 100 millones de años (Perry, 1991). Hay dos grupos naturales dentro del género, los pinos blandos y los pinos duros, del subgénero *Strobos* y *Pinus*, respectivamente (figura 4). Dentro de estos dos grupos existen a su vez clasificaciones que los agrupan en secciones y subsecciones; hay unas 17 subsecciones, aunque algunos especialistas consideran que debían surgir nuevas que incluyeran propiamente a algunos pinos mexicanos, clasificados dudosamente dentro de alguna de las subsecciones existentes (Farjon, 1996).

Cerca de los trópicos, los pinos se distribuyen principalmente en zonas altas y montañosas. En México hay dos importantes cordilleras que cruzan el país de norte a sur, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental; más al sur, el Eje Neovolcánico une estas cordilleras de este a oeste, alcanzando grandes altitudes (más de 4000m). Aún al sur, la Sierra Madre del Sur continúa a lo largo de la costa del océano Pacífico junto con la Sierra Norte de Oaxaca (continuación de la Sierra Madre Oriental). Hacia el sureste, pasando el Istmo de Tehuantepec, que en general es de elevaciones bajas, las montañas se elevan de nuevo en la Sierra Madre de Chiapas y la Mesa de Chiapas, continuando hacia Centroamérica (Perry, 1991).

Dada la intrincada emergencia del terreno, en México existen prácticamente todos los climas en los que los pinos pueden vivir y más aún, los pinos explotan ambientes que normalmente les son poco favorables, como zonas semidesérticas en el noreste de México, donde una gran diversidad de especies (en su mayoría endémicas) resisten la sequía y altas temperaturas (Martínez, 1948). Por lo anterior, el noreste mexicano es considerado un centro de diversificación de pinos. Existe uno más en el Eje Neovolcánico (Farjon, 1996), donde es tan común el endemismo como los altos niveles de variación genética y morfológica en especies como *P. montezumae*.

Económicamente los pinos son muy importantes, de ellos se aprovecha la madera, las semillas de algunos son comestibles, se obtienen resinas, solventes, combustibles, etc. (Martínez, 1948); pero quizás cumplan papeles mucho más fundamentales en su relación con el medio biótico y abiótico. Los pinos producen oxígeno; sirven de refugio a las aves, mamíferos e insectos; son substrato de hongos, líquenes, plantas epífitas; se asocian simbióticamente con algunos hongos para formar micorrizas protegiendo a los suelos de la erosión y más aún, sostienen en el interior de sus hojas a toda una comunidad de microorganismos llamados endófitos.

Existen dos grupos naturales en pinos, los subgéneros *Strobis* y *Pinus*, que muestran algunas características diferentes entre sí. Las especies pertenecientes al subgénero *Pinus* son, por lo general, tolerantes al fuego e incluso dependen de él para la liberación y el establecimiento de sus semillas, sus conos son muy duros y resistentes, el fuste de sus árboles es largo, las acículas gruesas, las semillas casi siempre son aladas, etc. Mientras que en el subgénero *Strobis* las especies son tolerantes a la sombra de los bosques (no necesitan de claros para establecerse), con requerimientos específicos de humedad, tienen conos menos gruesos que las especies del otro subgénero, sus semillas casi nunca presentan alas, sus acículas son cortas y delgadas, crecen rápidamente, son precoces en cuanto a la edad de reproducción, etc.

Lo anterior, como una importancia biológica particular, hace que cualquier intención de estudiar los pinos se tenga que adecuar a la variación anteriormente citada, es por eso que esta tesis considera a un representante de cada uno de los dos subgéneros de pinos: *P. ayacahuite* y *P. montezumae*.

***Pinus ayacahuite* Ehren.**

P. ayacahuite pertenece al subgénero *Strobis* (pinos blandos) en la sección Paracembra. En 1838 se describió por primera vez en el sureste de México, por Ehrenber. Actualmente se conocen dos variedades, *brachyptera* Shaw, al norte del país y *veitchii* Shaw en el centro (Eguiluz, 1978).

Esta especie crece normalmente mezclada con otros pinos y abetos en las montañas del sur de México, Guatemala, Honduras y El Salvador. En México forma pequeñas masas puras, principalmente en Chiapas, Oaxaca y Guerrero; mientras que en Colima, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Veracruz comúnmente se le encuentra asociado con *P. montezumae*, *P. teocote*, *P. oaxacana*, *P. oocarpa* var. *ochoterenai*, *Quercus brachyptera*, *Abies guatemalensis*, *A. religiosa*, *Alnus* sp., *P. pseudostrobus* y *P. rudis*. (Eguiluz, 1978).

Normalmente crece en altitudes que van de los 2000 a los 3200m; es una especie que tolera varios tipos de ambientes, pero alcanza su plenitud en suelos bien drenados y en ambientes fríos y húmedos (Perry, 1991).

La variedad *brachyptera* se diferencia del típico ayacahuite en la forma y tamaño del cono, así como en la distribución, restringida a las montañas del norte de México, donde prefiere sitios elevados, húmedos y con sombra, como las barrancas. Algunas veces forma masas puras, pero es más frecuente encontrarlo asociado con *P. teocote*, *P. cooperi*, *P. duranguensis*, *P. rudis*, *P. herrerae*, *P. arizonica*, *P. engelmannii*, *Pseudotsuga* sp., *Abies* spp., *Juniperus* spp. y rara vez con *P. lumboltzii* y *P. leiophylla* (Eguiluz, 1978; Perry, 1991).

La variedad *veitchii* está ampliamente distribuida en el Eje Neovolcánico, en pequeños grupos de individuos asociados a otros pinos, abetos y otros árboles (*P. montezumae*, *P. teocote*, *Abies religiosa*, *Alnus* sp., *Arbutus* sp., *Quercus* spp., etc.); crece, sobre todo, en lugares fríos, húmedos y sombreados. Su designación como variedad también está dada por el tamaño, el color y la forma de sus conos. Se ha reportado en el Distrito Federal, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, México, Morelos, Puebla y Veracruz (Eguiluz, 1978; Perry, 1991).

P. ayacahuite es la única especie del subgénero *Strobis* que tiene una amplia distribución en nuestro país. La mayor parte de los pinos blandos de México se encuentran en zonas semidesérticas, donde *P. ayacahuite* no puede vivir; sin embargo, hacia el sur puede coexistir con otro pino blando que llega a estas latitudes, *P. chiapensis* (Mart.) Andersen.

Este último se distribuye solamente en los estados mexicanos de Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, y en los departamentos guatemaltecos de Quiché y Huehuetenango; puede desarrollarse desde los 500 y hasta los 2250msnm, siempre y cuando tenga vientos húmedos. Al igual que *P. ayacabuite*, *P. chiapensis* es una especie que prefiere sitios sombreados. Sus poblaciones están formadas generalmente por individuos separados, combinados con algunos pinos y otra vegetación de los lugares en los que se desarrolla, como los bosques mesófilos (Perry, 1991).

***Pinus montezumae* Lamb.**

Esta especie pertenece a la sección Montezumae y a la Subsección del mismo nombre en el subgénero *Pinus* (Perry, 1991). Se encuentra prácticamente en todos los complejos de serranías del país, adentrándose hasta las montañas de Guatemala. Crece en una gran variedad de condiciones, desde climas semi-templados, hasta templados-fríos, de los 2000 y hasta los 3200msnm; la humedad también varía bastante en los sitios en los que se desarrolla, es quizás por eso que también es una de las especies de pino con más variabilidad morfológica, además suele producir híbridos fértiles con muchas otras especies de pinos, especialmente con *P. pseudostrobus* Lindl., en la Mesa del Centro, y con *P. hartwegii* Lindl. y *P. rudis* Endl. en Coahuila y Nuevo León.

En algunas localidades forma masas puras de varias decenas de hectáreas, pero comúnmente se asocia con *P. hartwegii*, *P. rudis*, *P. pseudostrobus*, *P. leiophylla*, *P. lawsonii*, *P. michoacana*, *P. douglasiana*, *P. ayacabuite*, *P. ayacabuite* var *veitchii* y *P. teocote*.

Por la morfología del cono y de las acículas, se han distinguido algunas variedades que son más o menos aceptadas, dependiendo del autor (Martínez, 1948; Eguiluz, 1978; y Perry, 1991). *P. montezumae* comparte localidades con muchas especies de pinos, entre ellas cabe mencionar a *P. hartwegii* y a *P. greggii* Engel. *P. hartwegii* pertenece a la Sección Montezumae en la Subsección Rudis (Perry, 1991), crece a grandes altitudes, formando masas puras de bosque entre los 3000 y los 3700msnm, se le puede encontrar en gran parte de las altas montañas del país, por lo que algunas veces es posible encontrarlo con *P. montezumae*. Por su parte, *P. greggii*, tiene un intervalo de distribución más limitado, sólo se le encuentra en las montañas de la Sierra Madre Oriental, en los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí e Hidalgo (Eguiluz, 1978), entre los 1300 y los 3000msnm, es un pino de ambiente seco y frío.

Historias Naturales II: los hongos endófitos

El endofitismo

Los hongos juegan un papel fundamental en la naturaleza. Se les conoce por ser los "recicladores" de la materia orgánica en prácticamente todos los ecosistemas terrestres. Además de este rol tan importante, los hongos suelen asociarse a otros organismos; dos terceras partes de las especies conocidas de hongos, forman relaciones estrechas con otros organismos, estableciendo simbiosis parásitas, comensalistas o mutualistas (Pirozynski y Hawksworth, 1988). En el caso de las plantas terrestres, los hongos han estado íntimamente relacionados con ellas desde su origen (Pirozynski y Malloch, 1975; Atsatt, 1988; Sherwood-Pike, 1990; Taylor, 1990 y Le Tacon, 1998). A pesar de ello, las implicaciones evolutivas de dichas relaciones han sido ignoradas casi por completo tanto para el hongo como para su hospedero, con la excepción de ciertos fitopatógenos importantes en la agricultura (Savile, 1976).

Un ejemplo de lo anterior son los hongos que habitan dentro de las plantas. Durante los estudios microscópicos del interior de la parte aérea de las plantas, los fitopatólogos se encontraban con hongos y bacterias poco familiares a su vista que "innegablemente ejercían un papel importante sobre el desarrollo de otros organismos y de su hospedero" (Gremmen, 1981); debido a que colonizan el interior de las plantas, se les dió el nombre de endófitos.

Los hongos endófitos habían sido definidos por Bary (1866, en Petrini, 1986) como todo aquel organismo que invade los tejidos internos de las plantas; desde entonces se han encontrado hongos endófitos en el interior de más de trescientas especies de plantas, incluyendo musgos, helechos y coníferas. De hecho, fue en una conífera (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco), donde Berstein y Carroll (1977), demostraron que la planta no sufría daño alguno al ser colonizada por cierto hongo; lo que hizo precisar a Carroll la definición de Bary, señalando que para que un hongo sea endófito es indispensable que no le cause daños a su hospedero.

Por su parte, Petrini (1991) replantea aún la propuesta de Carroll y propone que un hongo endófito es aquél que infecta a las plantas sin causarles daño aunque sólo sea en alguna parte del ciclo de vida del hongo, lo que incluiría a todos aquellos hongos patógenos con etapas de latencia. Esto último ha generado cierta controversia sobre la definición de endófito, basada principalmente en los dos argumentos anteriores. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el significado más simple de *endófito* sólo involucra un espacio que ocupa un organismo y no la función que cumple en él. Además, se trata de un sistema dinámico en donde, ante ciertas circunstancias, el hongo actúa como mutualista y en otras como parásito, habiendo también todos los estados intermedios. Finalmente, un hongo endófito es todo aquél que es aislado del interior de la parte aérea de las plantas.

Taxonomía y ecología de los hongos endófitos

Con pocas excepciones, todos los hongos endófitos son Ascomicetos, principalmente del grupo de los Loculoascomicetos, Discomicetos y Pirenomicetos (Petrini, 1986). Algunos aparecen siempre, no importando la planta con la cual coexisten, como *Cryptocline*, *Cryptosporiopsis*, *Leptostroma*, *Phomopsis* y *Phyllosticta*, es decir, son inespecíficos o generalistas. En contraste, *Rhabdocline parkerii* Sherwood sólo prospera en oyameles y no en otras coníferas que cohabitan con ellos. En realidad, la especificidad de los endófitos es relativa y variable, se ha reportado a nivel específico, genérico y en muchos casos a nivel de familia en cuanto a sus hospederos (para una revisión completa, ver Clay, 1988b).

La diversidad de endófitos, la composición de sus comunidades y los factores ambientales que las afectan, han sido estudiados en numerosas ocasiones (Carroll y Carroll, 1978; Bertoni y Cabral, 1986; Legault *et al.*, 1989; Espinosa-García y Langerheim, 1991; Fisher *et al.*, 1995; Petrini, 1991; etc.). Los endófitos pueden infectar (o colonizar³) un porcentaje variable de la población de hospederos dependiendo de ciertas condiciones. La edad del hospedero aumenta el porcentaje de colonización y la diversidad de endófitos (Espinosa-García y Langerheim, 1991), al igual que las heladas y la disposición de nutrientes, (Petrini y Carroll, 1981) y aún, la contaminación atmosférica (Alvarado y de Bauer, 1991). Por el contrario, la posición relativa del hospedero con respecto a la exposición al viento disminuye la colonización; mientras que la cantidad de humedad y la altitud tienen efectos en ambos sentidos (Sieber, 1989).

Otro hecho relevante de la relación endófito-hospedero es que, a pesar de la variación que pueda haber en la composición de las comunidades de endófitos, en todas ellas existe una especie dominante para cada hospedero, sin importar su localización geográfica (Petrini, 1986), pero limitada a variaciones ambientales importantes. En *Picea abies*, *Lophodermium piceae* es la especie dominante a grandes altitudes y poca humedad, mientras que *Tiarosporella parca* lo es a bajas elevaciones y humedad mayor (Sieber, 1989). Esto es, existe cierta afinidad de algunos hongos a su hospedero, limitada por los factores ambientales específicos de cada población de plantas. Sin embargo, los hábitos del hongo endófito también son relevantes para entender las interacciones entre estos simbioses.

De la colonización y el mutualismo

Existen dos tipos de endófitos de acuerdo a la manera en que se dispersan: los constitutivos y los inducidos. Los constitutivos se dispersan verticalmente por la semilla del hospedero de una generación a otra, como en el caso de los

³ Las denominaciones infección y colonización se usan indistintamente durante esta tesis, aunque para muchos la colonización sea exclusiva de endófitos y la infección de patógenos.

pastos y sus endófitos (Carroll, 1986, 1988; Clay 1988a, 1988b). Los inducidos, en cambio, se dispersan horizontalmente, colonizando los tejidos vitales sólo cuando el hospedero es dañado por herbívoros o parásitos.

En el caso de los hongos dispersados por la semilla del hospedero, está demostrada la producción de sustancias que disminuyen la palatabilidad, inhibiendo o minimizando la herbivoría (Clay, 1988a). En cambio, no se ha demostrado tal característica para los hongos que se transmiten vía horizontal, más bien, se ha propuesto, actúan como una barrera topológica contra los patógenos infecciosos en cuanto a que colonizan las zonas dañadas por éstos y previenen nuevas infecciones. Por ejemplo, Minter y Millar (1980) encontraron que las acículas colonizadas por una especie que sólo se desarrolla ante la senescencia de la acícula, *Lophodermium conigeum* (Brunaud) Hilitz, no son infectadas por *L. seditiosum* Minter, Staley y Millar, una especie conocida como patógena.

Es bien conocida la producción de defensas químicas por parte de las plantas contra parásitos y fitófagos, por lo que la presencia de un endófito con este propósito es cuestionable. A este respecto, Carroll (1988) postula que la longevidad de los árboles, vista en una escala temporal grande, los haría vulnerables ante patógenos o herbívoros con tiempos generacionales mucho más cortos, *ergo* con posibilidades mayores de variabilidad genética que rápidamente vencerían las defensas de éste. Así, sería favorable la existencia de hongos endófitos con ciclos de vida parecidos o iguales al de sus enemigos.

Muchas de las evidencias recabadas hasta ahora apuntan a que los hongos endófitos evolucionaron a partir de hongos patógenos (Carroll, 1988; Clay, 1988a, 1988b). Algunos endófitos causan síntomas de parásito en hospederos que han sido expuestos a estrés, frecuentemente las especies de endófitos están cercanamente relacionadas a las de parásitos y hay especulaciones sobre las preadaptaciones que pudieron existir en estos hongos para convertirse en endófitos, como los periodos de latencia largos y la producción de micotoxinas. A este respecto, la evolución de los hongos endófitos en pastos ha generado modelos sobre cómo se pudo dar la ruta evolutiva parásito-simbionte mutualista; información que puede ser muy útil en el control de plagas (Carroll, 1988; Clay, 1988a).

La fisiología de la interacción endófito

Dedicado

La colonización asintomática de los tejidos vegetales ha sido demostrada por investigaciones histológicas sólo en un número limitado de casos (Stone, 1987; Johnson y Whitney, 1989; Stone *et al.*, 1994; etc). Por ejemplo, *Rhizoctonia parkerii* forman infecciones intracelulares que aparentemente se restringen a una sola célula epidérmica

hasta el advenimiento de la senescencia foliar, entonces el hongo infecta el follaje penetrando directamente la pared de la célula hospedera con una hifa muy delgada y produciendo haustorios intracelulares (Stone, 1987). *Lophodermium piceae* coloniza similarmente, con pocas hifas, localizadas en la subepidermis de la acícula (Susker y Acker, 1989).

En una observación más detallada, Chapela *et al.* (1993) observaron que la colonización endófito de *Hypoxylon fragiforme* (Peus.:Fr) Kickx se inicia a partir de cuerpos unicelulares y multinucleados dentro de las células radiales parenquimatosas del hospedero. Las primeras hifas producidas son extremadamente delgadas, lo que parece una generalidad en la colonización fúngica (O'Connel, 1987) y se extienden a lo largo de los rayos antes de invadir el lumen de los vasos donde producen hifas irregulares y hinchadas. Chapela *et al.* (1993) postulan que lo visto en el parénquima radial de *Fagus sp.* al inicio de la infección, podría ser la suma de estructuras endófitas y vegetales, posiblemente protoplastos fúngicos incluidos dentro de las células del hospedero, desde donde el núcleo puede migrar a la hifa tan pronto como el crecimiento micelial se dispare por las condiciones ecológicas apropiadas. Esta situación se repite, en cierta medida, con la infección de insectos por hongos Entomophthorales (Zygomycota), que parasitan a su hospedero despojándose de la pared celular. En realidad, se puede pensar en muchas situaciones de colonización en la naturaleza, si se toma en cuenta la enorme capacidad de la pared fúngica para invadir sustratos (Bartniki-García, 1970) y la que tienen los protoplastos de estos organismos para resistir condiciones extremas (O'Connel *et al.*, 1984; Peraza, 1997).

El género *Lophodermium* Chév.

Lophodermium es un género de Ascomycota que se ha asociado a más o menos ciento tres especies de plantas en todo el mundo (Hawksworth *et al.*, 1995). En los pinos se le conoce por causar la caída prematura de las acículas en los pinos. En el pasado se reconocía solamente a *L. pinastri* (Shrad. ex Hook) Chév que es una especie muy variable desde el punto de vista ecológico y también en apariencia. Había grandes confusiones con respecto a la patogenicidad de este hongo pues se aislaban cepas altamente patógenas y otras con características de endófito que no diferían aparentemente en morfología con los primeros (Minter, 1980b).

En 1978, Minter, Staley y Millar se dieron a la tarea de profundizar en este tema. Observaron sistemáticamente diferentes sitios donde se había reportado *L. pinastri* sobre *Pinus sylvestris* L. a lo largo de un ciclo de estaciones. El resultado de su estudio demostró que *L. pinastri* no era una especie muy variable, sino que se trataba de un complejo de especies, cada una con un hábitat diferente y con tiempos y hábitos diferentes para la producción de esporas. Existe una especie claramente patógena, una que es saprobia inducida u oportunista y otra que es saprobia constitutiva.

