



203
29
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**FILOGENIA DE HONGOS ENDOFITOS DEL
GENERO *Pinus* L.: IMPLEMENTACION
DE TECNICAS MOLECULARES Y
RESULTADOS PRELIMINARES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ALEJANDRA VAZQUEZ LOBO YUREN



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**DIRECTORA:
ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROSES**

AGOSTO 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Filogenia de hongos endófitos del género Pinus L.:
implementación de técnicas moleculares y resultados
preliminares"

realizado por

Alejandra Vázquez Lobo Yurén

con número de cuenta 9150626-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Elena Alvarez-Buylla Roces

Propietario Biol. Rosalinda Tapia López

Propietario Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

Suplente Dr. Francisco Javier Espinosa García

Suplente Dr. Luis Medrano Gonzalez

Consejo Departamental de Biología

A mis padres y maestros José Antonio y María Teresa por todo.

A Fernando Vázquez Lobo,

a mis hermanos Tere y Fernando,

con mucho amor a Francisco y

a mis amigas Liliana, Marianna y Viridiana².

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo de la DGAPA (Proyecto # IN212995)

Agradezco a los sinodales que revisaron este trabajo, por su valioso tiempo, su paciencia y sus aportaciones.

Agradezco muy profundamente a Elena por su confianza y por dirigir este trabajo con paciencia y dedicación, por haberme enseñado un amplio panorama de la investigación en biología y por su apoyo y amistad.

A Sol mil gracias, por permitirme participar en un proyecto tan interesante, por tu amistad, por todo lo que aprendimos juntas y por todo lo que me enseñaste.

Agradezco también muy especialmente a Rosalinda, Angeles y Adrián por su gran ayuda, confianza y apoyo durante la implementación de las técnicas dentro y fuera del laboratorio.

A Rodolfo, que con esa pasión por los hongos tantas veces me ayudó y me enseñó.

Gracias a Roberto por interesarse en esta tesis, por sus valiosos comentarios y las buenas intenciones, también por escucharme y por su cariño.

A Toño por las citas que me proporcionó (lo prometido es deuda), pero principalmente por ser tan buen amigo y por su apoyo le doy mil gracias.

Agradezco con todo mi cariño a Francisco por el amor que me ha dado y su apoyo durante la realización de este trabajo.

Agradezco a Lupita y a Patricia, por los cigarros y las pláticas, por su confianza y amistad.

A Pablo por las porras y por levantarme el ánimo.

Agradezco a toda la gente del laboratorio de genética molecular y evolución por hacer el trabajo más agradable : Carlos, Luis, Eneida, Caro, Liz, Victor, Alvaro, Alicia, Soffa, Sergio, Rosaura, León, Horacio, Marco y Ken.

Gracias a mis amigas Daniella, Guille, Dení y Nadia, por los buenos momentos en la carrera, el buceo y las salidas al campo. También por su amistad y compañía.

A Marianna, Liliana, Tere, Jaime, Héctor (en general al pequeño burzito) por interesarse (o por lo menos por aparentar) en mi trabajo y en la biología. Además por darme momentos tan buenos y agradables.

Muchas gracias a Gloria y a Liliana España por todas las veces que me han abierto las puertas de sus casas.

Gracias (no por participar) a Daniel Piñero por las sugerencias para estos agradecimientos.

Índice

Cuadro de abreviaturas	1
Resumen	2
Capítulo I. Introducción	3
1.1 Antecedentes generales y trascendencia del estudio	3
1.2 El estudio de la coevolución	6
1.3 Comparación de filogenias	8
1.3.1 Árboles de consenso	9
1.3.2 Comparación de filogenias por parsimonia	10
1.3.3 Comparación mediante filogenias paralelas	12
1.4 Los hongos endófitos	14
1.5 Objetivos	16
Capítulo II. Optimización e implementación de las técnicas moleculares	17
2.1 Introducción	17
2.2 Extracción de DNA total de pinos	17
2.2.1 Introducción	17
2.2.2 Método	19
2.2.3 Resultados y discusión	22
2.3 Aislamiento de DNA total de hongos de cultivo	24
2.3.1 Introducción	24
2.3.2 Método	25
2.3.3 Resultados y discusión	26
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
2.4.1 Introducción	27
2.4.2 Método	31
2.4.3 Resultados y discusión	33