Así, las especies de *Lophodermium* pueden separarse por la morfología del ascocarpo y por su ecología (Minter y Millar, 1980; Minter, Staley y Millar, 1978; Staley, 1975). Con esta información, Minter (1981) reconoce dieciséis especies de *Lophodermium* en pinos. Aunque recientemente en Japón se describió una nueva especie de *Lophodermium* en *P. taiwanensis* (Changlin *et al.*, 1996).

Lophodermium pertenece a la familia Rhytismataceae del orden Rhytismales que son Ascomicetos con ascomas (apotecios⁴; "histerotecios") embebidos y unidos fuertemente al tejido de su hospedero, las ascas son unitunicadas y de forma clavada, las ascosporas pueden ser unicelulares o fragmentadas. Se ha reportado en varios tipos de coníferas y en pastos (Johnston, 1992). La taxonomía de Rhytismataceae ha sido muy discutida (Darker, 1967; Hawksworth *et al.*, 1995) y no existe una revisión definitiva sobre esta familia y las relaciones que guarda con otros ascomicetos que producen apotecios; de ahí que cualquier aproximación filogenética a los miembros de este grupo debe establecer el contexto taxonómico desde niveles jerárquicos altos.

De las dieciséis especies que se asocian a pinos, doce tienen una fase anamorfa⁵ en el género *Leptostroma* Fr.: Fr. (ver la tabla 1), once producen líneas de zona (figura 6), todas colonizan hojas secundarias (de más de tres años), dos se han encontrado en acículas primarias y tres en las apófisis de los conos.

Algunas especies están restringidas geográficamente al intervalo de distribución de su hospedero, siendo limitadas, por ejemplo, a los subgéneros de pinos, *Strobis* y *Pinus*, mientras otras se han encontrado en una amplia área y en varias especies de pinos.

En la mayoría, el ascoma es subepidérmico (con referencia a la epidermis de la acícula colonizada) aunque también los hay subcuticulares. En cualquiera de estos casos, pueden existir células del huésped delineando las prominencias entorno a la hendidura que han sido llamadas labios (figura 6) y que pueden ser hialinas o de varios colores característicos de algunas especies. También se puede presentar una pared de células que divide al himenio de los tejidos aciculares llamada línea basal, que en ocasiones se extiende hasta la superficie de la acícula provocando el efecto de una línea alrededor de la hendidura (figura 5).

⁴ Un *apotecio* es un tipo de ascoma en los Ascomycota.

⁵ *Anamorfo* es la fase e reproducción asexual de los hongos, el *teleomorfo* es la fase sexual y el *holomorfo* representa a ambas, al menos conceptualmente.

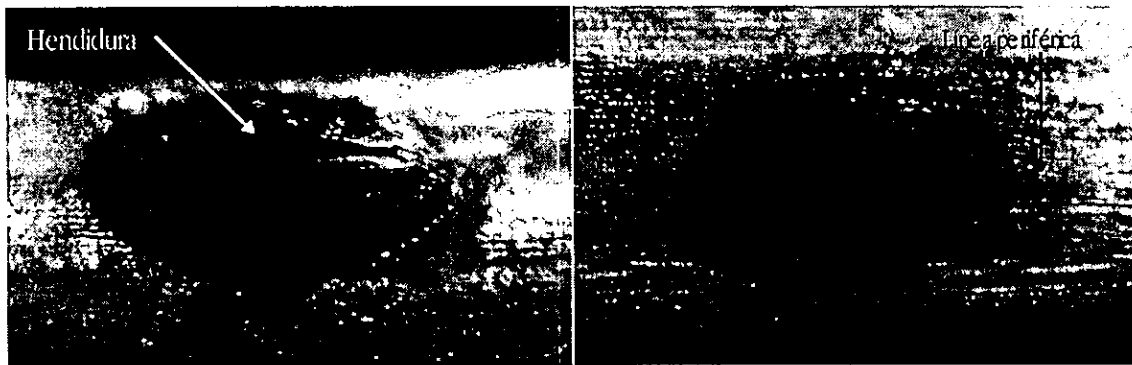


Figura 5. Vistas exteriores de *Lophodermium* spp. en donde se muestran la hendidura y la línea periférica.

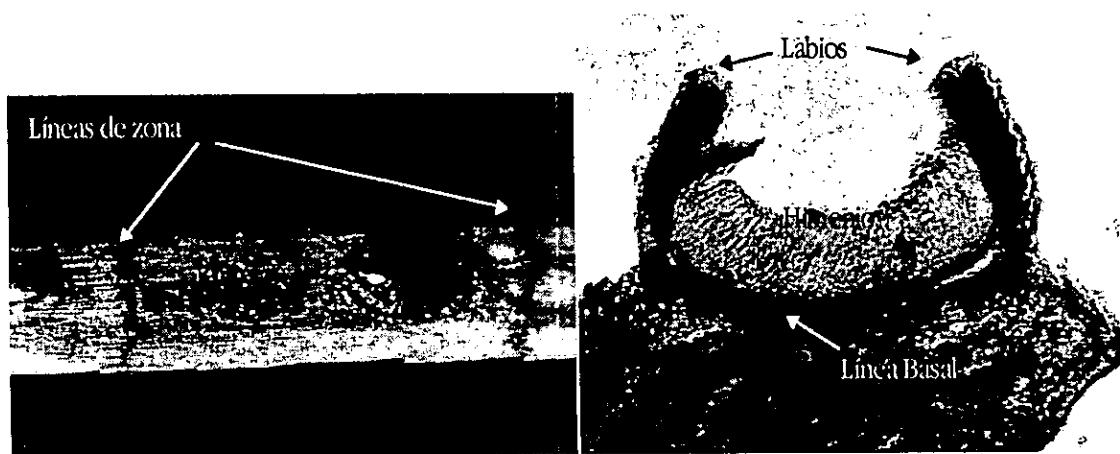


Figura 6. Líneas de zona en acículas (izquierda) y corte transversal de un ascocarpo de *Lophodermium* mostrando algunas de sus estructuras más conspicuas.

Las doce especies con anamorfosen *Leptostroma* generalmente forman esporomas más pequeños en esta fase que en la teleomórfica. Existen tres tipos morfológicos de *Leptostroma*: el primero tiene el conidioma embebido bajo la cutícula, pero abriendo por hendiduras irregulares y pequeños ostiolas en toda la superficie. El segundo tipo es subcuticular o subepidérmico, de apariencia gris o del mismo color del sustrato, se puede ver una línea perimétrica frecuentemente provocada por la pared superior del conidioma (al contrario del esporoma teleomórfico, donde la pared basal forma esta línea), este tipo abre por pequeños ostiolas localizados más o menos en el centro del cuerpo fructífero, lo que no es muy frecuente. El tercer tipo es similar al segundo, pero siempre abre por una hendidura y nunca por ostiolas; los ostiolas, si se presentan, se localizan en el interior de la línea que define a la hendidura (Minter, 1980b).

En los tres tipos de *Leptostroma* pueden observarse líneas de zona de alguno de los siguientes tipos: 1) Líneas delgadas, negras, bien definidas y en gran número sobre la acícula; se han visto acículas con más de treinta líneas de esta

forma o 2) Líneas más anchas, café y difusas, menos especies las presentan y no hay más de cuatro en cada acícula (Minter, 1980b).

Cabe señalar que la exploración de este género no ha sido suficiente. En particular, para México, no se han hecho sino reportes circunstanciales (p. e. Alvarado y De Bauer, 1991) y en consecuencia no se ha desarrollado ninguna hipótesis acerca de las relaciones entre *Lophodermium* y sus hospederos en el nivel ecológico y evolutivo.

Las especies de *Lophodermium* descritas hasta la publicación del artículo de Minter (1981) se resumen en la tabla 1.

Teleomorfo	Anamorfo
<i>Lophodermium nitens</i> Darker	<i>Leptostroma</i> morf. ^A <i>nitens</i>
<i>L. molitoris</i> Minter	<i>L.</i> morf. <i>molitoris</i>
<i>L. sp1</i>	no descrito
<i>L. baculiferum</i> Mayr	<i>L. decipens</i>
<i>L. staley</i> Minter	<i>L.</i> morf. <i>staley</i>
<i>L. pinastri</i> (Schrader ex. Hook.) Chév.	no descrito
<i>L. indianum</i> Singh y Minter	no se conoce
<i>L. conigeum</i> (Brunaud) Hilitz	<i>L. pinorum</i>
<i>L. asutrale</i> Dear	<i>L. durissimum</i>
<i>L. ravenelli</i> Minter	no descrito
<i>L. seditiosum</i> Minter, Staley y Millar	<i>L. rostrupii</i>
<i>L. pini-excelsae</i> Ahmad	no descrito
<i>L. pini-pumilae</i> Sawada	no descrito
<i>L. orientale</i> Minter	no se conoce
<i>L. canberrianum</i> Stahl ex. Minter y Millar	no se conoce
<i>L. durilabrum</i> Darker	no se conoce

Tabla 1. Especies de *Lophodermium* descritas en pinos. ^Amorf. Se refiere a un morfo⁶ de *Leptostroma* que se correlaciona con el teleomorfo respectivo pero que no ha sido descrito como tal. (*sensu* Minter, 1981).

⁶ El término *morfo* es usado como un apócope de *morfoespecie*, es decir cuando se designa una especie en base sólo a la morfología.

Objetivos

- i) Explorar la diversidad del género *Lophodermium* Chév. (Rhytismataceae) en poblaciones naturales de una especie representante de cada uno de los dos subgéneros de *Pinus*:
P. montezumae (subgénero *Pinus*) y *P. ayacahuite* (subgénero *Strobus*) en una distribución geográfica amplia.
- ii) Establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre las especies encontradas, basándose en caracteres morfológicos y moleculares
- iii) Utilizar las hipótesis filogenéticas encontradas para las especies como evidencias que apoyen o descarten la especificidad entre pinos y *Lophodermium*.
- iv) Contribuir en alguna medida con la sistemática filogenética de este grupo de hongos mediante el uso de caracteres moleculares y morfológicos.

Materiales y Métodos

Los grandes misterios no son enigmas para los que haya una solución precisa. Para penetrar en ellos, hay que dejarse transformar por ellos. Quien no esté dispuesto o no sea capaz de ello, se empeñará en vano. Pero el que lo ha conseguido no es capaz de revelar nunca nada a quienes no quisieron o no pudieron. No le entienden.

Así los misterios se protegen a sí mismos.

Michael Ende, *Metamorfosis*.

Planteamiento del método

El estudio de los hongos endófitos en México ha sido casi nulo. Con la excepción de algunos estudios derivados de la fitopatología o de la ciencia forestal (p.e. Alvarado y de Bauer, 1991), no se ha explorado la diversidad de estos hongos en nuestra biota, considerada como megadiversa (Ramamoorthy *et al.*, 1993). Por estos motivos, el objetivo inicial de esta tesis es el de explorar la diversidad de un género importante de hongos endófitos sobre dos especies de pinos mexicanos; sin embargo, al mismo tiempo se pretende plantear hipótesis acerca de la historia evolutiva de las especies encontradas y ver la relación que guarda ésta con la historia de los pinos y con el ambiente donde éstos se desarrollan. Con estas miras, se requiere que las especies de pino a utilizar tengan una amplia distribución, ya que, de esta manera, se puede saber si existe alguna especificidad por parte del hongo hacia su hospedero, al mismo tiempo se puede evaluar si las condiciones ambientales determinan el hábitat del hongo o si la composición de especies de pinos de cada sitio afecta la colonización del mismo. A este respecto, la gran cantidad de especies de pinos que existen en México hace prácticamente imposible que se pudiera involucrar a todas ellas en un estudio como este, así que se decidió utilizar sólo a un representante de cada uno de los subgéneros de pinos, *Strobos* y *Pinus* que tuvieran una amplia distribución. Para el subgénero *Strobos*, sólo hay una especie ampliamente distribuida, *Pinus ayacabuite* Ehren., mientras que para el subgénero *Pinus* existen muchas especies bien distribuidas y de ellas se escogió a una de las más comunes, fácil de identificar y que en ocasiones es simpátrica con respecto a *P. ayacabuite*, ésta es *P. montezumae* Lamb.

Se escogieron cuatro sitios de colecta:

- 1) El Cerro del Potosí, en Nuevo León, al noreste de México, en donde se pueden encontrar ambas especies de pinos junto con otras, formando un gradiente de sucesión de especies relacionado con la altitud de la montaña. El Cerro del Potosí es la montaña más alta de Nuevo León (3500msnm), está rodeado de grandes áreas semidesérticas por lo se encuentran varias especies endémicas, como *P. nelsonii* y *P. culminicola*, en dichas zonas semidesérticas también hay pinos endémicos, todos pertenecientes al subgénero *Strobos*. Quizás el aislamiento del Cerro del Potosí sea su característica más importante.

2) El Parque Nacional de las Lagunas de Zempoala, en el estado de Morelos, al suroeste de la Ciudad de México, enclavado en el eje neovolcánico, presenta gran variedad de microambientes, por lo que *P. ayacabuite* y *P. montezumae* forman masas puras y simpátricas.

3) En la Sierra Norte de Oaxaca, o Sierra de Juárez, en donde sólo se colectó *P. ayacabuite*; se trata de un *maremagnum* de microambientes por lo que las poblaciones de pinos casi siempre están mezcladas. Existen localidades en donde se pueden encontrar hasta diez especies de pinos en un área muy pequeña.

4) En las cercanías de Ocosingo y San Cristobal de las casas, Chiapas, al sureste del país, donde *P. ayacabuite* forma masas puras en ciertos microambientes y *P. montezumae* está mezclado con varias especies de pinos con las que incluso forma algunos híbridos evidentes.

El amable lector encontrará que además de las dos especies de pinos mencionadas anteriormente, también se colectaron en algunos sitios¹ *P. gregii*, *P. hartwegii* (subgénero *Pinus*), y *P. chiapensis* (subgénero *Strobus*) y que también se incluyen descripciones de *Lophodermium* provenientes de algunas especies de pinos blandos extranjeros: *P. cembra*, *P. longaeva* y *P. albicaulis* y de sitios de colecta ajenos a este trabajo. Todo esto fue con el objetivo de obtener más información sobre la especificidad de las especies de *Lophodermium* en pinos. Es decir: i) muestreando algunas especies simpátricas a las dos principales para corroborar que la especie al uso no esté presente en ellas y ii) utilizando muestras lejanas a los sitios de colecta planteados en este tesis para saber si existen especies de *Lophodermium* que persistieran a pesar de las barreras geográficas.

A continuación se detalla más el procedimiento de colecta de *Lophodermium* y los lugares exactos en donde se efectuó; así como los métodos de cultivo, técnicas moleculares y la reconstrucción de filogenias.

Colecta de *Lophodermium*

Se colectaron ascomas de *Lophodermium* de cualquiera de las siguientes condiciones: acículas senescentes unidas al árbol, unidas al árbol y muertas por daños a las ramas, de hojas parcialmente muertas y de la hojarasca cercana. Aunque se sabe que se pueden encontrar ascomas en estróbilos y en hojas no senescentes, estas condiciones no fueron observadas en ninguna ocasión. Se colectó la mayor cantidad posible de agujas con ascocarpos de *Lophodermium* de, al menos, cinco individuos por localidad, separados entre sí por más de diez metros. La recolecta se realizó durante los meses de septiembre y octubre de 1996 en el Cerro del Potosí, Nuevo León (24°51'N, 100°13'W y entre 2,000 y 3,500msnm); el Parque Nacional de las Lagunas de Zempoala, Morelos (19°3'N, 99°19'W a 2,800msnm); en las cercanías de Capulalpam, Xiacuí y La Trinidad, Oaxaca (17°14'N, 96°26'W a 2,500msnm) y entre las ciudades de Sn Cristobal de las Casas y Ocosingo, Chiapas (16°44'N, 92°37'W a 1950 msnm) (figura 7).

¹ Ver la introducción para más información sobre estas especies de pinos.



Figura 7. Distribución de los pinos en México. Los números representan los sitios de colecta: 1. Cerro del Potosí, NL.; 2. Parque Nacional de las Lagunas de Zempoala, Mor.; 3. Sierra de Juárez, Oax.; y 4. Sierra Madre de Chiapas, Chis.

Los sitios de colecta fueron seleccionados por abarcar una buena parte de la distribución de los pinos utilizados en este trabajo. La época del año en que se colectó, septiembre y octubre, es una de las mejores para encontrar ascomas maduros de *Lophodermium* (Minter *et al.*, 1978). Las coordenadas geográficas fueron tomadas con un geoposicionador Magellan (punto geográfico de cien metros cuadrados).

Cultivo

Una vez que se colectaron las muestras, fueron conservadas hasta su procesamiento en bolsas de papel de estraza a temperatura ambiente y cambiando la bolsa cuando ésta se humedecía. Se obtuvieron esporas de *Lophodermium* pegando un trozo de acícula sin esterilizar en la tapa de cajas petri (55 mm \varnothing) con medio de cultivo Malta-Agar (MA: 20g/l), adicionado con Streptomycina, Tetraciclina y Ampicilina en proporciones estándar. Se procuró que hubiera un ascoma maduro con la abertura hacia el medio de cultivo. Los ascomas fueron escogidos al microscopio estereoscópico por su buena apariencia; sin embargo, no siempre se obtuvieron esporas (o esporas viables) de un apotecio en buenas condiciones.

Las esporas, cuando se obtuvieron, cayeron al medio después de unas horas y hasta varios días después. Fueron aisladas con la ayuda de agujas hipodérmicas finas (del tipo que se usa para inyectar insulina) bajo el microscopio estereoscópico (30X) y cultivadas por separado en medio de cultivo estéril Malta-Agar-V8 (extracto Malta, 20g/l; Jugo V8, 200ml/l) a temperatura ambiente y sin ningún régimen de luz en especial. Cuando el crecimiento micelial era lento también se agregó madera de pino molida y estéril (dispersada sobre el cultivo) y/o se integraron al medio de cultivo

acículas molidas (6g por litro de medio); más frecuentemente se repitió la fase exponencial² del crecimiento subcultivando en el mismo tipo de medio trozos grandes de micelio (~0.7-1cm Ø).

Se mantuvo la identidad de la espora, del ascocarpo, de la especie de pino y de la localidad de la que provenía. Todos los ascocarpos utilizados para la obtención de esporas, las hayan liberado o no, se recuperaron para observaciones microscópicas detalladas a continuación.

Observaciones microscópicas

Se hicieron preparaciones semipermanentes con alcohol polivinílico (PVP) de cortes efectuados con navajas de afeitar a los ascocarpos utilizados en la obtención de esporas; algunos cortes fueron teñidos con azul de metileno para observar algunas estructuras. Se realizaron observaciones a 100X y 400X de estos cortes y se tomaron fotografías de algunos de ellos. Se describieron en texto y en diagramas y en su caso se determinaron las especies con base en la monografía que Minter (1981) elaboró para el género en pinos. Los diagramas antes mencionados son representaciones esquemáticas de la forma en que los apotecios están embebidos en la acícula de su hospedero, características tradicionales para la descripción y determinación de las diferentes especies (figura 8).

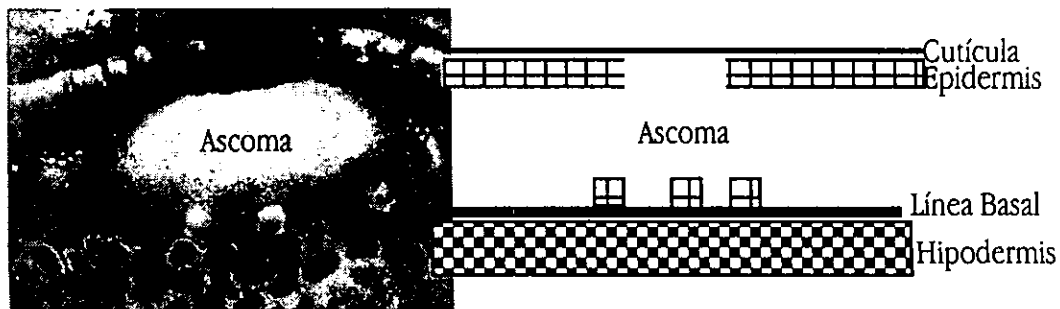


Figura 8. Representación esquemática y micrografía de un corte transversal de *Lophodermium sp.* en el que se muestra la forma en que el apotecio está embebido en la acícula. La cutícula, la epidermis y la hipodermis son parte del tejido vegetal, mientras que la línea basal es del hongo.

Obtención de caracteres para la inferencia filogenética

Caracteres morfológicos

Se elaboró una matriz de caracteres morfológicos de las dieciseis especies de *Lophodermium* descritas para pinos con base en información bibliográfica, mayormente en la monografía antes mencionada (Minter, 1981) y en otros trabajos sobre *Lophodermium* y otros Rhytismataceae como los de Minter, Staley y Millar (1978) y Darker (1967). Esta matriz fue utilizada para reconstruir un cladograma de las relaciones dentro del grupo. Los caracteres se refieren mayormente al cuerpo fructífero de este género. La orientación del árbol fue arbitraria.

² El crecimiento *in vitro* de los hongos tiene al menos dos fases, una en la que el crecimiento es muy acelerado, la exponencial, y otra en donde el crecimiento es lento y constante.

Asimismo se obtuvieron algunos caracteres morfológicos evidentes de los ascomas utilizados para la obtención de esporas a partir de observaciones microscópicas y de su descripción. Éstos se refieren únicamente a la manera de estar embebidos en la acícula y a la presencia de otras estructuras peculiares, como la presencia de labios. La matriz que se generó contenía muy pocos caracteres, por lo que no se le consideró para un nuevo análisis filogenético sino que se añadió a la matriz de caracteres moleculares como se detalla más adelante.

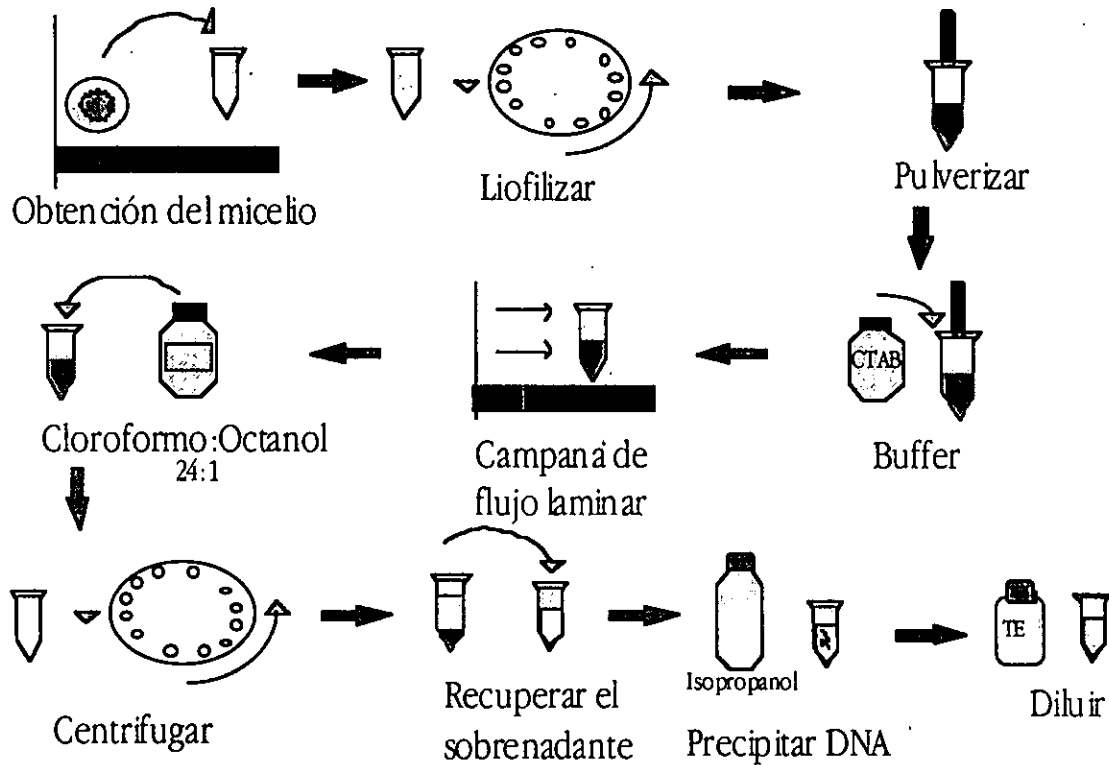


Figura 9. Método de extracción de DNA de hongos empleado (Vázquez Lobo, 1996).

Caracteres moleculares

Extracción de DNA

Se obtuvo una cantidad suficiente de micelio (1g aproximadamente) para el aislamiento de DNA (ver Protocolos) después de dos a tres semanas de haber aislado las ascosporas. La extracción de DNA se hizo con el método de Xu *et al.*, (1994) modificado por Vázquez Lobo (1996) (figura 9; ver Protocolos).

Una vez extraído el DNA se eliminó el RNA que también se obtiene en grandes cantidades (figura 10; ver Protocolos). El DNA fue usado como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Amplificación del ITS total

El PCR fue utilizado como método de amplificación del ITS fúngico. Las condiciones de amplificación y la concentración de los reactivos se desarrolló de acuerdo con Vázquez Lobo (1996; ver Protocolos).

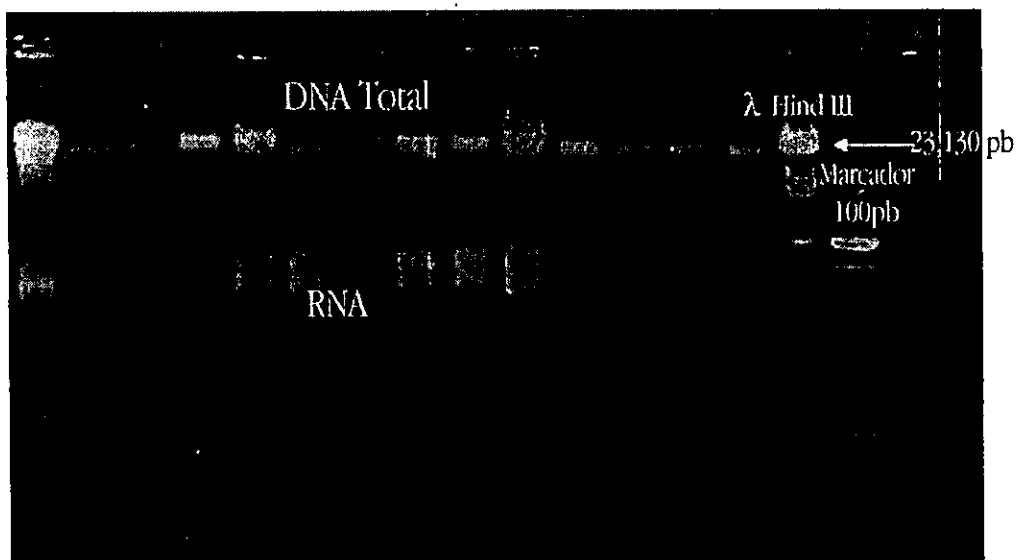


Figura 10. Electroforésis en gel de agarosa 0.8% en el que se observa el DNA total extraído. pb. pares de bases de nucleótidos.



Figura 11. Electroforésis en agarosa 0.8% que muestra el ITS1 amplificado y purificado. pb: pares de bases de nucleótidos.

Alineación de secuencias

El programa utilizado en el termociclador Perkin Elmer 9600 Ver. 2.00 incluye un minuto de desnaturalización a 94°C, 15 segundos para la alineación de los *primers* a 55°C, el tiempo necesario para agregar la enzima DNA polimerasa a 72°C, 35 ciclos de amplificación: 94°C por diez segundos, 20 segundos a 55°C y un minuto 11 segundos a 72°C; finalmente un periodo extra de extensión a 72°C por seis minutos.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS del rDNA fueron el ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' (Gardes y Bruns, 1993) y el NL6A: 5'-CAAGTGCTT-CCCTTTCAACA-3' (Egger, 1996) que reconocen sitios conservados en las subunidades 18S y 28S, respectivamente.

Los productos de PCR fueron reamplificados cuando la concentración fue baja y en todos los casos purificados (figura 11) con el paquete comercial Qiagene utilizando el protocolo incluido en éste (ver Protocolos). Los ITSs amplificados y purificados se mandaron a un secuenciador automático (ABI) en el Departamento de Botánica y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oregon en Corvallis.

En todos los casos, las secuencias fueron alineadas con el programa Clustalx (Modificación del programa Clustalw; Thompson, Higgins y Gibson, 1994) para procesador Power PC, MacOS y revisadas visualmente.

Como se argumenta en la introducción, la estructuración de las hipótesis de homología es fundamental en un análisis cladista, por lo que la alineación de las secuencias en la elaboración de una matriz de caracteres moleculares es el punto más importante en dichos análisis. Bajo esta premisa, la búsqueda de la mejor alineación conlleva varios pasos que se describen para el particular de este trabajo, a saber:

i. Se alinearon las secuencias obtenidas con el oligo ITS1F y las del NL6A pertenecientes al mismo individuo de cuya alineación se obtuvo una secuencia con menos nucleótidos sin identificar (se redujeron las N's) y con mayor número de caracteres para cada uno de los OTUs.

ii. Algunas de las secuencias incluían un intrón de ~230pb que fue eliminado por pertenecer al grupo I de intrones, es decir, intrones que pueden transmitirse horizontalmente (Voet *et al.*, 1996).

iii. Se alinearon las secuencias de todos los individuos obtenidas a partir del primer paso junto con las de los grupos externos. La utilidad del grupo externo está en la optimización de la inferencia orientándola y haciendo evidentes grupos monofiléticos³, pero sólo hasta que el análisis se ha efectuado.

Para la implementación de este método es necesario tener algún conocimiento del contexto taxonómico del objeto de estudio. En este caso particular, la sistemática del grupo no está bien definida por lo que es recomendable utilizar taxa cercanos y otros lejanos de modo que ese contexto del que se habla exista.

En consecuencia, se hizo una aproximación utilizando los siguientes grupos externos, escogidos en el contexto de Ascomycota y particularmente ascomicetos que producen apotecios (Discomycetes): *Colpoma sp.*, *Trybliopsis sp.*, y *Rhabdocline spp.* (Rhytismataceae, serie apotecios; Gernandt *et al.*, 1997), *Lophodermium picea*, proveniente del cepario ATCC (American Type Culture Collection), *Phacidium sp.* (Phacidaceae, Leotiales, serie apotecios; Gernandt *et al.*, 1997), *Botryotinia convoluta* (Sclerotiniaceae, Leotiales; Holst-Jensen, 1997), *Sclerotinia homoeocarpa* (Sclerotiniaceae; Travanty *et al.*, 1998), *Fusarium kyushuense* (Nectriaceae mitospórico, Hypocreales, serie peritecios; O'Donnel, 1997), *Hormonema sp.* (serie bitunicados, mitospórico) cuya secuencia proviene del cultivo de este hongo en nuestro laboratorio a partir de aislamientos de cortes de acículas de *Pinus patula* Schl. et Cham, *Hormonema dematioides* (Catal y Adams, 1997) y *Eupenicillum spp.* (Trichocomaceae, Eurotiales; serie peritecios; Peterson, 1998). La taxonomía fue referida a Eriksson y Winka (1998).

Es importante destacar que salvo *Hormonema spp.* y *Eupenicillum spp.*, el resto de los grupos externos tiene un ITS de ~500pb, menor al de las cepas utilizadas que es de ~850pb; así también que la información que aporta el

³ Para una explicación detallada sobre el uso del grupo externo véase la introducción.

ITS es mejor por debajo del nivel de familias (Bruns *et al.*, 1991), por lo que es necesaria la prudencia en un análisis que rebese ese límite.

También cabe enfatizar que las cepas de *Lophodermium* utilizadas en el análisis provienen de individuos del mismo género y probablemente de la misma especie, es decir, es necesaria información que sea resolutive a estos niveles.

iv. Partiendo del hecho de que no todas las secuencias son del mismo tamaño, de los principios del uso del grupo externo y del tipo de información que se requiere, se decidió explorar tres alineaciones diferentes para alimentar un igual número de análisis filogenéticos: en la primera se alinearon todas las secuencias y se redujo la matriz de caracteres a aquellos que fueran comparables en cuanto al número de bases nucleotídicas; en la segunda se utilizaron menos OTUs para elevar la capacidad resolutive de un análisis como el anterior, i.e. con un número limitado de caracteres y una gran cantidad de OTUs, y en la tercera se utilizaron sólo las secuencias que tuvieran el mayor número de caracteres posibles (las mismas que más tarde llamaré "largas") con el fin de explotar al máximo la información del ITS.

v. En todos los casos se utilizó el resultado de la alineación como matriz de caracteres en un análisis *Bootstrap* de 1,000 réplicas con búsqueda heurística (adición aleatoria, 10 réplicas) en el programa PAUP 3.0 (Swofford, 1991); así como una búsqueda tipo *Branch and Bound* en el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993).

vi. Se compararon los resultados de las filogenias.

Otro tipo de información que se puede obtener de la alineación de secuencias es la tasa de sustituciones de las secuencias a partir de la distancia que hay entre éstas. La tasa de evolución, como también se le llama, habla de la cantidad de cambios que ocurren entre las ramas con respecto a otras de ellas. El cálculo de las distancias entre las secuencias y la tasa de evolución es el primer paso para hacer uso del reloj molecular. Se calcularon las distancias entre las secuencias con la ayuda de los programas MEGA (Kumar *et al.*, 1993) y Phyltest (Kumar *et al.* 1996). Con éste último también se calcularon las tasas de sustitución entre algunos OTUs tomando como base la distribución de estos en el resultado del análisis de las secuencias "largas".

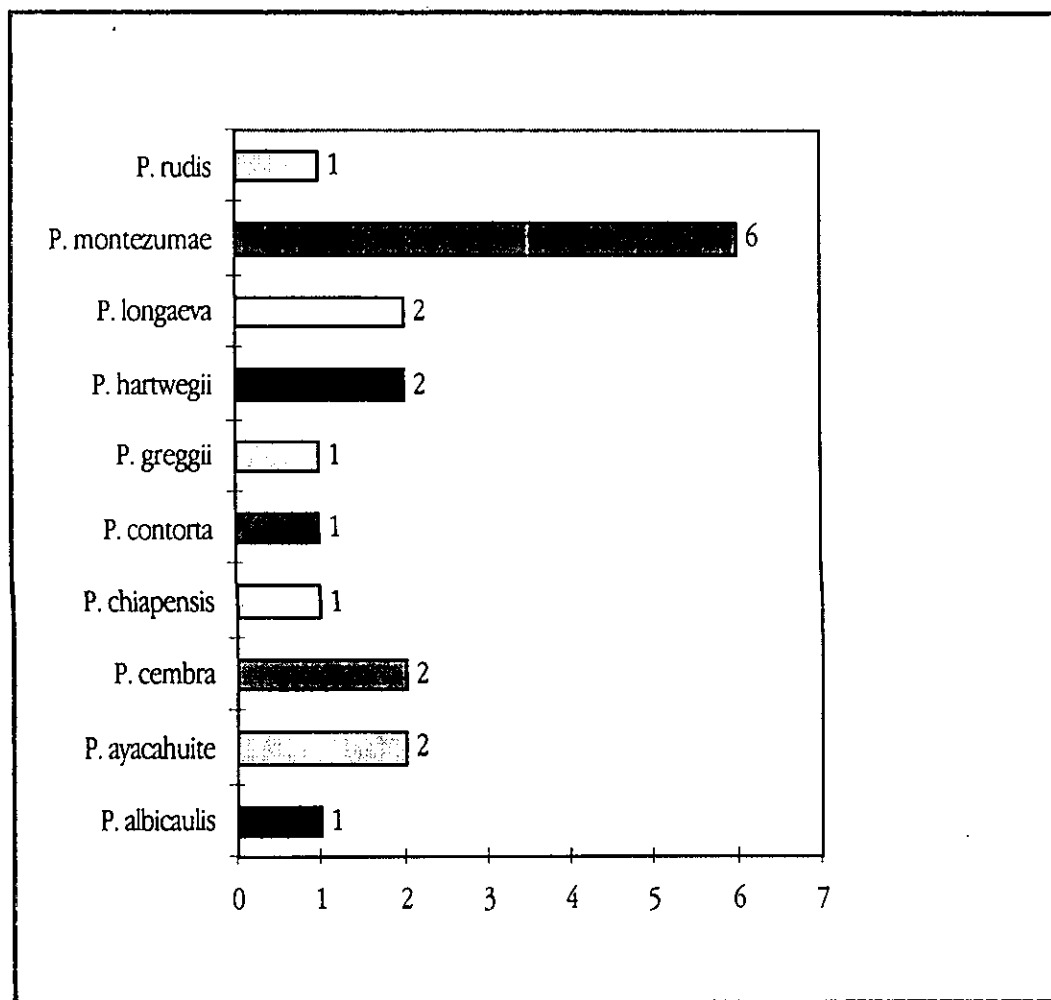
Caracteres combinados

Como se ha mencionado en la introducción, la única manera consistente de probar una hipótesis es poniéndola a prueba (Kluge, 1997) y una manera de hacer esto es agregando elementos a la matriz con que se hizo la inferencia y haciendo de nuevo el análisis. Así es como se decidió aprovechar los caracteres morfológicos de los ejemplares cuyas cepas se utilizaron en el análisis molecular e incluirlos en una nueva matriz que incluyó ambos tipos de datos. Con ésta se efectuó una nueva búsqueda con PAUP (el mismo tipo de búsqueda antes mencionado) y se comparó con las otras topologías obtenidas.

Resultados

Los resultados se muestran a continuación en dos partes. En la primera se desarrolla la parte de colecta y descripción morfológica de los individuos de *Lophodermium* utilizados. En la segunda se muestran las filogenias obtenidas con los caracteres morfológicos y moleculares.

En la gráfica 1 se muestra la diversidad de morfos (los morfos pueden corresponder a especies morfológicas diferentes y estar repetidas en diferente hospedero) encontradas para cada especie de hospedero. Cabe resaltar que no todos los morfos o especies que se encontraron para esta gráfica fueron utilizados en el análisis filogenético.



Gráfica 1. Número de morfos y/o especies de *Lophodermium* encontradas por especie de hospedero.

En la siguiente tabla se resume el destino de los individuos de *Lophodermium* colectados. Se muestra el resultado de su determinación, el hospedero del cual provinieron, la localidad en que fueron colectados y si fueron utilizados o no en la filogenia molecular. La clave asignada es la que se utiliza para designarlos en los subsecuente.