2.5 Conclusiones	35
Capítulo III. El análisis filogenético	37
3.1 Introducción	37
3.1.1 Secuencias de los espaciadores internos transcritos como marcadores moleculares	38
3.1.2 Alineación de secuencias	40
3.1.3 La inferencia filogenética y el uso de máxima parsimonia	41
3.2 Método	43
3.3 Resultados y discusión	45
Conclusiones generales y perspectivas	50
Literatura citada	52
Apéndice I	57
Apéndice II	59
Apéndice III	61
Apéndice IV	63
Apéndice V	64
Apéndice VI	65

Cuadro de Abreviaturas

BSA	Suero de Albúmina Bovina
cpDNA	DNA de cloroplasto
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Tetracetato de Etilendiamina
ITS	Espaciador Interno Transcrito
nrDNA	DNA ribosomal nuclear
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	Polimerfiemo en la Amplificación al Azar de DNA
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
RNA	Ácido Ribonucleico

RESUMEN

En hojas y tallos del género *Pinus* L. se ha encontrado una gran variedad de hongos endófitos. A pesar de que las comunidades endofíticas son muy diversas en todas las plantas investigadas, existe sólo una o unas cuantas especies fungales dominantes, lo cual sugiere cierta especificidad. La especificidad en los hongos endófitos asociados a los pinos es la base para proponer tendencias coevolutivas entre los hongos endófitos y los pinos. La búsqueda de patrones de especificidad y coevolución en este sistema en un contexto macroevolutivo requiere la reconstrucción filogenética de ambos grupos, en este caso con el uso de un marcador molecular, para lo cual se montaron técnicas para: (a) extracción de DNA total de pinos y hongos cultivados en medio líquido y (b) amplificación del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal nuclear (nrDNA) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la concentración del DNA, obtenido a partir de un protocolo de rápido aislamiento ("MINI-PREP"), son óptimas para su utilización posterior en la amplificación del ITS. Se obtuvieron 22 secuencias fungales de ITS a partir de DNA total de pino y 2 secuencias fungales a partir de DNA total de hongos de cultivo. Con dichas secuencias y el uso del programa PAUP se reconstruyeron tres cladogramas para inferir las relaciones filogenéticas de los hongos endófitos. Sobre dos filogenias inferidas se mapearon los dos subgéneros de *Pinus* y las subsecciones del subgénero *Haploxylon*, respectivamente. Los mapeos muestran evidencia de patrones de especificidad entre hongos endófitos y grupos de pinos.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales y trascendencia del estudio

Esta tesis forma parte del proyecto "Filogenia molecular y especificidad de hongos endófitos en el género *Pinus* L." en el cual se pone a prueba la hipótesis acerca de la especificidad y la existencia de patrones coevolutivos entre los hongos endófitos y los pinos, para lo cual, se ha decidido utilizar marcadores moleculares y métodos analíticos de inferencia filogenética. La prueba de la hipótesis requiere de la identificación de endófitos especialistas, su localización en tejidos vegetales y el análisis de las relaciones filogenéticas entre los hongos y los pinos. Esta tesis se enfoca por un lado, en implementar y optimizar las técnicas moleculares de extracción y amplificación de DNA y por otro lado, en proporcionar resultados preliminares para definir las relaciones filogenéticas entre los hongos endófitos y sus relaciones evolutivas con sus hospederos del género *Pinus*.