Especie	Ejemplar	Hospedero	Localidad	Análisis Filo.
<i>L. sp.2</i>	albicaulis	<i>P. albicaulis</i>	Herbario	
<i>L. nitens</i>	aP-006	<i>P. ayacabuite</i>	Cerro del Potosí, NL	✓
<i>L. nitens</i>	ayadur	<i>P. ayacabuite</i>	El Salto, Dgo.	
<i>L. nitens</i>	aO-122	<i>P. ayacabuite</i>	La Trinidad, Oax.	✓
<i>L. nitens</i>	aC-013	<i>P. ayacabuite</i>	Sn C. de las Casas, Chis.	✓
<i>L. nitens</i>	aZ-026	<i>P. ayacabuite</i>	Zempoala, Mor.	✓
<i>L. nitens</i>	aZ-027	<i>P. ayacabuite</i>	Zempoala, Mor.	✓
<i>L. sp.2</i>	aZ-002	<i>P. ayacabuite</i>	Zempoala, Mor.	✓
<i>L. sp.2</i>	aZ-022	<i>P. ayacabuite</i>	Zempoala, Mor.	✓
<i>L. sp.5</i>	cembra	<i>P. cembra</i>	Herbario	
<i>L. nitens</i>	cembra2	<i>P. cembra</i>	Herbario	
<i>L. sp.3</i>	cO-001	<i>P. chiapensis</i>	Capulalpam, Oax.	✓
<i>L. sp.3</i>	cO-015	<i>P. chiapensis</i>	Capulalpam, Oax.	✓
<i>L. molitoris</i>	contorta	<i>P. contorta</i>	Herbario	
<i>L. indianum</i>	gP-004	<i>P. greggii</i>	Cerro del Potosí, NL	✓
<i>L. sp.4</i>	hA-081	<i>P. bartwegii</i>	Ajusco, D.F.	✓
<i>L. indianum</i>	hO-001	<i>P. bartwegii</i>	S. de Juárez, Oax.	✓
<i>L. nitens</i>	longaeva	<i>P. longaeva</i>	Herbario	
<i>L. sp.2</i>	longaeva2	<i>P. longaeva</i>	Herbario	
<i>L. baculiferum</i>	mP-002	<i>P. montezumae</i>	Cerro del Potosí, NL	✓
<i>L. baculiferum</i>	mP-003	<i>P. montezumae</i>	Cerro del Potosí, NL	✓
<i>L. baculiferum</i>	mP-005	<i>P. montezumae</i>	Cerro del Potosí, NL	✓
aff. <i>L. australe</i>	mP-001	<i>P. montezumae</i>	Cerro del Potosí, NL	
<i>L. indianum</i>	mP-004	<i>P. montezumae</i>	Cerro del Potosí, NL	
aff. <i>L. australe</i>	mC-002	<i>P. montezumae</i>	Ocosingo, Chis.	
<i>L. durilabrum</i>	mC-003	<i>P. montezumae</i>	Ocosingo, Chis.	
aff. <i>L. pini-pumilae</i>	mC-005	<i>P. montezumae</i>	Ocosingo, Chis.	✓
?	mZ-001	<i>P. montezumae</i>	Zempoala, Mor.	✓
<i>L. baculiferum</i>	mZ-002	<i>P. montezumae</i>	Zempoala, Mor.	✓
aff. <i>L. indianum</i>	mZ-003	<i>P. montezumae</i>	Zempoala, Mor.	
<i>L. orientale</i>	rP-001	<i>P. rudis</i>	Cerro del Potosí, NL	

Tabla 2. Relación de los individuos de *Lophodermium* colectados con respecto al sitio de colecta y su hospedero.

Observaciones microscópicas

Descripciones de los ejemplares

Se presentan a continuación las descripciones hechas de los individuos usados en los análisis filogenéticos, así como los esquemas de su morfología y micrografías de los ejemplares. Existen descripciones para individuos que no fueron incluidos por alguna razón en la inferencia filogenética, lo que se expresa para cada caso.

Ascomas subepidérmicas

L. sp. 2.- Ascoma subepidérmico parcial, centralmente subcuticular, con algunas células de la hipodermis en la pared superior sin ningún arreglo en particular. Los labios no se observan en todos los individuos, cuando están presentes son inconspicuos y hialinos. La pared basal es difusa, pero continúa hasta el exterior de la acícula por lo que forma línea perimétrica. Sobre el centro de la línea basal se pueden distinguir de cuatro a cinco células epidérmicas desplazadas. No corresponde a ninguna descripción de las presentadas por Minter (1981b) (figuras 12 y 23). Los ejemplares que corresponden a esta descripción son: **aZ-002**, **aZ-022**, de acículas secundarias de *P. ayacahuite*, colectadas en Zempoala, Mor. (sólo estos dos fueron utilizados en el análisis filogenético) y **longaeva2**, **albicaulis** y **cembra2** de acículas secundarias de *P. longaeva*, *P. albicaulis* y *P. cembra* (todos del subgénero *Strobilus*), respectivamente.

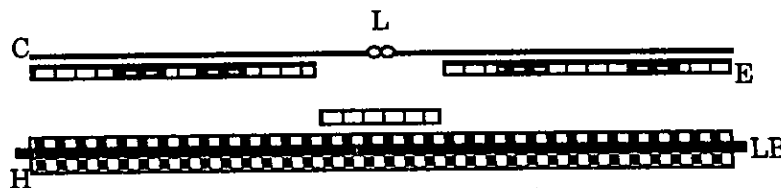


Figura 12. Representación de *L. sp. 2.* L. Labios; C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

L. sp. 5.- Ascoma subepidérmico total, con algunas células de la hipodermis en la pared superior sin ningún arreglo. Labios muy grandes. Pared basal continúa pero algo difusa, por lo que no es posible saber si existen células de la epidermis desplazadas en ella. No coincide con las descripciones de las especies, pero es muy parecido a las Ascomas de *L. sp. 2* (figura 12) y *L. sp. 3* (figura 14). De acículas de *P. cembra* (subgénero *Strobilus*), de muestras de herbario; ejemplar nombrado **cembra**. No incluido en el análisis filogenético.

L. baculiferum.- Ascoma subepidérmico total, sin labios. Pared basal bien definida sobre la hipodermis. Su abertura se localiza sobre la línea estomática de la acícula (figuras 13 y 24). Sobre acículas secundarias de *P. montezumae*, colectadas en Zempoala, Morelos (ejemplar **mZ-002**) y en el Cerro del Potosí, Nuevo León (ejemplares **mP-002**, **mP-003**, y **mP-005**). Todos fueron incluidos en el análisis filogenético.

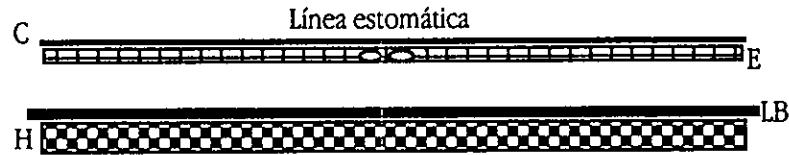


Figura 13. Representación de *L. baculiferum*, nótese la ausencia de labios y la línea estomática en el centro del Ascoma. C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

L. sp.3.- Ascoma subepidérmico parcial, centralmente subcuticular; con algunas células de la hipodermis en la pared superior sin ningún arreglo en particular. Labios muy grandes. Pared basal bien definida y continua, forma línea perimétrica. La epidermis del hospedero es tan delgada que exteriormente el Ascoma es muy oscuro (figuras 14 y 25). No corresponde con ninguna descripción pero es muy parecido *L. sp.2*. En acículas secundarias de *P. chiapensis*, colectadas en Capulalpam, Sierra de Juárez, Oaxaca. Ejemplares **ch-001** y **ch-015**. Todos fueron incluidos en el análisis filogenético.

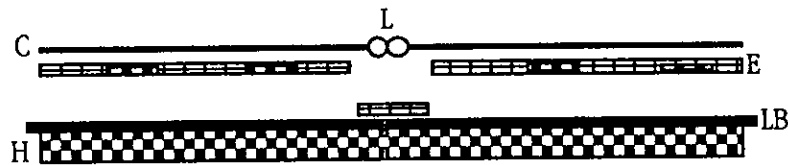


Figura 14. Representación esquemática de *L. sp.3*. L. Labios; C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

aff. *L. pini-pumilae*.- Ascoma subepidérmico total. Sin labios. Pared basal continua y difusa sobre las células de la hipodermis (figuras 15 y 26). De acículas secundarias de *P. montezumae* colectadas en las cercanías de Ocosingo, Chiapas. Ejemplar **mC-005**. Incluido en el análisis filogenético.



Figura 15. Representación de aff. *L. pini-pumilae*. C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

L. sp.4.- Ascoma subepidérmico total, o subhipodérmico parcial, no está claro si existen células de la hipodermis a lo largo de todo el ascoma. Labios pequeños y en apariencia multicelulares. Pared basal discontinua con tres a cuatro células epidérmicas desplazadas, éstas no provienen del centro, sino, probablemente, de algunas zonas intermedias. No corresponde con ninguna descripción (figuras 16 y 27). De acículas secundarias de *P. hartwegii*, volcán Ajusco, Distrito Federal (ejemplar nombrado **hA-081**; si se incluye en el análisis filogenético).

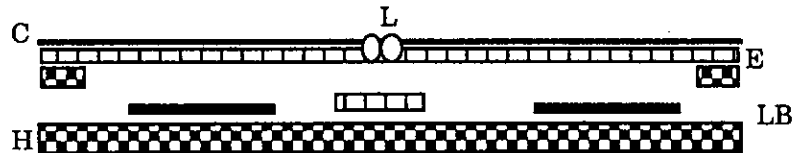


Figura 16. Representación esquemática de *L. sp.4*. L. Labios; C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

Ascomas subcuticulares

L. nitens.- Ascoma subcuticular total. Sin labios. Pared basal bien definida sobre la epidermis (figuras 17 y 28). De acículas secundarias de *P. ayacahuite* del Cerro del Potosí, N.L. (ejemplar **aP-006**), de Zempoala, Morelos (ejemplares **aZ-026** y **aZ-027**), de la Sierra de Juárez, Oaxaca (ejemplar **aO-122**), San Critobal de las Casas, Chiapas (ejemplar **aC-013**) y de El Salto, Durango (ejemplar **ayadur**, no incluido en el análisis filogenético). De acículas secundarias de *P. longaeva* (ejemplar **longaeva**; no incluido en el análisis filogenético). Todos los hospederos pertenecen al subgénero *Strobis*.

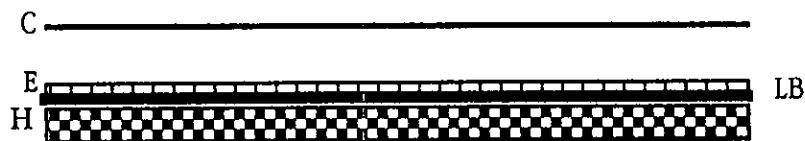


Figura 17. Representación esquemática de *L. nitens*. C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

L. molitoris.- Ascoma subcuticular total. Con labios. Pared basal continua (figura 18). De acículas de *P. contorta* (subgénero *Strobis*) provenientes de ejemplares de herbario (ejemplar llamado **contorta**; no incluido en el análisis filogenético).

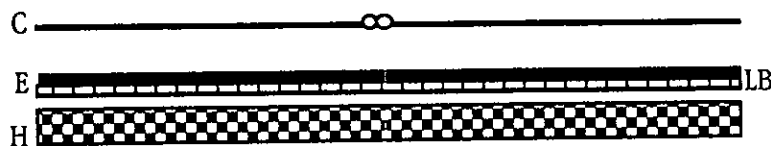


Figura 18. Representación de *L. molitoris*. L. Labios; C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

Ascomas subhipodermicos

L. indianum.- Ascoma subhipodérmico parcial, centralmente subcuticular creciendo entre dos vasos conductores que permanecen en la pared superior del ascoma; en estos casos se les únen de dos a cuatro células de la segunda capa de la hipodermis. Labios pequeños y hialinos. Pared basal discontinua. En el centro de la pared basal se distinguen tres células epidérmicas, desplazadas de la pared superior, sobre dos capas de células hipodérmicas. La hipodermis es más gruesa en esta zona que en otras partes de la acícula (figuras 19 y 29). En acículas secundarias de *P. greggii*, colectadas en el Cerro de Potosí, Nuevo León (ejemplar **gP-004**); *P. hartwegii*, colectadas en la Sierra de Juárez, Oaxaca (ejemplar **hO-001**); y *P. montezumae*, colectadas en el Cerro de Potosí, Nuevo León (ejemplar **mP-004**, no utilizado en la inferencia filogenética) y en Zempoala, Morelos (ejemplar **mZ-003**, no utilizado en el análisis filogenético).

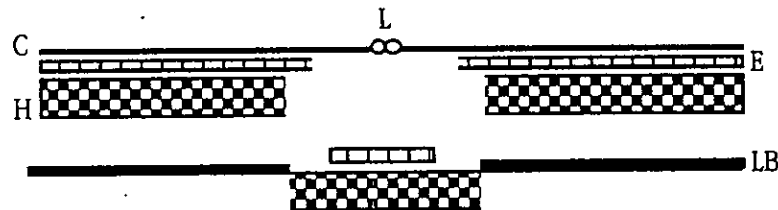


Figura 19. Representación de *L. indianum*. L. Labios; C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

aff. *L. australe*.- Ascoma subhipodérmico parcial, centralmente subepidérmico, con dos células epidérmicas a manera de labios: el obscurecimiento de la pared superior del ascoma termina cerca de la abertura dejando al descubierto éstas células, dando la apariencia de labios. Sin pared basal. Algunas células de la hipodermis permanecen pegadas a la epidermis en los extremos del ascoma, lo que podría deberse a la adherencia a los poros estomáticos que se encuentran a los lados del Ascoma (figuras 20 y 30). Es parecido a la descripción de *L. australe*, así como en su apariencia exterior. En acículas secundarias de *P. montezumae* colectadas en el Cerro del Potosí, Nuevo León (ejemplar **mP-001**) y en Ocosingo, Chiapas (ejemplar **mC-002**). Ninguno de los dos está incluido en el análisis filogenético.

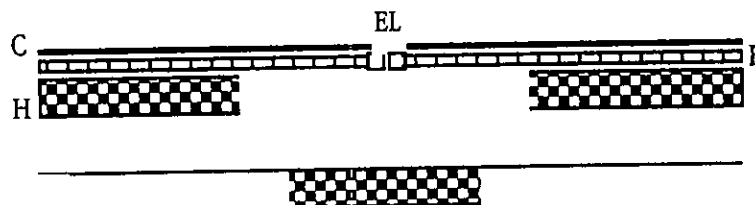


Figura 20. Representación de aff. *L. australe*. EL. Células de la epidermis a manera de labios; C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

L. durilabrum.-Ascoma subhipodérmico central. Sin labios. Línea basal continúa. (figura 21). De acículas secundarias de *P. montezumae* colectadas en las cercanías de Ocosingo, Chiapas; ejemplar **mC-003**, no incluido en el análisis filogenético.

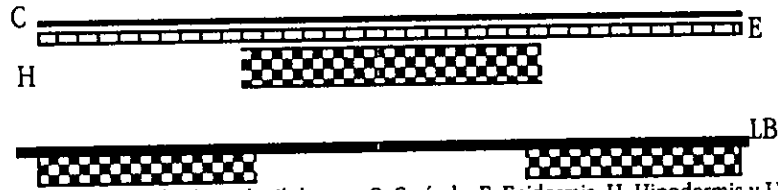


Figura 21. Representación de *L. durilabrum*. C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.

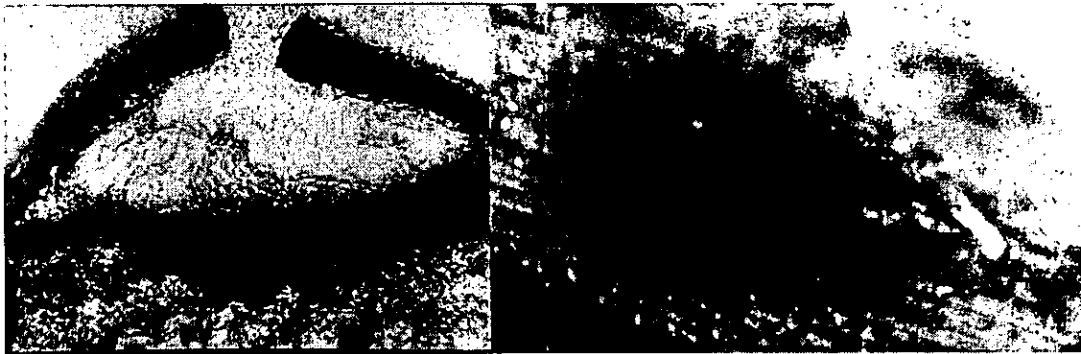
L. orientale.-Ascoma subepidérmico total. Sin labios. Sin pared basal (figura 22). De acículas secundarias de *P. rudis* (subgénero *Pinus*) colectadas en el Cerro del potosí, Nuevo León. Ejemplar **rP-001**, no incluido en el análisis filogenético.



Figura 22. Representación de *L. orientale*. C. Cutícula; E. Epidermis; H. Hipodermis y LB. Línea basal.



a



b



c

Figura 23. Corte transversal y vista exterior de *L. sp.* en a. y b. *P. ayacabuite*, Zempoala, Mor. y c en *P. longaeava*, California, EUA.

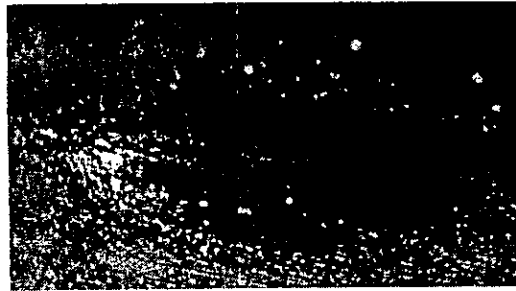


Figura 24. Vista exterior de *L. baculiferum*. El Cerro de Potosí, N.L.

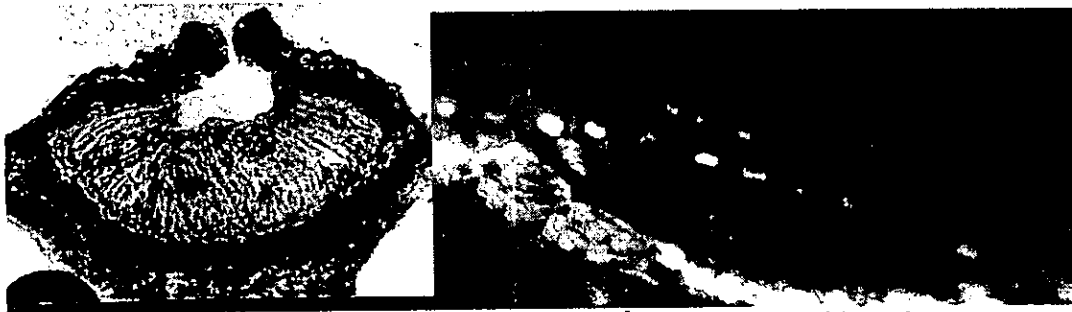


Figura 25. Corte transversal y vista exterior de *L. sp³. P. chiapensis*. Capulalpam, Oaxaca.

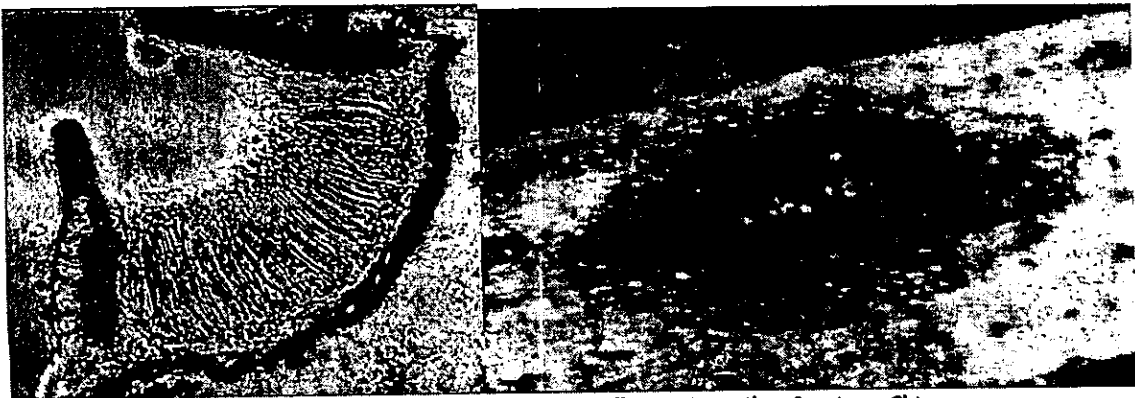


Figura 26. Corte transversal y vista exterior de aff. *L. pini-pumilae*. Ocosingo, Chiapas.

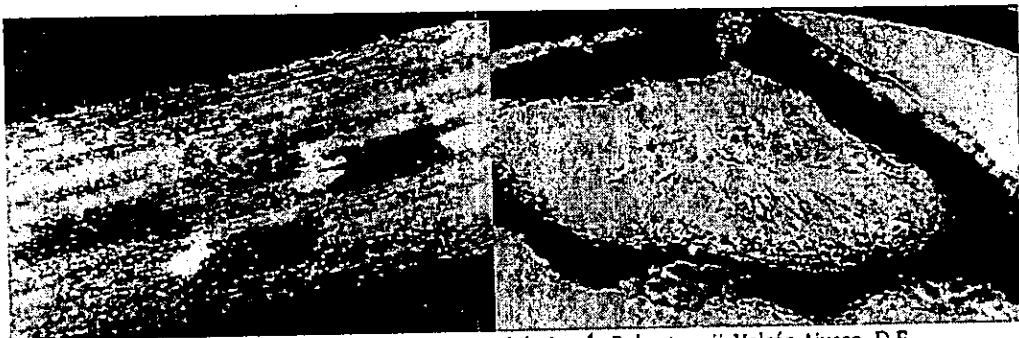


Figura 27. Vista exterior y corte transversal de *L. sp⁴. P. bartwegii*. Volcán Ajusco, D.F.



Figura 28. Corte transversal y vista exterior de *L. nitens*. Zempoala, Morelos.



Figura 29. Corte transversal y vista exterior de aff. *L. indianum*. Sierra de Juárez, Oaxaca.

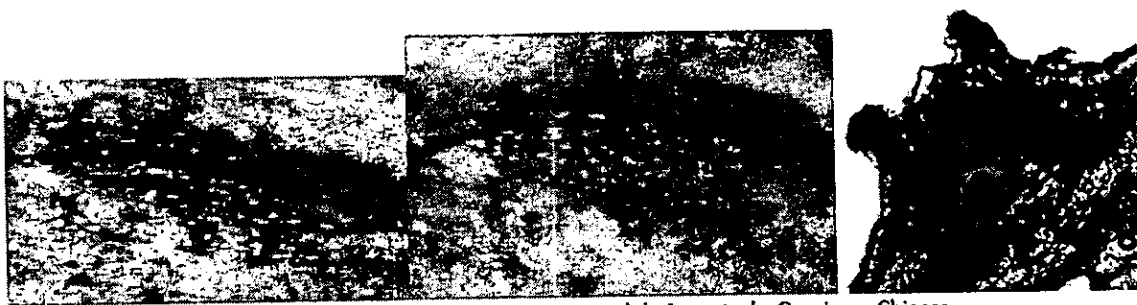


Figura 30. Vista s exterior ies y corte transversal de *L. australe*. Ocosingo, Chiapas.

Inferencia filogenética

Caracteres morfológicos

Se obtuvo un árbol más parsimonioso por búsqueda heurística (adición de ramas simple) de las relaciones entre las especies de *Lophodermium* conocidas en pinos, *sensu* Minter (1980a, 1981). Debido a que no se utilizó ningún grupo externo, este cladograma en realidad es una red; es decir la orientación de las ramas representadas es arbitraria (fig 31).

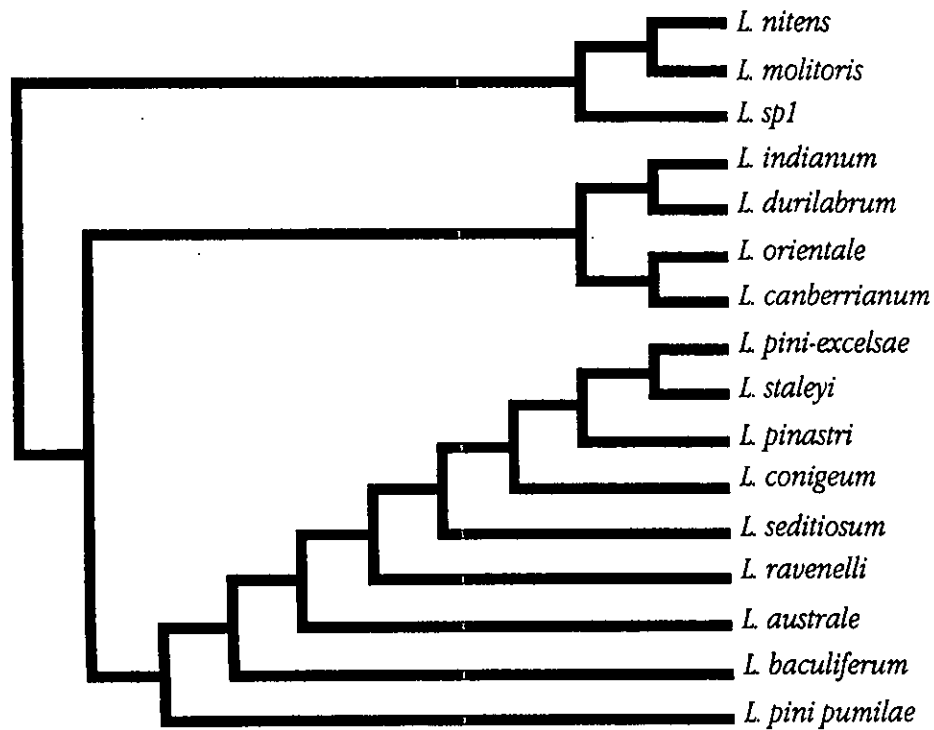


Figura 31. Red que representa las relaciones entre las especies de *Lophodermium* conocidas para pinos *sensu* Minter (1980b, 1981). Búsqueda Heurística: 1 árbol más parsimonioso.

Caracteres moleculares

Se presentan a continuación los cladogramas postulados en el punto *iv* de la alineación de secuencias en la sección de Materiales y Métodos:

En el primer análisis se utilizaron todas las secuencias de grupos externos, cercanos y lejanos, y se redujo el número de caracteres en la matriz para que fueran comparables. Se obtuvo un cladograma de consenso estricto (análisis *Bootstrap* (1,000 réplicas) de búsqueda heurística, adición de ramas al azar, 10 réplicas) en el que se incluyen las cepas cultivadas y los grupos externos que se mencionan en la sección de *Materiales y Métodos*. Este árbol incluye sólo aquellos caracteres que fueran comparables, la matriz es de ~600 caracteres y consta de 30 OTUs. Como se ve en la figura, *Lophodermium*, incluyendo *L. piceae*, forma un grupo monofilético a pesar de que el cladograma tiene poca resolución y bajos valores de *Bootstrap* (figura 32).

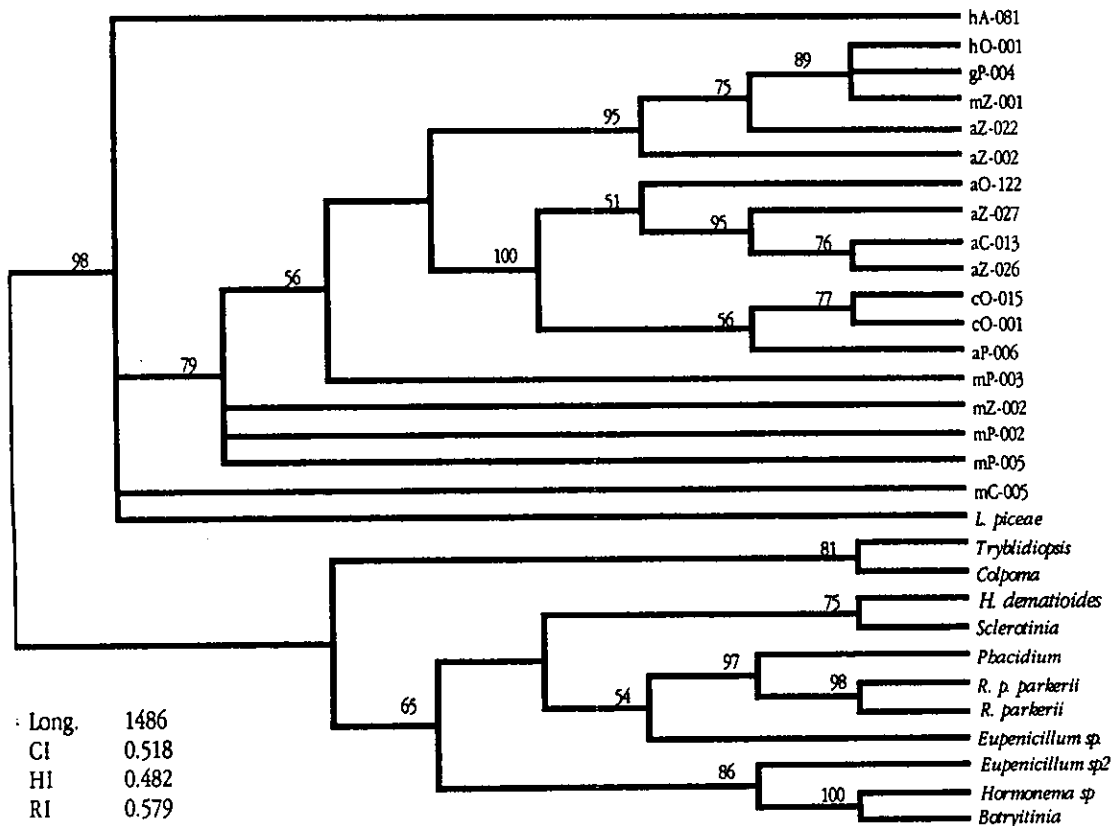


Figura 32. Cladograma que incluye a todos los grupos externos cuya matriz está reducida. Árbol consenso, prueba *Bootstrap* (1,000 rép.), búsqueda heurística con adición de ramas aleatoria, diez réplicas.

El segundo análisis consistió en la reducción del número de OTUs como una estrategia para aumentar el poder resolutivo del mismo. Se obtuvo un cladograma de consenso consenso estricto (figura 33) en el que las cepas de *Lophodermium* forman un grupo monofilético así como la familia Rhytismataceae en. Sin embargo, se puede apreciar que este análisis no resuelve las relaciones entre las cepas de *Lophodermium*, *L. piceae* y los géneros de Rhytismataceae *Tryblidiopsis* y *Colpoma* de Rhytismataceae.

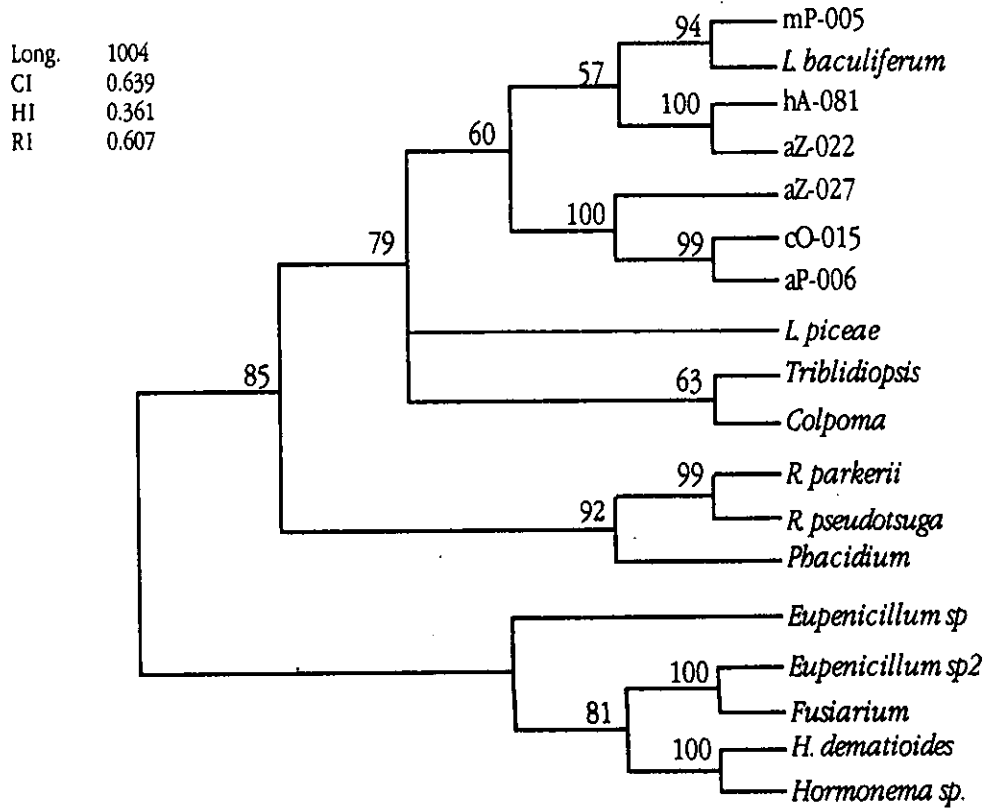


Figura 33. Cladograma en el que se han eliminado algunos OTUs del supuesto grupo interno. Árbol consenso, prueba *Bootstrap*, 1,000 réplicas; búsqueda Heurística con adición de ramas aleatoria.

En el tercer análisis se decidió explotar toda la información del ITS total utilizando para ello sólo las secuencias con un mayor número de caracteres a las que se ha llamado también secuencias "largas". Aquí se mantuvieron todos los OTUs del grupo interno y se conservaron como grupo externo sólo *Hormonema sp.* y *Eupenicillum* por ser las únicas secuencias de grupo externo comparables por su longitud. Esta matriz es utilizada en el análisis de caracteres combinados y también es empleada más adelante para el mapeo de caracteres y la discusión. La figura 34 muestra el cladograma de consenso estricto, resultado de un análisis de *Bootstrap* de búsqueda heurística (adición de ramas aleatoria, diez réplicas). La resolución es de nuevo discutible (véase la politomía aP-006, aC-013, aZ-026).

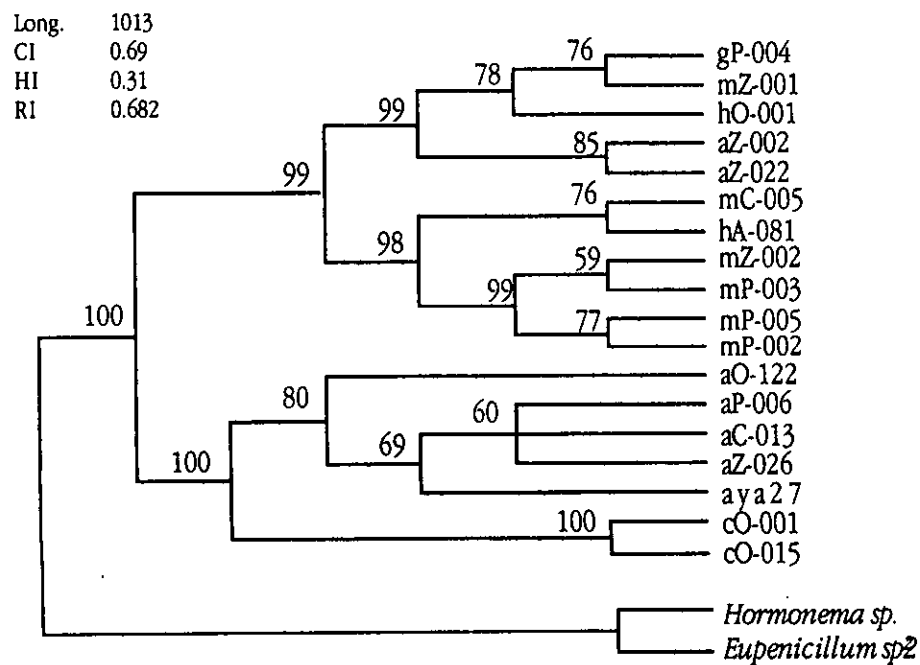


Figura 34. Árbol consenso, *Bootstrap* 1000 réplicas, búsqueda heurística, adición de ramas aleatoria, diez réplicas.

Con la matriz anterior, también se realizó un análisis del tipo de búsqueda *Branch and Bound* con el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993). En el cladograma (figura 35), se pueden notar algunas diferencias con el anterior (figura 34) como en el clado que contiene a aP-006, aC-013 y a cO-015y cO-001.

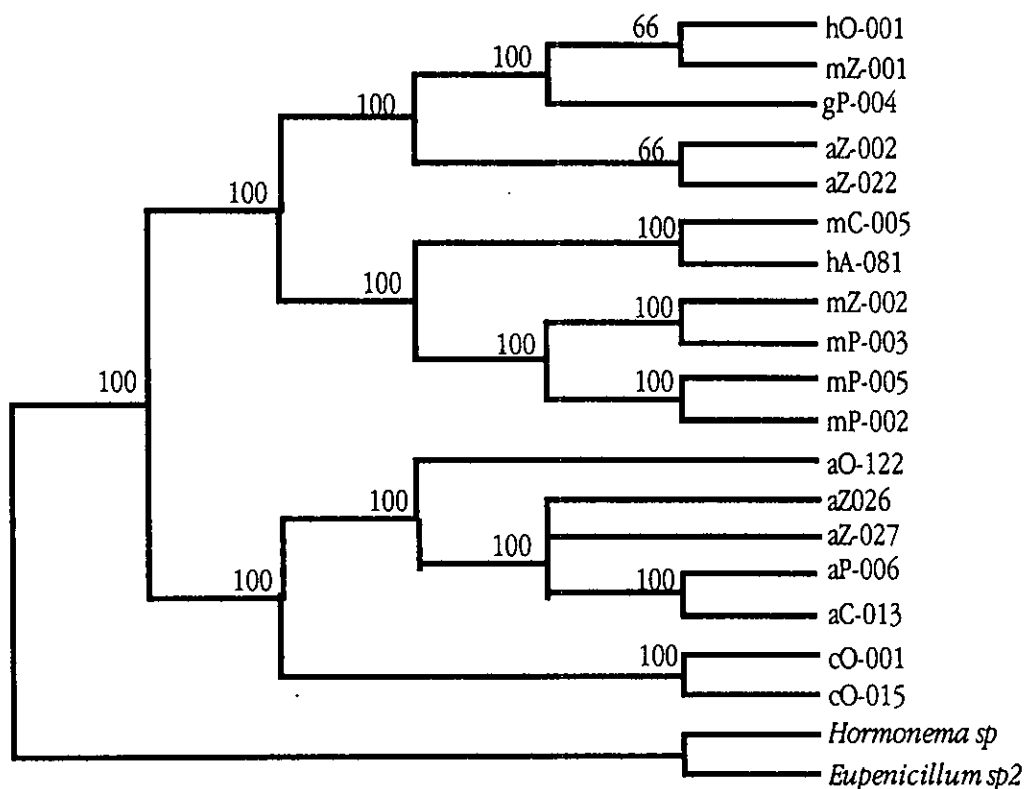


Figura 35. Árbol consenso estricto de búsqueda *Branch and Bound* realizado con el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993)

Matriz de caracteres combinados

En el siguiente cladograma se muestra el resultado de un análisis filogenético en donde se ha utilizado una matriz de caracteres combinados. La fuente de caracteres moleculares es la matriz de secuencias "largas" y la de caracteres morfológicos proviene directamente de las observaciones microscópicas hechas al material colectado. En ella (figura 36) se puede observar una politomía que no estaba en el anterior en donde sólo se usan caracteres moleculares (figura 35), la que forman mZ-002, mP-003 y (mP-005, mP-002). Por otra parte, esta matriz puede aportar información nueva acerca de la evolución de las estructuras sometidas a ella al mismo tiempo que permite el ejercicio de la falsificación de la manera más consistente con la lógica cladista del análisis filogenético (figura 35).