Recientemente, en el Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Centro de Ecología de la UNAM, se encontró que secuencias de DNA ribosomal (rDNA) publicadas por Smith y Klein (1994), que se pensaba pertenecían a especies de *Picea* sp. y a una especie del género *Pinus*, en realidad corresponden a secuencias de hongos ascomicetos filamentosos (Liston, Klein y Alvarez-Buylla, en rev., Fig. 1). Esta conclusión sugirió que las secuencias fungales provienen de hongos endófitos que se encontraban en las hojas utilizadas para la extracción de DNA. Además, las relaciones filogenéticas inferidas a partir de dichas secuencias coinciden con las relaciones filogenéticas de *Picea* reportadas por Sigurgeirsson y Szmidt (1993) inferidas a partir del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de DNA de cloroplasto (cpDNA; Fig. 2), lo cual sugiere que existe una alta especificidad entre los hongos endófitos y las especies de coníferas, por lo que se puede suponer que ambos grupos (los hongos endófitos y los hospederos del género *Picea*) coevolucionaron.

Las relaciones simbióticas entre organismos vivos constituyen sistemas útiles para estudiar dinámicas de coadaptación, coespeciación y coevolución entre especies de Phyla muy lejanos y con niveles de complejidad celular muy contrastantes. Además, las relaciones simbióticas han dado lugar, posiblemente, a procesos evolutivos trascendentales en la historia de la vida en la tierra, tales como el origen endosimbiótico de las células eucariotes.

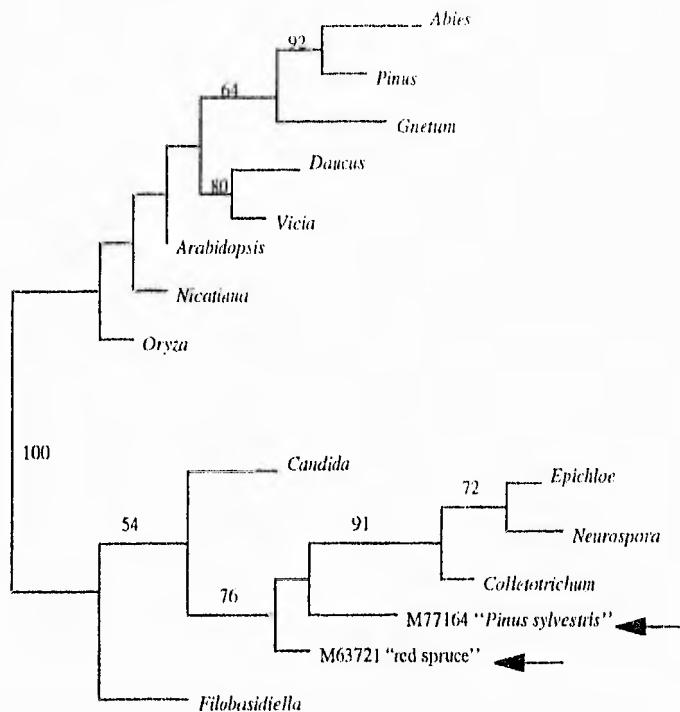
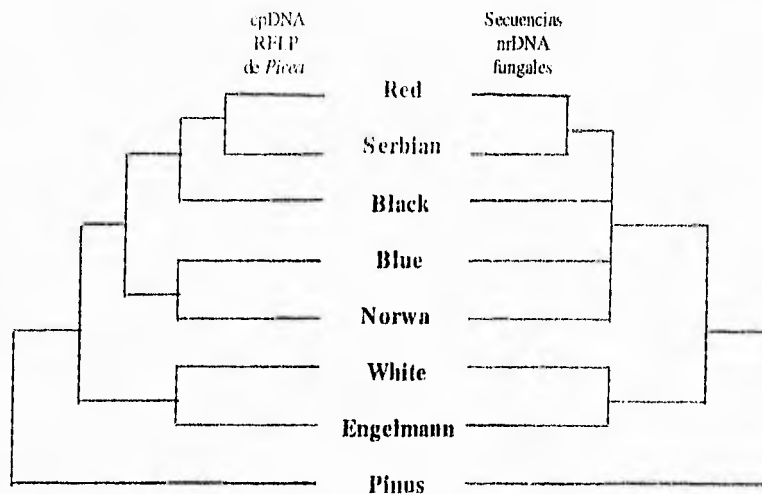


Figura 1. Relaciones filogenéticas de dos secuencias reportadas por Smith y Klein (1994).

En el cladograma se observa que las secuencias reportadas como DNA ribosomal de *Pinus* y de *Picea* se agrupan con secuencias fungales, con base en una reconstrucción filogenética hecha con el programa PAUP por parsimonia. Tomado de Alvarez-buylla y Francisco Espinosa, 1995.

La mayoría de las especies fungales son simbiontes obligados o mutualistas asociadas a plantas (Pirozynski y Hawksworth, 1988). En la interacción con las plantas, los hongos invaden células o tejidos, conformando un amplio rango de asociaciones parasíticas y mutualistas, en las que se incluyen a los hongos formadores de micorrizas, los hongos endófitos, epífitos y patógenos de plantas (Barrett, 1983). El estudio de los hongos en general tiene una importancia intrínseca debido a que son los principales degradadores en los ecosistemas terrestres y se encuentran ampliamente relacionados con las plantas vasculares como parásitos o mutualistas. Además, algunas especies han sido ampliamente utilizadas como sistemas genéticos para el análisis molecular y son utilizados industrialmente para la fermentación (Bruns *et al.*, 1991).



Sigurgeirsson & Szmidt (1993)

Figura 2. Comparación de los cladogramas inferidos a partir de la información dada por los RFLP's de cpDNA de *Picea* y de las secuencias de rDNA de hongos respectivamente.

El primero elaborado por Sigurgeirsson y Szmidt (1993) y el segundo elaborado por Smith y Klein (1994). Al centro se encuentran los nombres comunes de las piceas y el pino utilizados para el análisis. Se puede observar que existe congruencia entre los cladogramas, exceptuando a las piceas Black, Blue y Norway, que en el cladograma de secuencias fungales se encuentran como una politomía y en el opuesto como ramas bien definidas. Tomado de Alvarez-buylla y Francisco Espinosa, 1995.

Existe evidencia de que las asociaciones entre plantas y hongos endófitos son de naturaleza mutualista. En ocasiones, los hongos pueden incluso defender a sus plantas hospederas contra la herbivoría y contra la infección de otras especies de hongos patógenos (Carroll, 1988; Clay, 1988). Por lo tanto, los hongos endófitos podrían utilizarse potencialmente en el control biológico de plagas. También existe un interés particular en el estudio de los hongos endófitos debido a su potencial intrínseco para usarse, mediante la ingeniería genética, como vectores de genes de resistencia y de otros genes en especies de plantas con importancia económica (Wood, 1990). En estos términos, existen tres aplicaciones básicas del uso de endófitos transformados: (1) la interferencia contra genes fungales patógenos mediante la tecnología de RNA antisentido, (2) la elevación de la expresión de genes fungales benéficos para la planta y (3) la introducción de nuevas capacidades genéticas, para la

expresión de proteínas, enzimas y metabolitos secundarios asociados con la resistencia a insectos y enfermedades, la tolerancia a herbicidas y el incremento del crecimiento (Siegel y Schardl, 1991).

En México, el 15% del territorio está ocupado por bosques de coníferas, de los cuales el 90% corresponden a bosques de *Pinus* L. (Rzedowski, 1986). De los pinos se obtienen dos clases de productos: los primarios son la madera, la trementina (resina) y las semillas. Los secundarios (o indirectos) son el carbón, el aguarrás, la brea, el ácido piroleñoso, el alquitrán y el alcohol metílico (Martínez, 1992). El país cuenta de manera natural con especies del género *Pinus* desde regiones tropicales hasta de alta montaña, incluyendo las extensas áreas semiáridas. En esta amplia gama de climas y suelos existe una elevada diversidad de especies. En México se encuentran entre 49 (Styles, 1993) y 55 especies de pinos (34 de ellas, endémicas; Perry, 1991), constituyendo cerca del 50% del total de las especies en todo el mundo.

México es, por lo tanto, uno de los principales bancos de germoplasma de pinos a nivel mundial. Dicho germoplasma puede ser útil para el mejoramiento y establecimiento de plantaciones de especies de pinos adaptadas a diversas condiciones ambientales (Sáenz, 1991).