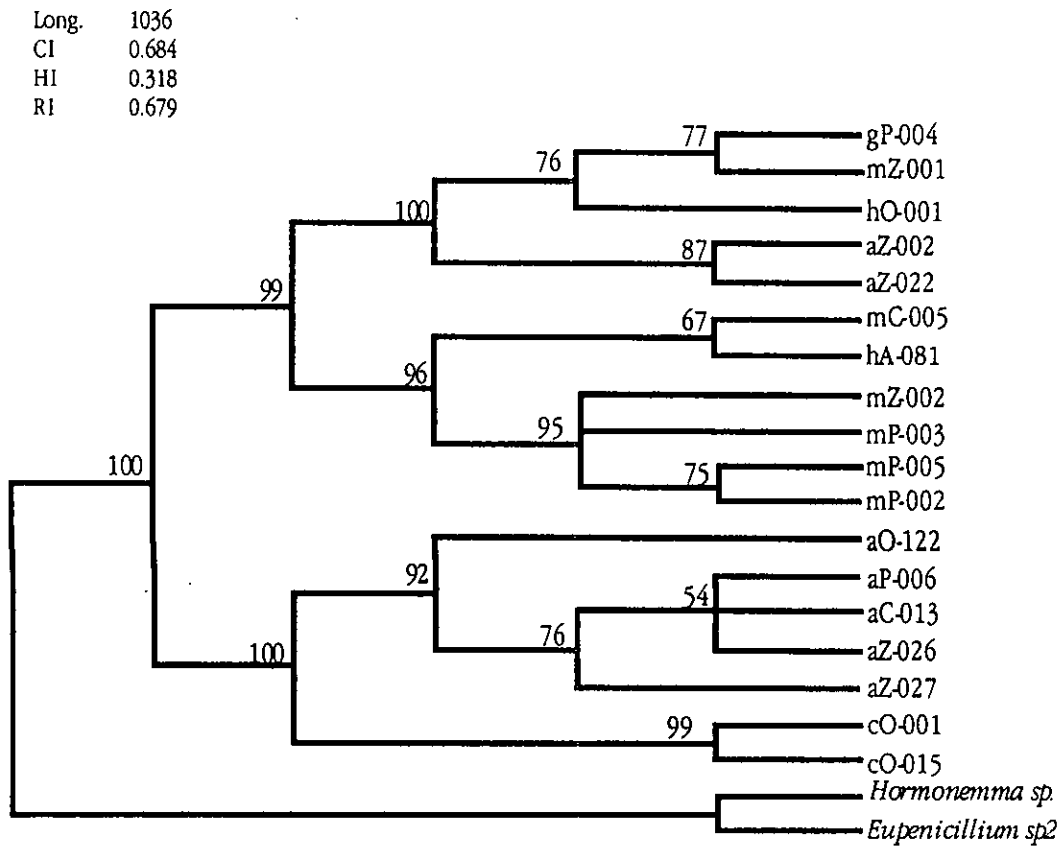


Figura 36. Árbol consenso estricto, *Bootstrap*, 100 réplicas, búsqueda heurística, adición de ramas aleatoria, diez réplicas. Matriz de caracteres combinados.

Distancias y tasas de evolución

De modo independiente al de la inferencia, se obtuvieron las distancias de Kimura (1980) entre las secuencias y se probó la tasa de evolución para diferentes grupo de OTUs, las siguientes tablas (tablas 3 y 4) muestran los resultados obtenidos.

		La-Lb	Z	Tasa constante	
A	1	-1.14458E-04	0.00165583	no refutada	1
B	2				2
C	3				3
A	1+2	-1.14458E-04	0.00165583	no refutada	5
B	3				6
C	4+5				7
A	6+7+8+9	0.014852	1.65371	no refutada	8
B	10+11				9
C	1+2+3+4+5				10
A	13	-0.00913236	1.00627	no refutada	11
B	16				12
C	14 ¹				13
A	16+14	-0.00655158	0.917112	no refutada	14
B	13				15
C	15 ¹				16
A	13+14+15+16	0.0128558	1.94329	no refutada	17
B	12				18
C	17+18				19
A	1+2+3+4+5	-0.0123365	1.19234	no refutada	20
B	6+7+8+9+10+11				<i>Hormonema sp</i>
C	12+13+14+15+16+17+18				<i>Eupenicillium</i>
A	1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11	-0.00628359	0.583036	no refutada	
B	12+13+14+15+16+17+18				
C	19+20				

Tabla 4. En esta tabla se muestra la comparación entre las tasas de evolución de varias secuencias calculadas con el programa Phyltest (Kumar, 1996). En la primera columna se aprecian los grupos a comparar (A y B) junto con el grupo externo utilizado (C); en la segunda columna el resultado de la diferencia entre la distancia que hay entre A y C y la que hay entre B y C. En la siguiente columna el valor de Z correspondiente y finalmente si con ese valor se refuta o no la homogeneidad en las tasas de evolución.

¹ El grupo formado por estos OTUs no es monofilético, por lo que esta comparación no es del todo válida.

OTUs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. gp-004																				
2. mZ-001	0.018																			
3. mC-005	0.0791	0.0731																		
4. ha-081	0.1052	0.0988	0.0573																	
5. hO-001	0.0235	0.0216	0.089	0.101																
6. mZ-002	0.0808	0.0807	0.0652	0.0767	0.0887															
7. aO-122	0.0826	0.0806	0.0807	0.1068	0.0886	0.0747														
8. mP-003	0.0788	0.0788	0.0613	0.0747	0.0867	0.0126	0.0825													
9. zZ-002	0.0308	0.0327	0.0791	0.1071	0.0439	0.0748	0.0689	0.0767												
10. cO-001	0.0925	0.0925	0.0866	0.1151	0.1006	0.1007	0.0383	0.1027	0.0865											
11. cO-015	0.0906	0.0906	0.0888	0.1132	0.0987	0.0967	0.0345	0.0987	0.0867	0.0216										
12. Hormonema	0.2057	0.2056	0.1894	0.1915	0.1942	0.1988	0.1892	0.2034	0.2084	0.187	0.1896									
13. <i>Eupenicillium</i>	0.1919	0.1923	0.2041	0.2151	0.1989	0.2037	0.2037	0.2033	0.2021	0.2139	0.2161	0.21								
14. mP-005	0.1029	0.0987	0.0808	0.0885	0.1069	0.0308	0.0946	0.0364	0.1008	0.1213	0.1152	0.2222	0.2103							
15. zP-006	0.1006	0.0986	0.0927	0.113	0.1047	0.0906	0.0235	0.0945	0.0946	0.0496	0.042	0.1983	0.2056	0.0946						
16. zZ-027	0.0907	0.0846	0.0807	0.1068	0.0926	0.0846	0.0107	0.0885	0.0807	0.0458	0.042	0.1983	0.2036	0.0926	0.0198					
17. aC-013	0.1027	0.1007	0.0988	0.1214	0.1068	0.0906	0.018	0.1007	0.0887	0.0496	0.0458	0.2054	0.2178	0.1068	0.0235	0.018				
18. zZ-002	0.0906	0.0886	0.0887	0.1109	0.0966	0.0826	0.0071	0.0905	0.0767	0.0421	0.0383	0.1983	0.206	0.0966	0.0198	0.0071	0.0143			
19. zZ-022	0.0253	0.0272	0.0712	0.0969	0.0383	0.0669	0.0728	0.065	0.0253	0.0925	0.0906	0.2083	0.1944	0.0886	0.0905	0.0807	0.0926	0.0806		
20. mP-002	0.1278	0.1194	0.107	0.0986	0.1362	0.0688	0.136	0.0668	0.132	0.1554	0.1511	0.2536	0.2439	0.0707	0.1424	0.1338	0.1489	0.1381	0.1173	

Tabla 3. Distancias de dos parámetros de Kimura (1980) entre los OTUs.

D i s c u s i ó n

Algunos representantes de la familia Rhytismataceae, a la que pertenece *Lophodermium*, han presentado serios problemas para su clasificación, por lo que la hace dudosa y confusa. Debido a esto, se trató de generar un contexto en el que se valide la monofilia de algunos representantes de Rhytismataceae y de las cepas de *Lophodermium* utilizadas aquí. El contexto de que se habla es de suma importancia ya que, de no generarlo, se estaría estableciendo una hipótesis *a priori*: que *Lophodermium*, o al menos sus representantes en pinos, es un grupo monofilético. Sin embargo, los cladogramas que se obtuvieron utilizando todos los grupos externos no aportan suficiente información como para cumplir todos los objetivos de este trabajo. Por tal motivo se efectuó otro análisis, en donde los grupos externos no son los más óptimos pero sí hacen posible la comparación de toda la información del ITS disponible, lo que redundará en el planteamiento de una hipótesis acerca de las relaciones entre los taxa aislados, es decir que existe mejor información para cumplir con los objetivos planteados.

Así, de entre todos los análisis que se realizaron, se utiliza el llamado de secuencias "largas" para la argumentación del resto de esta discusión. El resultado de este análisis *no* debe, de ninguna manera, ser tomado como la filogenia del grupo porque lejanamente incluye a todos sus representantes, sin embargo sí es útil en cuanto a los objetivos que se plantearon. Se trata de una muestra de los representantes de *Lophodermium* sobre algunas especies de pino en cierta parte de su distribución en México que por sí sola puede contar una historia, aunque con límites.

Una vez que se obtuvo una hipótesis confiable sobre las relaciones que existen entre los aislados de *Lophodermium* encontrados, y que estos han sido identificados en la medida de lo posible, es plausible comparar dicho cladograma con el obtenido a partir de información bibliográfica sobre la morfología de las especies de *Lophodermium* en pinos. Lo anterior responde al hecho de que en la taxonomía que se ha hecho hasta ahora sobre *Lophodermium* (Darker, 1967; Minter, 1980a, 1981; Changlin *et al.*, 1997) sólo se han considerado unos pocos caracteres morfológicos, y algunos del tipo ecológico. Lo que quiere decir que como el significado filogenético de estos caracteres es desconocido, se puede explorar éste mapeando caracteres morfológicos sobre el cladograma de datos moleculares.

Por último, es posible detallar la información que nos ofrece el resultado del análisis filogenético de los hongos aislados, cuando se la ve en el contexto de la distribución y la historia natural de los pinos; lo que finalmente es una aproximación a la historia natural de *Lophodermium* en algunos pinos mexicanos a través de la inferencia filogenética. Todo lo anterior forma parte de la discusión que se extiende a partir del siguiente párrafo.

La especificidad de *Lophodermium*

En la figura 37 se ha mapeado la especificidad al hospedero a nivel de subgénero de pinos sobre la filogenia molecular obtenida a partir de aislados de *Lophodermium*. Se puede apreciar que en términos generales, existe especificidad por uno u otro subgénero con la excepción de los aislados aZ-002 y aZ-022 que corresponden a la *morfoespecie* definida como *L. sp.2.*, las cuales fueron aisladas a partir de un mismo hospedero (*P. ayacabuite*), proveniente de Zempoala, Morelos.

La hipótesis más simple es que ha ocurrido un salto de hospedero. Sin embargo, con los resultados aquí obtenidos no se puede saber cuándo o desde qué otro hospedero pudo haberse dado el salto. Por otra parte, el haber encontrado este *morfo* en muestras de otros pinos, como *P. cembra* y *P. longaeva*, pertenecientes al mismo subgénero que *P. ayacabuite*, pero lejanos en distribución, hace suponer que este salto no es reciente. La interpretación del parecido de *L. sp.2* y *L. sp.3* es ambigua, pudiera ser totalmente circunstancial pero, de nuevo, al no tratarse sino de una muestra de la biodiversidad de *Lophodermium* sobre pinos, el cladograma podría estar enmascarando una historia diferente.

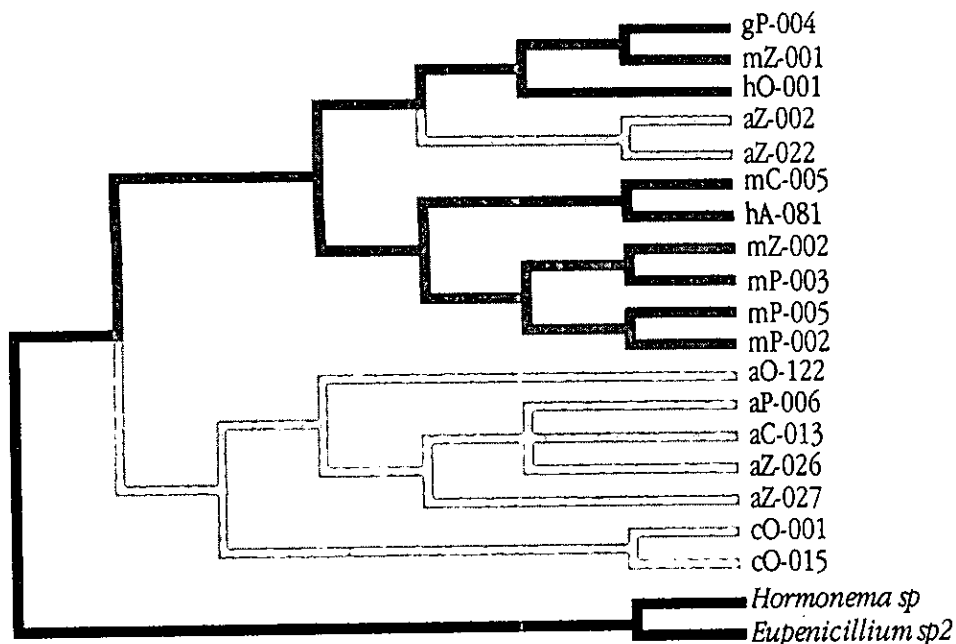


Figura 37. Mapeo del subgénero de pinos al que pertenecen los hospederos de las cepas de *Lophodermium* utilizadas. En gris claro el subgénero *Strobis* y en oscuro *Pinus*.

En la figura 38 se han contrapuesto dos cladogramas. El de la izquierda es el que se obtuvo con caracteres morfológicos provenientes de la monografía de Minter (1981) y el de la derecha, es el que muestra las hipótesis de relaciones entre los *Lophodermium* colectados, considerando datos moleculares. Se nota que la diversidad conocida de *Lophodermium* es representada sólo con las especies *L. nitens*, *L. indianum*, *L. pini-pumiale* y *L. baculiferum*. De ellas resaltan dos, *L. nitens* y *L. baculiferum*, que son las mejor representadas y que además forman, en este cladograma, un grupo monofilético cada una. Además existen tres *morfos* incluidos en el análisis con caracteres moleculares que no tienen correspondencia con ninguna especie descrita: *L. sp.2* (aZ-002 y aZ-022), *L. sp.3* (cO-001 y cO-015), y *L. sp.4* (hA-081).

La comparación es precaria porque no están incluidos los mismos OTUs en cada una de ellas, porque es muy probable que en ninguna de las dos estén representados todas las especies de *Lophodermium* que se desarrollan en pinos, porque el cladograma obtenido de caracteres morfológicos no está enraizado y su orientación ha sido arbitraria y porque varias ramas del cladograma molecular corresponden a uno solo del morfológico, es decir que los niveles jerárquicos de la comparación no se validan en ella. Sin embargo, se rescata de esta comparación el patrón de especificidad antes visto (i.e. Vázquez Lobo, 1996) y alguna correspondencia en la topología.

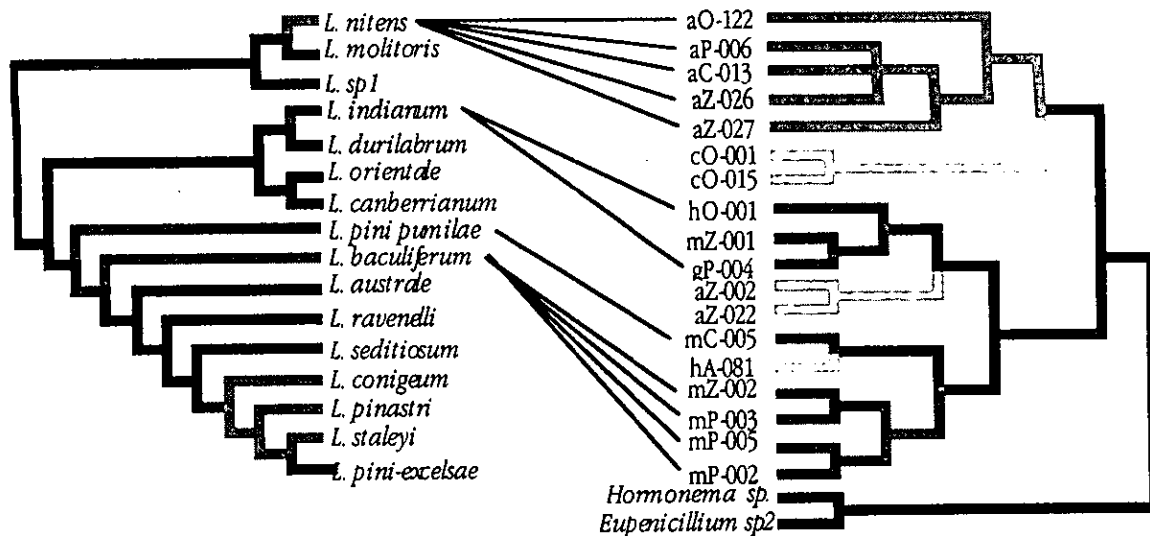


Figura 38. Comparación del cladograma de las especies de *Lophodermium* para pinos con caracteres morfológicos (izquierda) y el de las cepas utilizadas en este trabajo con caracteres moleculares(derecha). Las líneas representan la correspondencia morfológica entre ellos.

Mapeo de caracteres morfológicos

Por otra parte, el significado de la comparación anterior puede estimarse mejor si se conoce la distribución de los caracteres morfológicos sobre el cladograma molecular. En la figura 39 se ha mapeado uno de los caracteres más conspicuos y tradicionalmente utilizado para la determinación de especies de *Lophodermium*: la forma en que sus ascomas están embebidos en la acícula.

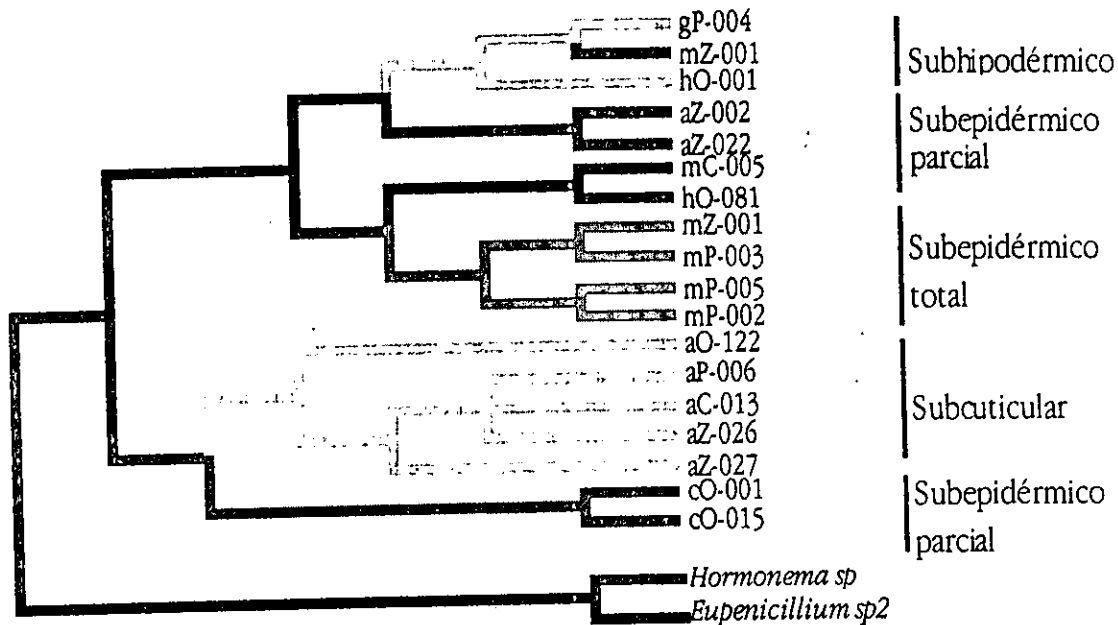


Figura 39. Mapeo de la forma en que están embebidos los ascomas en las acículas de su hospedero sobre el cladograma obtenido a partir de caracteres moleculares.

La hipótesis aquí obtenida, plantea que el grupo de ascomas subcuticulares es monofilético, no obstante, es importante mencionar que actualmente sólo se conocen dos especies reportadas para pinos que lo presentan de esta manera y de ellas sólo se tiene representada una: *L. nitens*. Lo mismo ocurre para los ascomas totalmente subepidérmicos y subhipodérmicos parciales; para los primeros existen seis especies reportadas de las cuales sólo se tiene una: *L. baculiferum* y de los segundos hay tres especies pero sólo se tiene una en este estudio: *L. indianum*.

En los ascomas subepidérmicos parciales el patrón es diferente. Primero, porque el carácter parece ser polifilético o, mejor dicho, con el acotamiento apropiado de la muestra, homoplásico, y segundo, porque se encontraron cuatro morfoespecies con este carácter de las cuales sólo una: *L. pini-pumilae* coincide con las cinco que han sido reportadas en la literatura con el mismo carácter.

La mayor parte de las especies de *Lophodermium* tienen ascocarpos subepidérmicos, lo que hace comprensible que la taxonomía de este grupo morfológico se base también en caracteres como la presencia y el color de los labios, sin embargo, como se muestra en la figura 40, la presencia o ausencia de labios no es congruente y más bien revela a los labios como un carácter con información ambigua.

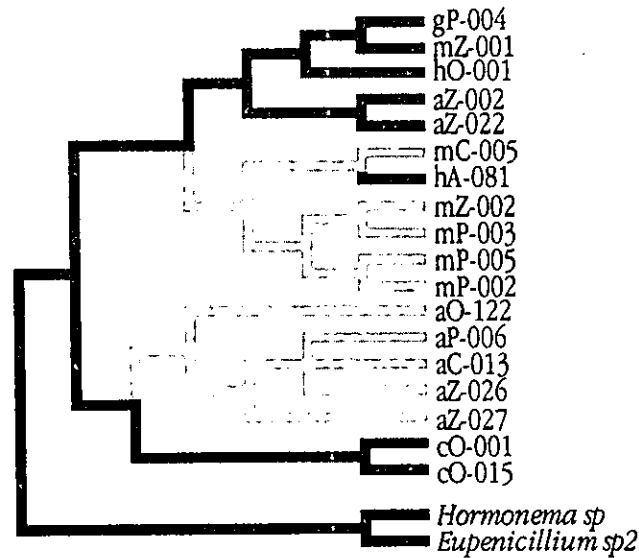


Figura 40. Presencia (gris oscuro) y ausencia (gris claro) de labios en el cladograma molecular de los aislados de *Lophodermium*.

Lo anterior hace pensar que finalmente se necesitan otros caracteres que reflejen mejor relaciones de parentesco, como la ontogenia del ascoma, y más aún, ajustar la forma en que se aprecian los caracteres morfológicos. En cuanto a algunas características ecológicas que se han utilizado para distinguir especies de *Lophodermium* (Minter *et al.*, 1978 y Minter *et al.*, 1980) existe el problema que es el mismo que se tiene para la definición de un hongo endófito: la interacción con su hospedero es dinámica, por lo que el hongo puede variar sus hábitos dependiendo de las circunstancias. A este respecto, se debe destacar que el muestreo realizado para esta tesis se realizó en una época del año solamente, por lo que no se descarta la presencia de otros representantes del género con diferentes tiempos para su reproducción.

¿Evidencias con implicaciones ecológicas?

Partiendo de la comparación entre los clados que representan a cada una de las *morfoespecies*, el conjunto de clados que corresponden a *L. nitens* y a *L. baculiferum* parecen estar representando a más de una especie. Las distancias y las tasas de evolución sugieren una gran variabilidad (ver tablas 3 y 4) entre los individuos de estas especies utilizados en el análisis molecular. Sobre *L. baculiferum* se tienen referencias (Stone, com.pers.) que la hacen parecer un complejo de especies, además de que se tiene el antecedente del complejo *L. pinastri* que ha sido dilucidado con base en características ecológicas (Minter *et al.*, 1980). Por todo lo anterior, no sería descabellado contar una historia con el mismo argumento para *L. nitens*.

Finalmente, esta historia requiere de su otro elemento, los pinos, para ser contada correctamente. En este estudio se aislaron sólo dos especies de *Lophodermium* de *P. ayacabuite*, mientras que *P. montezumae* tiene seis (ver tabla 2 en Resultados). Cabe aclarar que este resultado podría ser la consecuencia de un muestreo insuficiente, y que para validar estas observaciones haría falta respaldarlas con el número de ocurrencias para cada morfo por cada hospedero. Sin embargo, este procedimiento resulta muy tardado, pues aunque se tenga el suficiente entrenamiento en el reconocimiento de las especies de *Lophodermium*, se deben hacer cortes de todos y cada uno de los individuos. A veces se pueden encontrar decenas de individuos en una sola acícula y en una sola muestra pueden haber centenas de acículas, lo que hace a este procedimiento poco viable en los tiempos establecidos para la realización de este trabajo.

P. ayacabuite es la única especie de pinos blandos, junto con *P. chiapensis*, que se extiende más allá del eje Neovolcánico, por lo general, está aislada de otros pinos del mismo subgénero, por lo que podría suponerse que el salto de hospederos, teniendo como referencia el nivel de especificidad de *Lophodermium* encontrado en este estudio y en anteriores (Vázquez Lobo, 1996), es más complicado que para *P. montezumae*, una especie muy bien distribuida, con muchas otras especies de pinos duros simpátricos a ella y con la capacidad de hibridar con muchos de ellos (Perry, 1991). En otras palabras, *L. nitens*, y aún *L. sp.2*, la otra especie hallada en *P. ayacabuite*, estarían casi excluidos de la posibilidad de cambiar su hospedero. Lo que de alguna manera también podría argumentar el contraste entre la diversidad morfológica y la diversidad genética encontradas (figura 41).



Figura 41. Cladograma en el que se destacan las especies de hospederos para las cepas utilizadas.

Otras consideraciones

Aún cuando el tipo de colecta realizado es insuficiente para hacer grandes hipótesis, caben resaltar algunos resultados que generan nuevas hipótesis sobre la ecología de *Lophodermium*. Por ejemplo, ¿se pueden encontrar algunas restricciones ecológicas a través de este trabajo? *L. sp. 2* sólo fue colectado en Zempoala y no en algún otro lugar de México, sin embargo, esta especie también fue encontrada en *P. cembra* y *P. longaeva* en E.U.A.; *L. baculiferum* se encontró sobre todo en el cerro del Potosí, ¿es posible encontrar aquí restricciones a la dispersión del hongo, como el aislamiento geográfico de este sitio? En la introducción se habla de especies dominantes en las comunidades de endófitos que varía dependiendo de varios factores ambientales, está claro que para México el papel que puede jugar la altitud no debiera ser tan determinante, pues, con una excepción, sólo hay pinos en regiones altas. Así que los factores que más afectan la colonización y la predominancia de especies en México debe estar determinada por la humedad, el tipo de suelo, la frecuencia e intensidad de las heladas y probablemente también la combinación de la vegetación.

Con respecto a esto último, existen lugares en México en los que los bosques son dominados por los pinos y otros en los que se encuentran mezclas de vegetación poco comunes, como en los bosques mesófilos y en otras zonas de transición de la vegetación. Al mismo tiempo existen bosques de pino con pocas especies y otros donde hay una gran cantidad de ellas, bosques con una gran cantidad de endemismos y bosques con especies muy comunes pero altamente variables en cuanto a morfología y hábitos. Por todo lo anterior, sería interesante comparar la diversidad de *Lophodermium* y de otros hongos endófitos en todos los ambientes antes

mencionados; no sólo por un interés meramente académico sino porque los hongos endófitos son una parte importante de un recurso finito e irremplazable: los bosques.

Finalmente, es justo nombrar algunas de las vicisitudes que se deben tomar en cuenta cuando se pretende una aproximación como esta. En primer lugar la acotación del lugar físico del estudio es muy importante; resulta muy atractivo comparar zonas distantes y ambientes disímiles, sin embargo la escala de un endófito es mucho menor. Hay muchos trabajos (ver introducción) sobre las comunidades de hongos endófitos dentro de un solo árbol e incluso dentro de una sola rama, por lo que los resultados que se obtengan en colectas muy generales serán muy limitados hacia el nivel básico de la interacción. También debe tomarse en cuenta que la interacción de la que se habla es sumamente dinámica, que la época del año en que se colecte puede mostrar resultados muy diferentes a otras épocas, que los ascomas de *Lophodermium* son muy delicados y el tiempo que pasa entre la colecta y su procesamiento es vital para la obtención de esporas y la germinación de éstas. Por último, el poder cultivar *Lophodermium in vitro* es aducir en contra de la obligatoriedad hacia el hospedero, más no a la especificidad.

C o n c l u s i o n e s

Considerando los individuos utilizados en los análisis filogenéticos y a las observaciones hechas a otros que no fueron incluidos, se puede concluir que la especificidad de *Lophodermium* se da generalmente al nivel de subgénero en los pinos. Lo cual corrobora lo encontrado por Vázquez Lobo (1996) para una muestra de hongos endófitos que presumiblemente pertenecían a diversos géneros. Por esto, sería muy interesante reanalizar los datos de Vázquez Lobo incorporando las secuencias de identificados de *Lophodermium* del presente trabajo, de tal forma que se conociera cuántas de esas secuencias pertenecen a *Lophodermium* y así completar un poco la información global del género en los pinos de México.

Según los datos obtenidos en este trabajo, *P. ayacabuite* tiene sólo dos especies de *Lophodermium*: *L. nitens* y *L. sp*². Lo cual puede atribuirse a su aislamiento de otras especies de pinos blandos. Sin embargo, debido a la variabilidad encontrada dentro de la especie *L. nitens*, es posible que ésta sea un complejo de especies o simplemente una especie muy variable o en vías de especiación.

Por el contrario, *P. montezumae* tiene más diversidad de especies de *Lophodermium*, (aunque se puede considerar que *L. baculiferum* podría ser la especie dominante en este pino a partir de los resultados obtenidos), lo cual puede deberse al efecto contrario postulado para *P. ayacabuite*, es decir, la simpatria frecuente con otras especies de pinos duros y su capacidad de hibridar con ellos podrían facilitar el salto de hospederos por parte del hongo.

El hallazgo de morfos que no concuerdan con la descripción de ninguna especie de *Lophodermium* en una colecta que no fue exhaustiva hace suponer que existen especies de *Lophodermium* en nuestro país que no han sido descubiertas. Sin embargo, el fundamento de esta conclusión radica en el significado filogenético que tienen los caracteres morfológicos comúnmente utilizados para reconocer a las diferentes especies de este hongo.

Con base en lo anteriormente aducido, una de las prioridades para continuar una línea de investigación parecida a la presente debe partir de alguna manera sobre el hecho de que la taxonomía y la sistemática de *Lophodermium* debe revisarse.

En el mismo contexto, sería útil generar modelos sobre la interacción endófito como una forma de aproximarse a la gran cantidad de incógnitas que prevalecen en este campo. En otras palabras, es necesaria la integración de las partes (o cuando menos de algunas de ellas) para vislumbrar el universo que en este tipo de ejemplos se guarece.

* * *

Referencias

- Alvarado, D. y de Bauer L.I. 1991. Ataque de *Lophodermium* sp. en Poblaciones Naturales de *P. bartwegii* de "El Ajusco", México, Bajo el efecto de gases oxidantes. *Mycologia Neotropical Aplicada* 4: 99-109.
- Álvarez-Buylla, E.R. y F. Espinosa-García. 1996. *Filogenia molecular y especificidad de hongos endófitos en el género Pinus L.* Protocolo presentado al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Archie, J.W. 1996. Measures of Homoplasy. En Sanders, M.J. y L. Hufford (Eds.). *Homoplasy: The Recurrence of Similarity in Evolution*. Academic Press, London.
- Armbruster, W.S. 1992. Phylogeny and the evolution of plant-animal interactions. *Bioscience* 42: 12-20.
- Atsatt, P.R. 1988. Are vascular Plants "inside-out" Lichens? *Ecology* 69(1): 17-23.
- Bartnicki-García, S. 1970. Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. En Harborne, J.B. (Ed.) *Phytochemical Phylogeny*. Academic Press, New York. p. 81-103.
- Berbee, M.L. y J.W. Taylor. 1992. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *BioSystems* 28: 117-125.
- Berstein, M.E. y G.C. Carroll. 1977. Internal fungi in old-growth Douglas-fir foliage. *Canadian Journal of Botany* 55: 644-653.
- Bertoni, M.D. y D. Cabral. 1986. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*. II: Distribution of Endophytes. *Nova Hedwigia* 46: 491-502.
- Brewer, K. 1994. Branch support and the tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Briard, M., M. Dutertre, F. Rouxel y Y. Brygoo. 1995. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. *Mycological Research* 99(12): 1119-1126.
- Brooks, D.R. 1981. Hennig's parasitological method, a proposed solution. *Systematic Zoology* 30: 229-249.
- Brooks, D.R. y D.A. McLennan. 1990. *Phylogeny, Ecology and Behavior*. University of Chicago Press, Chicago.
- Bruns, T.D., T.J. White y J.W. Taylor. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Carpenter, J.M. 1992. Random cladistics. *Cladistics* 8: 147-153.
- Carroll, G. 1986. The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En Fokkema, N.J. y J. van den Havel (Eds.). *Mircobiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carroll, G. C. y F.E. Carroll. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal Botany* 56:3034-3043.
- Carroll, G. 1988. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* 69(1): 2-9.
- Catal, M. y G.C. Adams. 1997. *Hormonema dematioides* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession: AF013228, GeneBank.
- Changlin, H. 1996. *Lophodermium* on *P. taiwanensis* from X Park. *Forest Research* 9(1):64-67.
- Chapela, H.I., O. Petrini y G. Bielser. 1993. The physiology of ascospores eclosion in *Hypoxylon fragiforme* mechanisms in the early recognition and establishment of an endophytic symbiosis. *Mycological Research* 97(2): 157-162.
- Clay, K. 1986. Grass endophytes. En Fokkema, N.J. y J. van den Havel (Eds.). *Mircobiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Clay, K. 1988a. Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology* 69(1): 10-16.
- Clay, K. 1988b. Coevolution of Flowering Plants with Fungal Pathogens. En Pirozynski K.A. y D.L. Hawksworth (Eds.). *Coevolution of Fungi with Plants and Animals*. Academic Press, Londres.
- Coddington, J. 1988. Cladistic tests of adaptational hypotheses. *Cladistics* 4: 3-22.
- Darker, G.D. 1967. A revision of the genera of the Hypodermataceae. *Canadian Journal of Botany* 45: 1399-1444.

- De Pinna, M. 1994. Ontogeny, rooting, and polarity. En: Scotland, R.W., D.J. Siebert y D.M. Williams. *Models in Phylogeny Reconstruction*. Clarendon Press. Oxford.
- De Pinna, M. 1996. Comparative Biology and Systematics: Some controversies in retrospective. *Journal of Comparative Biology* 1(1/2): 3-15.
- De Quiroz, A., M.J. Donoghue y J. Kim. 1995. Separate versus combined analyses of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26: 657-681.
- Dowling, T.E., C. Moritz y J. Palmer. 1996. Nucleic Acids II: Restriction site analysis. En: Hillis, D.M., C. Moritz y B.K. Mable (Eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.
- Doyle, J.A., M.J. Donoghue y E. A. Zimmer. 1994. Integration of morphological and ribosomal RNA data on the origin of angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 419-450.
- Doyle, J.J. 1996. Homoplasy connections and disconnections: genes and species, molecules and morphology. En Sanders, M.J. y L. Hufford (Eds.). *Homoplasy: The Recurrence of Similarity in Evolution*. Academic Press, London.
- Eernise, D.J. y A.G. Kluge. 1993. Taxonomic congruence versus total evidence, an amniote phylogeny obtained from fossils, molecules and morphology. *Molecular Biology and Evolution* 10: 1170-1195.
- Egger, K.N. 1996. Molecular Systematics of E-strain mycorrhizal fungi: *Wilcoxina* and its relationship to *Tricharina* (Pezizales). *Canadian Journal of Botany* 74(5): 773-779.
- Eguiluz Piedra, T. 1978. *Ensayo de integración sobre conocimientos de género Pinus*. Tesis Profesional. E.N.A.CH. Chapingo, Mexico.
- Eriksson, O.E. y K. Winka. 1998. Families and higher taxa of Ascomycota. *Myconet* 1(2): 17-24.
[<http://www.ekbot.umu.se/pmg/18s/fam.rtf.html>]
- Espinosa-García, F.J. y J.H. Langenheim. 1991. The Leaf Fungal Endophytic Community of a Coastal Redwood Population. Diversity and Spatial Patterns. *New Phytologist* 116:89-98.
- Faith, D.P. y P.S. Cranston. 1991. Could a cladogram this short have arisen by chance alone? On permutation tests for cladistic structure. *Cladistics* 7: 1-28.
- Farjon, A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: Speciation and Paleoendemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* 121: 365-384.
- Farris, J.S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. En Platnik, N.I. y V.A. Funk (Eds.). *Advances in Cladistics* Vol. 2. Columbia University Press, New York.
- Farris, J.S. 1988. *Hennig 86 version 1.5 manual*, software on MSDOS program.
- Farris, J.S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 2: 14-27.
- Fisher, P.J., F. Graf, L.E. Petrini, B.C. Sutton y P.A. Wookey. 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from Swiss Alps. *Mycologia* 87(3):319-323.
- Fitch, W.M. 1970. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Zoology* 19: 99-113.
- Forey, P.L., C.J. Humphries, I.L. Kitching, R.W. Scotland, D.J. Siebert y D.M. Williams. 1992. *Cladistics: A practical course in Systematics*. Oxford University Press, Oxford.
- Gardes M. y T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- applications to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gernandt, D.S., F.J. Camacho y J.K. Stone. 1997. *Meria laricis*, an anamorph of *Rhabdocline*. *Mycologia* 89: 735-744.
- Gilbert, D.G. 1996. SeqPuP program, ver. 0.6. Indiana University, Bloomington, IN 47405.
- Gray, G.S. y W.M. Fitch. 1983. Evolution of antibiotic resistance genes : The DNA sequence of a kanamycine resistance gene from *Staphylococcus aureus*. *Molecular Biology and Evolution*. 1: 57-56.
- Gremmen, J. 1980. Ecology of Fungi colonizing living and dead needles of Pines. En Millar C. S. (Ed.). *Current Research on Conifer Needle Diseases* Proc. IUFRO W.P. on Needle Diseases, Sarajevo. p. 1-5.
- Hawksworth, D.L., P.M. Kink, B.C. Sutton y D.N. Pegler. 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (Octava edición). CAB International, Wallingford, U.K.

- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Hillis, D.M., C. Mortiz y B.K. Mable (Eds.). 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Holst-Jensen, A. 1998. Nuclear rDNA phylogeny of the Sclerotiniaceae. En prensa.
- Jasalavich, C.A., V.M. Morales, L. E. Pelcher y G. Séguin-Swartz. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research* 99(5): 604-614.
- Johnson, J.A. y N.J. Whitney. 1989. An investigation of needle endophyte colonisation patterns with respect to height and compass direction in a single crown of balsam fir (*Abies balsamea*). *Canadian Journal of Botany* 67: 723-725.
- Johnston, P.R. 1992. Rhytismataceae in New Zealand. 6. Checklist of species and hosts with keys to species on each host genus. *New Zealand Journal of Botany* 30: 329-351.
- Källersjö, M., J.S. Farris, A. G. Kluge y C. Bulf. 1992. Skewness and permutation. *Cladistics* 8: 275-287.
- Keller, R.A. 1998. *Bases Metodológicas del uso de grupo externo en los análisis cladísticos*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México..
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kitching, I.J. 1992. The determination of character polarity. En Forey, P.L., C.J. Humphries, I.L. Kitching, R.W. Scotland, D.J. Siebert y D.M. Williams (Eds.). *Cladistics: A practical course in Systematics*. Oxford University Press, Oxford.
- Kluge, A.G. 1997. Testability and the Refutation and Corroboration of Cladistic Hypotheses. *Cladistics* 13: 81-96.
- Kumar, S. 1996. PHYLTEST: A program for Phylogenetic Hypothesis Testing, version 2. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Kumar, S., K. Tamura, y M. Nei. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Legault, D., M. Dessureault y G. Laflamme. 1989. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa*. I. Champignons endophytes. *Canadian Journal Botany* 67: 2052-2060.
- Li, W-H. y D Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Li, W-H. y A. Zharkikh. 1994. What is the bootstrap technique? *Systematic Biology* 43(3): 424-430.
- Liston, A., and Alvarez-Buylla, E.R. 1995. Nuclear Ribosomal DNA sequences of conifers: "There is a fungus among us". *Inoculum* 46(3): 26.
- Lucklow, M., y A. Bruneau. 1997. Circularity and Independence in Phylogenetic Tests of Ecological Hypotheses. *Cladistics* 13: 145-151.
- Maddison, D.R. (Ed.). 1998. *The tree of Life*. <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>
- Martínez, M. 1948. *Los pinos mexicanos* Segunda Edición. Botas, México.
- McCune, B. 1988. Ecological Diversity in North American Pines. *American Journal of Botany* 75: 353-368.
- Minter, D.W. 1980a. *Lophodermium* species on needles En Millar C. S. (Ed.). *Current Research on Conifer Needle Diseases* Proc. IUFRO W.P. on Needle Diseases, Sarajevo. p. 49-59.
- Minter, D.W. 1980b. *Leptostroma* on pine needles. *Canadian Journal of Botany* 58: 906-917.
- Minter, D.W. 1981. *Lophodermium* on pines. *Mycological Papers* 147: 1-54
- Minter, D.W., J.M. Staley y C.S. Millar. 1978. Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. *Transactions of the British Mycological Society* 71: 295-301.
- Minter, D.W. y C.S. Millar. 1980. Ecology and Biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *Pinus sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology* 10: 169-180.
- Morales, V.M., C.A. Jasalavich, L.E. Pelcher, G.A. Petrie y J.L. Taylor. 1995. Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 99(5): 593-603.
- Nelson, G. y N. Platnik. 1981. *Systematics and Biogeography*. *Cladistics and Viacariance*. Columbia University Press, New York.