1.2 El estudio de la Coevolución

El término Coevolución fue usado por Ehrlich y Raven (1964) para describir las adaptaciones recíprocas entre plantas y mariposas, desde entonces el uso de éste término ha tenido gran variedad de interpretaciones, pero en general se refieren todas al cambio evolutivo recíproco en especies interactuantes (Thompson, 1994). Es importante restringir los eventos biológicos a los cuales se puede aplicar la definición de coevolución, ya que existe el peligro de que dicho término sea usado en un sentido aún mas general, sin ninguna restricción. Por ejemplo, cuando es interpretado como la adaptación de las especies a las características del ambiente biótico (características que pueden permanecer constantes por largos periodos). En este sentido, las adaptaciones a características constantes del ambiente biótico no difieren de la adaptación a características del ambiente abiótico. Así, cuando el término se usa tan ampliamente, la coevolución puede ser equivalente a la evolución (Futuyma y Slatkin, 1983). Slatkin (1983) define la coevolución incluyendo la restricción histórica de la relación de las especies interactuantes: "es la evolución de dos o más especies como consecuencia de sus interacciones". Futuyma y Slatkin (1983) dan una definición que asegura que las especies que se encuentran al final del proceso coevolutivo sean descendientes directas de aquellas especies en las que comenzó la interacción: "en una o mas especies ecológicamente interactuantes, existe una respuesta adaptativa al cambio genético de la otra". Thompson (1989) señala que la utilidad e importancia del concepto de la coevolución es la idea de que las interacciones entre las

especies pueden coordinarse parcialmente durante el tiempo evolutivo sin mezclar sus pozas génicas. Thompson sugiere que existen cinco tipos de coevolución: (1) coevolución gen a gen (presencia de loci complementarios para virulencia y resistencia en ambas especies), la cual puede darse en interacciones entre patógenos y plantas y en algunos otros parásitos y hospederos. (2) La coevolución específica tiene lugar en especies con presiones de selección recíprocas y se puede ejemplificar en especies en competencia que divergen en cierto carácter. (3) La coevolución difusa es el cambio recíproco entre grupos de especies y no entre un par de especies; en este caso el autor señala que este tipo de coevolución puede estar presente en todas las interacciones. (4) En la coevolución diversificadora están incluidos los simbioses heredados maternalmente y sus hospederos, los simbioses que regulan los movimientos de los gametos de los hospederos y los polinizadores parásitos de semillas y plantas hospederas. Este tipo de evolución recíproca se lleva a cabo entre especies en las cuales la interacción causa que una de las especies sea subdividida en dos o más poblaciones reproductivamente aisladas. Por último, (5) la coevolución de escape y radiación que involucra eventos de adaptación y especiación se puede dar en las interacciones de parásito-hospedero y en las interacciones de insecto-planta.

Thompson delimita los tipos de coevolución principalmente por las consecuencias de las interacciones en las especies involucradas, pero no toma en cuenta las condiciones ecológicas requeridas para que la coevolución ocurra. Craig *et al.* (1988) mencionan cinco factores para que la coevolución se lleve a cabo: (1) las especies que participan en la interacción tienen el potencial mutuo para reducir la sobrevivencia del individuo o el éxito reproductivo, (2) debe existir una alta especificidad, de manera que los caracteres implicados sean resultado de la interacción con una sola especie, (3) la interacción debe abarcar una amplia proporción de las poblaciones, (4) la interacción debe ser predecible en frecuencia y en intensidad y (5) la coevolución debe ser la fuerza selectiva dominante para que sus efectos no se pierdan por la acción de otras fuerzas selectivas. Los requisitos planteados por Craig *et al.* excluyen la posibilidad de la existencia de coevolución difusa, ya que en el punto 2 se plantea que debe existir una alta especificidad, mientras que Thompson plantea que la coevolución difusa puede ocurrir entre grupos de especies. El principal problema para cualquier interacción particular es demostrar que ambas especies han evolucionado en respuesta a la interacción, ya que en muchos casos se puede confundir la coevolución con la evolución paralela de dos especies. Por un lado, las adaptaciones resultantes de la coevolución deben distinguirse de otras adaptaciones y ser divergentes filogenéticamente de las especies cercanas (Craig *et al.*, 1988) y por otro lado, se debe demostrar que la interacción afecta la dinámica poblacional y las proporciones génicas de una o ambas especies.

Otra manera de buscar evidencias de que las especies interactuantes influyen la evolución de cada una es mediante la sistemática, encontrando alguna relación temporal de eventos evolutivos (cambios de caracteres o divergencias) entre linajes asociados. Pero el encontrar estos eventos no implica necesariamente coevolución, ya que dos grupos de organismos pueden compartir patrones temporales de especiación o tasas de cambios de carácter similares, porque comparten eventos históricos y de aislamiento geográfico (Mitter *et al.*, 1983). Por lo enunciado anteriormente, es necesario hacer una distinción entre los caracteres que se encuentran implicados en la asociación de las especies (intrínsecos) y los que no están implicados (extrínsecos). Por ejemplo, en el sistema planta-endófito los caracteres intrínsecos que porta el endófito son aquellos que están implicados en los mecanismos de reconocimiento del hospedero; los caracteres extrínsecos son aquellos que comparten con todos los demás miembros de su grupo, incluyendo a las especies que no son endófitas, como la morfología filamentosa o la reproducción por esporas. Tomando esto en cuenta se distinguen dos tipos de patrones históricos en las asociaciones: la filogenia de las especies de cada uno de los grupos asociados y los cambios de cada uno de los caracteres implicados en la asociación de cada uno de los grupos asociados (Ronquist y Nylin, 1990).

Existen dos enfoques al estudio de la coevolución: análisis de los procesos microevolutivos y análisis de los procesos macroevolutivos. La mayoría de los análisis realizados se concentran más en los procesos microevolutivos y en general en las adaptaciones que pueden ser resultado de la coevolución, que en los procesos macroevolutivos. El acercamiento microevolutivo se enfoca a la naturaleza de las interacciones (tiempo ecológico), mientras que el macroevolutivo estudia la evolución de linajes ecológicamente asociados (tiempo evolutivo; Brooks, 1988). Para Brooks (1988), el proceso de coevolución a un nivel microevolutivo puede definirse como el grado de mutua modificación, es decir la coacomodación (sincronía de los ciclos de vida); mientras que a un nivel macroevolutivo es el grado de mutua asociación o co-especiación (cladogénensis). En este trabajo se presenta un análisis con un enfoque macroevolutivo, con resultados preliminares, para explorar la posibilidad de que la asociación histórica de los pinos con sus endófitos exhiba patrones de coespeciación.

1.3 Comparación de filogenias

El estudio de la coevolución a un nivel macroevolutivo requiere de la comparación de las filogenias inferidas de los grupos que coevolucionaron hipotéticamente. Para llevar al cabo dicha comparación se han desarrollado principalmente tres métodos: (1) comparación por árboles de consenso, (2) comparación de árboles por parsimonia y (3) filogenias paralelas.

Algunas comparaciones de cladogramas en los estudios filogenéticos de coevolución no incorporan adecuadamente las dinámicas genéticas de la coevolución o la distribución geográfica de las poblaciones (Thompson, 1994). Los cladogramas usados en la comparación deben inferirse a partir de caracteres que son independientes de la relación, es decir, caracteres extrínsecos. Los métodos de comparación de filogenias han sido elaborados con base en análisis biogeográficos y de relaciones de parásito-hospedero. El marco teórico en que han sido desarrollados estos métodos permite su aplicación a relaciones de endófitos con sus hospederos debido a que se basan en la especificidad de las asociaciones y en la influencia mutua de las especies interactuantes.