- O'Connell, R.J. 1987. Absence of a specialized interface between intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and cells of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* **107**: 725-734.
- O'Connell, R.J., J.A. Bailey y D.V. Richmond. 1984. A chloroplast and other organelles of *Phaseolus vulgaris* within a hypha of *Colletotrichum lindemuthianum*. *New Phytologist* **96**: 35-41.
- O'Donnel, K. 1997. Phylogenetic evidence indicates the important mycotoxigenic strains Fn-2, Fn-3, Fn-2B and Fn-M represent a new species of *Fusarium*. *Maikotokishin* **45**: 1-10.
- Patterson, C. 1982. Morphological Characters and homology. En Joysey, K.A. y A.E. Friday (Eds.). *Problems in Phylogenetic Reconstruction*. Academic Press, London. p. 21-74.
- Patterson, C. 1988. Homology in classical and molecular biology. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 603-625.
- Peraza, L.R. 1997. *Algunas consideraciones fisiológicas acerca del efecto que tiene el pH en la regeneración y reversión de células de Aspergillus carentes de pared celular*. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Perry, J.P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Oregon.
- Peterson, S.W. 1998. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and lsu-rDNA nucleotide sequences. En prensa.
- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En Fokkema, N.J. y J. van den Havel (Eds.). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press. Cambridge. p.175-187.
- Petrini, O. 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves. En Andrews, J.H. y S.S. Hirano (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag, N.Y. p. 179-197.
- Petrini, O. y G.C. Carroll. 1981. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany* **59**: 629-636.
- Pirozynski, K. A. y D.W. Malloch. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems* **6**: 153-164.
- Pirozynski, K.A. y D.L. Hawksworth (Eds.). 1988. *Coevolution of Fungi with Plants and Animals*. Academic Press, Londres.
- Plainick, N.I. 1979. Philosophy and the transformation of cladistics. *Systematic Zoology* **26**: 380-385.
- Ramamoorthy, T., P. Bye y A. Lot (Eds.) 1993. *Biological Diversity of Mexico: Origin and Distribution*. Oxford University Press, New York.
- Richards, R.J. 1992. Evolution. En Keller, E.F y E.A. Lloyd. (Eds.) *Keywords in Evolutionary Biology*. Harvard University Press, Cambridge.
- Rieppel, O.C. 1988. *Fundamentals of Comparative Biology*. Basel, Boston, Berlin: Birkhauser Verlag.
- Roth, V.L. 1991. Homology and hierarchies: Problems solved and unresolved. *Journal of Evolutionary Biology* **4**: 167-194.
- Russell, J.R., F. Hosein, E. Johnson, R. Waugh, W. Powell. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Molecular Ecology* **2**(2): 89-87.
- Saghai Maroof, M.A., Q. Zhang y R. Bishasev. 1995. Comparison of Restriction Fragment Length Polymorphism in wild and cultivated barley. *Genome* **38**: 298-306.
- Sanderson, J.M. 1995. Objections to bootstrapping phylogenies: a critique. *Systematic Biology* **44**(3): 229-320.
- Sanderson, M.J. y M.J. Donoghue. 1989. Patterns of variation in levels of homoplasy. *Evolution* **43**: 1781-1795.
- Savile, D.B.O. 1976. Evolution of the rust fungi (Uredinales) as reflected by their ecological problems. En Hecht, M.K., W.C. Steere y B. Wallace. *Evolutionary Biology* vol. 9. Plenum Publishing, New York.
- Scotland, R.W. 1992. Cladistic Theory. En Forey, P.L., C.J. Humphries, I.L. Kitching, R.W. Scotland, D.J. Siebert y D.M. Williams. *Cladistics: A practical course in Systematics*. Oxford University Press, Oxford.
- Selosse, M-A y F. Le Tacon. 1998. The land flora, a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* **13**(1): 15-20.
- Sherwood-Pike, M. 1990. Fossils as keys to evolution in Fungi. *BioSystems* **25**: 121-129.
- Sieber, T.N. 1989. Endophytic Fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research* **92**: 322-326.
- Sieber-Canavesi, F., O. Petrini y T.N. Sieber. 1991. Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba* and *A. balsamea* a cultural, biochemical and numerical study. *Mycologia* **83**: 89-96.
- Sigurgeirsson A. y A. E. Szmidi., 1993. Phylogenetic and biogeographic implications of chloroplast DNA variations in *Picea. Noruegan* *Journal of Botany* **13**: 233-346.

- Smith, D. E. y A.S. Klein. 1994. Phylogenetic inferences on the relationship of North American and European *Picea* species based on nuclear ribosomal 18s sequences and the internal transcribed spacer region. *Molecular Phylogeny and Evolution* 3(1): 17-19.
- Sober, E. 1988. *Reconstructing the Past. Parsimony, Evolution and Inference*. The MIT Press, Cambridge.
- Sober, E. 1992. Parsimony. En: En Keller, E.F y E.A. Lloyd. (Eds.) *Keywords in Evolutionary Biology*. Harvard University Press, Cambridge.
- Sober, E. 1993. *Philosophy of Biology*. Westview Press, San Francisco.
- Staley, J.M. 1975. The taxonomy of *Lophodermium* on pines with special reference to problems in North American christmas tree plantations. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft* 108: 79-85.
- Stone, J.K. 1987. Initiation and development of latent infections by *Rhabdochloa parkeri* on douglas fir. *Canadian Journal of Botany* 65: 2614-2621.
- Stone, J.K., O. Viret, O. Petrini y I.H. Chapela. 1994. Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi. En Petrini, O. y G.B. Ouellette (Eds.) *Host wall alterations by parasitic fungi; Sixth International Congress of Plant Pathology*, Montréal, Québec, Canada. American Phytopathological Society Press, Minnesota.
- Styles, B.T. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican Purview. En Ramamoorthy, T., P. Bye y A. Lot (Eds.) *Biological Diversity of Mexico: Origin and Distribution*. Oxford University Press, New York. p. 397-420.
- Susker J. y G. Acker. 1989. Identification of endophytic hyphae of *Lophodermium piceae* in tissues of green, symptomless Norway spruce needles by immunodetection microscopy. *Canadian Journal of Botany* 67: 1768-1774.
- Swofford, D.L. 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Taylor, T.N. 1990. Fungal Interactions in the Terrestrial Paleoecosystem. *Trends in Ecology and Evolution* 5(1): 21-25.
- Thompson, D.J., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Travanty, E.A., L.M. Buttonow y D.P. Maxwell. 1998. Application of nuclear rDNA sequences for the detection of fungal pathogens of turfgrass. En prensa.
- Vázquez Lobo, Y.A. 1996. *Filogenia de Hongos Endófitos del género Pinus L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Voet, D. y J.G. Voet. 1995. *Biochemistry*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Vogel, H.J. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *American Naturalist* 98:435-446.
- Weston, P.H. 1994. Methods for rooting cladistic trees. En: Scotland, R.W., D.J. Siebert y D.M. Williams. *Models in Phylogeny Reconstruction*. Clarendon Press. Oxford.
- Wheatcroft, R., R. Wilson, J.D. Miller, y N.J. Whitney. 1994. Genetic diversity among natural populations of endophytic *Lophodermium pinastri* from *Pinus resinosa*. *Mycological Research* 98(7): 740-744.
- Williams, D.M. 1992. DNA analysis: Theory. En Forey, P.L., C.J. Humphries, I.L. Kitching, R.W. Scotland, D.J. Siebert y D.M. Williams (Eds.) *Cladistics: A practical course in Systematics*. Oxford University Press, Oxford.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Xu, J., J. Yoell y J. Anderson. 1994. An efficient protocol for isolating DNA from higher fungi. *Trends in Genetics* 10(7): 226-227.
- Zimmer, E.A., S.L. Martin, S.M. Beverly, Y.W. Kan and A.C. Wilson. 1980. Rapid duplications and loss of genes coding for α chains of hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77: 2158-2162.

pF004
 m2-001
 mC-005
 hA-081
 hO-001
 m2-002
 zO-122
 mF-003
 z-002
 cO-001
 eO-015
 Hormonema
 Eupenicillium
 mF-005
 zP-006
 z-027
 zC-013
 z-026
 z-022
 mF-002

pF004
 m2-001
 mC-005
 hA-081
 hO-001
 m2-002
 zO-122
 mF-003
 z-002
 cO-001
 eO-015
 Hormonema
 Eupenicillium
 mF-005
 zP-006
 z-027
 zC-013
 z-026
 z-022
 mF-002

pF004
 m2-001
 mC-005
 hA-081
 hO-001
 m2-002
 zO-122
 mF-003
 z-002
 cO-001
 eO-015
 Hormonema
 Eupenicillium
 mF-005
 zP-006
 z-027
 zC-013
 z-026
 z-022
 mF-002

Morfo	Asc.subcuticular	Asc.Subepidérmico	Asc.Subhipodérmico	Pared basal	labios	Subgénero
gP-004	ausente	ausente	parcial	continua	presentes	duros
mZ-001	ausente	ausente	parcial	discontinua	presentes	duros
mC-005	ausente	parcial	ausente	continua	ausentes	duros
hA-081	ausente	total	ausente	ausente	presentes	duros
hO-001	ausente	ausente	parcial	continua	presentes	duros
mZ-002	ausente	ausente	parcial	continua	ausentes	duros
aO-122	total	ausente	ausente	continua	ausentes	blandos
mP-003	ausente	total	ausente	ausente	ausentes	duros
aZ-002	ausente	parcial	parcial	continua	prsentes y ausentes	blandos
cO-001	ausente	parcial	parcial	continua	ausentes	blandos
cO-015	ausente	parcial	parcial	continua	ausentes	blandos
mP-005	ausente	total	ausente	ausente	ausentes	blandos
aP-006	total	ausente	ausente	continua	ausentes	blandos
aZ-027	total	ausente	ausente	continua	ausentes	blandos
aC-013	total	ausente	ausente	continua	ausentes	blandos
aZ-026	total	ausente	ausente	continua	ausentes	blandos
aZ-022	total	ausente	ausente	continua	ausentes	blandos
mP-002	ausente	total	ausente	ausente	ausentes	duros

II. Datos morfológicos anexados a la matriz de caracteres moleculares, generando una matriz de caracteres combinados (ver matriz de caracteres moleculares).

	A	B	C	CH	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P
L. nitens	1	2	0	1	1	2	0	1	0	1	0	0	0	2	1	2	0	2
L. sp1	1	2	0	1	1	2	0	1	0	1	0	0	0	2	1	2	0	0
L. molitoris	1	2	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	2	1	2	0	2
L. baculiferum	1	2	0	0	1	1	2	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1
L. staleyi	0	2	0	0	2	1	1	0	0	1	0	1	4	0	1	1	1	1
L. pinastri	1	1&2	1	0	2	1&2	1	1	0	1	0	1	3&5	2	1	1	1	1
L. indianum	1	2	0	2	1	1	1	0	1	1	0	1	4	2	0	0	0	0
L. conigeum	0	0	1	0	1	1&2	1	0	0	1	0	1	5	2	1	1	0	1
L. australe	0	2	0	2	0&1&2	1	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	1
L. ravenelli	2	2	0	0	?	?	2	0	0	1	0	1	1	2	1	1	1	3
L. seditiosum	2	1&2	1	1	0	1&2	2	0	0	1	0	1	2&3	2	1	1	0	1
L. pini-excelsae	1&2	2	0	2	1	1&2	1&2	0	0	1	0	1	4	0	1	1	1	1
L. pini pumilae	1	2	0	2	?	1	2	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1
L. orientale	0	2	0	0	?	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. canberrianum	0	1&2	0	1	2	1	2	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0
L. durilabrum	0	2	0	2	2	2	0	0	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0

A. Líneas de zona	D. Habitat	H. Asc. subhipodérmico	L. Color de labios	N. Conidioma
0: ausencia	0: Endófito oportunista	0: ausente	0: ausentes	0: ausente
1: tipo1	1: End. saprobio	1: parcial	1: sin color	1: presente
2: tipo2	2: Parásito	2: central	2: azules	Ñ. F. Conidioma
B. En hojas	E. Subgénero	I. Pared basal	3: verdes	0: ausente
0: ausencia	0: ausencia	0: ausencia	4: grises	1: subepidérmico
1: primaria	1: Diploxilon	1: presencia	5: rojos	2: subcuticular
2: secundaria	2: Haploxilon	J. Abertura sobre línea estomática	6: amarillo	O. Abertura conidioma
C. En apófisis	F. Asc. subepidérmico	0: ausente	M. Tamaño de Asc.	0: ausente
0: ausencia	0: ausente	1: presente	0: pequeño	1: presente
1: presencia	1: parcial	K. Labios	1: mediano	P. Ostiolo de conidioma
CH. Posición de Asc.	2: total	0: ausentes	2: grande	0: ausentes
0: indiferente	G. Asc. subcuticular	1: presentes		1: Centrales
1: adaxial	0: ausente			2: Dispersos
2: abaxial	1: total			3: Sobre la abertura

III. Matriz de caracteres morfológicos de *Lophodermium* en pinos (Minter, 1981) obtenidos a partir de información bibliográfica.

Protocolos

Extracción de nDNA (Vázquez Lobo, 1996)

1. Se liofiliza alrededor de un gramo de tejido en tubos eppendorff por tres o cuatro horas, hasta que el tejido se rompa con sólo agitar el tubo.
2. Moler el tejido liofilizado dentro del tubo hasta reducirlo a polvo.
3. Agregar a cada tubo 600µl a 800µl de buffer de CTAB 1x (1% CTAB, 0.7M NaCl, 50mM Tris Hcl pH 8) y agitar hasta homogeneizar.
4. Incubar en una campana de flujo laminar durante 30 minutos, las tapas de los tubos deben permanecer abiertas.
5. Adicionar a cada tubo 600µl de cloroformo-octanol 24:1 y agitar hasta homogeneizar.
6. Centrifugar a 12000rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo y precipitar el DNA con un volumen igual al recuperado de 2-propanol (Isopropanol) helado.
7. Centrifugar a 9000rpm por cinco minutos. Lavar el pellet (botón) eliminando el sobrenadante y agregando un mililitro de etanol al 70% frío.
8. Centrifugar a 7000rpm durante cinco minutos y eliminar el sobrenadante.
9. Secar el pellet dejando los tubos abiertos en la campana de flujo laminar durante 45 minutos, aproximadamente. Resuspender el pellet con 100-200µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8, 100mM EDTA).

Eliminación de RNA

1. Agregar a cada tubo 2µl de enzima RNasa (10mg/ml) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
2. Para precipitar la enzima: agregar 100µl (1/2 Vf) de acetato de amonio 7.5M frío. Colocar a 4°C por quince minutos con agitaciones ocasionales.
3. Centrifugar a 10,000rpm durante diez minutos y recuperar el sobrenadante.
4. Agregar 2-2 1/2 Vf de etanol 95% para precipitar el DNA. Centrifugar a 8,500rpm por 4 1/2 minutos y eliminar el sobrenadante.
5. Lavar el precipitado con el tubo lleno de etanol al 70% para remover el acetato de amonio. Repetir.
6. Centrifugar a 6000rpm durante 4 minutos y eliminar el alcohol. Secar el DNA con los tubos abiertos a 37°C o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente.
8. Resuspender en 200µl de TE 1x pH 8.

Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa con el paquete comercial QIAGEN (QIAquick)

* Agregar etanol 96-100% al buffer PE antes de usarlo. En la botella se indica el volumen.

Todos los pasos de centrifugación se realizan a 13000rpm, excepto donde se indica.

1. Cortar el gel de agarosa (1.2%) el fragmento de DNA con una navaja o escalpelo limpio. Remover el exceso de agarosa.
2. Pesar el trozo de gel escindido en un tubo sin color. Agregar 3 volúmenes de Buffer QX1 por cada volumen de gel. Cada 100mg de gel corresponden a 100 μ l, aproximadamente.
3. Incubar a 50°C por diez minutos (o hasta que el gel escindido se funda totalmente) con agitaciones cada dos o tres minutos. Se debe solubilizar completamente el gel!
4. Verificar que el color de la mezcla sea amarillo, similar al del buffer QX1. Si el color de la mezcla es anaranjado o violetavolento agregar 10 μ l de solución 3M de acetato de sodio pH5 y mezclar. El color se torna amarillo.
5. Agregar un volumen de gel de isopropanol (2-propanol) a la mezcla y mezcle.
6. Colocar la columna de QIAquick en el tubo colector de 2ml.
7. Para unir el DNA, aplicar la muestra a la columna y la columna en el tubo colector y centrifugar por un minuto. La capacidad máxima de la columna es 800 μ l, si se tienen muestras más copiosas, simplemente se aplica la muestra y se centrifuga cuantas veces sea necesario.
8. Desechar el contenido del tubo colector y colocar de nuevo la columna en él.
9. (Opcional) Añadir 0.5ml de buffer QX1 a la columna (incubar por un minuto) y centrifugar por un minuto.
10. Para lavar el DNA, añadir 0.75ml de buffer PE, incubar de 2 a cinco minutos y centrifugar por un minuto.
11. Desechar el contenido del tubo colector y centrifugar por un minuto.
12. Poner la columna en un tubo nuevo y limpio de 1.5ml.
13. Para disolver el DNA, añadir 50 μ l de 10mM Tris-HCl pH8.5 o agua didestilada estéril al centro de la columna y centrifugar un minuto a máxima velocidad. Se puede incrementar la concentración del DNA obtenido añadiendo 30 μ l más de agua o de Tris, incubando un minuto y centrifugando por otro.
14. Si se usó agua como solvente, es necesario congelar la muestra a -20°C INMEDIATAMENTE.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Reactivos y concentraciones (entre paréntesis) utilizados en cada reacción de amplificación de 100 μ l

1. Agua didestilada estéril, 72.5 μ l;
2. DMSO, 2 μ l (2%);
3. BSA (Suero de albúmina de bovino) 10mg/ml, 2 μ l (0.2mg/ml);
4. Buffer 10X (Tris-HCl pH 8.3 200mM, Kcl 1M, Tween 20 o.10%. y NP-40 0.10%) 5 μ l (1X);
5. Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 2.5mM, 6 μ l (1.5mM);
6. Dinucleótidos trifosfatados (dNTP) 2.5mM, 4 μ l (100 μ M);
7. Oligonucleótidos (*Primers*) 100 μ M, 2 μ l (2 μ M);
8. Templado, 3 μ l y
9. DNA polimerasa (5U/ μ l), 0.5 μ l (2.5U).

Programa empleado para la amplificación

1. Desnaturalización, 94°C por un minuto;
2. Alineación, 55°C por quince segundos;
3. Adición de la DNA polimerasa, 72°C, durante el tiempo necesario para poner la enzima;
4. Treinta y cinco ciclos de amplificación:
 - 4.1. Desnaturalización a 94°C durante diez segundos,
 - 4.2. Alineación 55°C por veinte segundos,
 - 4.3. Extensión a 72°C por un minuto y once segundos;
5. Extensión extra a 72°C por seis minutos y
6. Refrigeración, 10°C indefinidamente.

Protocolo:

Buenos días- dice-. Buenas-le contesta-. (pero piensa en realidad que no sabe cómo conducirse, y no deja de sentir un poco de lástima, claro, con todas sus relativas etapas y precedencias imprescindibles).