1.3.1 Comparación de filogenias mediante árboles de consenso

El método de comparación por árboles de consenso elaborado por Adams (1972). Se desarrolló originalmente para la comparación de árboles filogenéticos que muestran diferentes topologías para los mismos taxa. El árbol de consenso, muestra únicamente la información compartida por los árboles comparados e ignora los desacuerdos. Del mismo modo, el árbol de

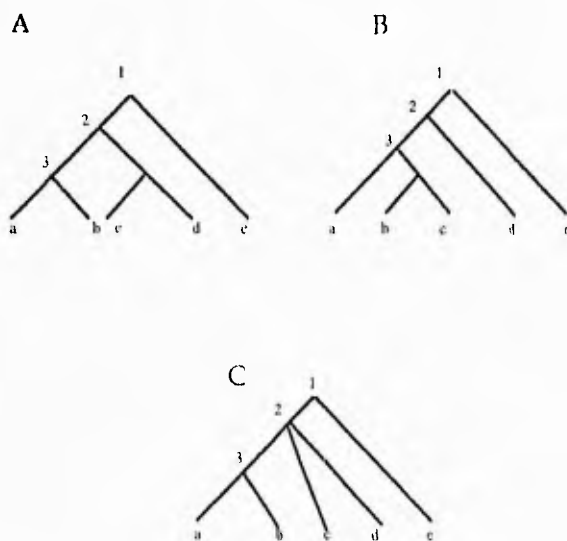


Figura 3. Comparación por árboles de consenso.

El cladograma A representa la filogenia de los hospederos y el cladograma B la de los parásitos. El árbol de consenso C, muestra los puntos de congruencia entre los dos árboles. Debido a la incongruencia entre los dos cladogramas para el LUB 2, en el árbol de consenso C, se genera una politomía.

consenso para dos taxa a comparar muestra únicamente los puntos de congruencia entre los dos árboles. Para lo cual forma conjuntos de taxa terminales mediante la búsqueda del ancestro superior inmediato para el conjunto. Este ancestro inmediato se denomina LUB (Least Upper Bound). Se marcan en ambos árboles los LUB en los que hay conflicto y se resuelve el consenso para cada LUB (Figura 3).

Existen dos limitaciones importantes de este método, ya que no explica las incongruencias de los árboles y algunas porciones que sí son congruentes no las muestra. El ejemplo más claro para éste último caso se observa cuando dos especies distintas de parásitos se encuentran en el mismo hospedero, o cuando dos especies distintas de hospedero comparten la misma especie de parásito (Brooks, 1988).

1.3.2 Comparación de filogenias por parsimonia

La comparación de árboles por parsimonia es un método desarrollado por Brooks (1981); retomando la idea de Hennig (1966) de que los parásitos y sus filogenias pueden actuar como caracteres y series de transformación, respectivamente, de sus hospederos. Brooks incluye también la elaboración del cladograma del parásito por separado, para poder comparar ambos cladogramas: el del parásito contra el del hospedero o viceversa mediante un mapeo (Figura 4). Brooks justifica el uso del método de Hennig afirmando que el uso de la filogenia del parásito como estimador independiente de la filogenia del hospedero tiene los mismos riesgos que el uso de cualquier caracter para estimar cualquier filogenia. Mediante este método se puede distinguir la homología coevolutiva (asociación por descendencia) de la homoplasia coevolutiva (asociación por colonización).

La principal ventaja del uso de este método es que puede explicar los cambios de hospedero por el parásito gracias a que se basa en el uso de parsimonia de Wagner (Brooks, 1981). La parsimonia de Wagner al igual que la de Fitch, son los tipos más sencillos de parsimonia (Hillis y Moritz, 1990), ambos permiten la reversibilidad de caracteres, aunque la de Fitch mucho más libremente ya que permite los cambios de estado de caracter sin ningún orden. La parsimonia de Wagner, requiere la elaboración de series de transformación. Por ejemplo en la serie de transformación $X \leftrightarrow Y \leftrightarrow Z$, donde X, Y y Z son estados de caracter; X puede cambiar a Y y viceversa, Y puede cambiar hacia Z y viceversa, pero para cualquier cambio de X a Z o de Z a X, debe haber un paso intermedio: Y.

Brooks y McLennan (1991) toman en cuenta, e incluyen en su análisis, dos explicaciones macroevolutivas para las relaciones parásito-hospedero: (1) asociación por descendencia: donde el ancestro del parásito se encontraba asociado al ancestro del hospedero y (2) asociación por colonización: el parásito evoluciona en asociación con una especie de

hospedero y subsecuentemente coloniza a otras especies de hospederos emparentados con la primera.

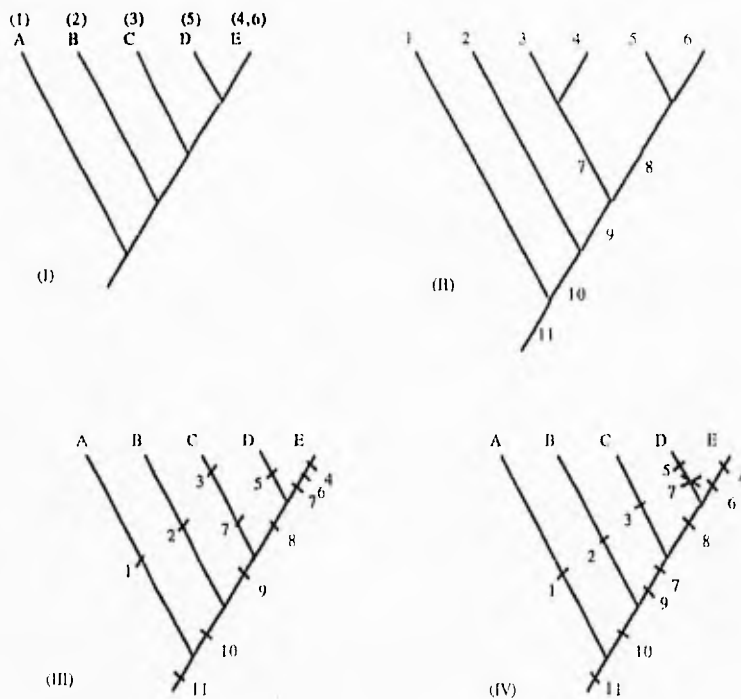


Figura 4. Comparación de filogenias por parsimonia.

Filogenia del hospedero con los parásitos (números) sobre sus respectivos hospederos (I), filogenia de los parásitos (II) y dos mapeos de hospederos igualmente parsimoniosos. En uno se propone un cambio de hospedero (III) y en otro un evento de extinción del parásito (IV) marcado con una cruz. Ambos involucran al parásito codificado con el 7. Tomado de Brooks (1991).

Debido a que en este método los parásitos se usan como caracteres de los hospederos (o viceversa), se deben usar criterios para distinguir las homólogas (los parásitos covarían con la filogenia) de las homoplasias (los parásitos se encuentran por convergencia y evolución paralela). Para ello se usa el método de Hennig que: (1) asume homología siempre que sea

posible, (2) hace uso del grupo externo para distinguir los caracteres generales de las especies, (3) agrupa de acuerdo con los caracteres homólogos especiales, (4) los caracteres (en este caso los parásitos) inconsistentes se interpretan después como homoplasias. Brooks se refiere a los caracteres generales (plesiomorfias) como aquellos que no pueden usarse en la reconstrucción de una filogenia, ya que no sirven para distinguir grupos pequeños y los distingue de los caracteres homólogos especiales (sinapomorfias), los cuales si dan evidencia de las relaciones filogenéticas.

Aunque este método requiere una considerable interpretación *a posteriori* (Page, 1994b), permite elaborar un amplio panorama referente a las relaciones históricas entre parásitos y hospederos, además de que pueden usarse medidas cuantitativas de ajuste como el índice de consistencia (CI; Brooks *et al.*, 1986). Durante la reconstrucción filogenética por parsimonia, se pueden producir múltiples árboles del mismo largo cuando existen caracteres homoplásicos. Este índice permite medir el número de cambios de caracteres en un árbol, pero no permite discriminar entre árboles del mismo largo.

El CI se calcula como el número de caracteres en el conjunto de datos dividido entre el número de cambios evolutivos, o número total de caracteres en el árbol (el largo del árbol; Brooks y McLennan, 1991). Este índice toma valores 0 y 1 (Li y Graur, 1991). Cuando el valor es igual a uno, indica que hay un perfecto ajuste del árbol con los datos. El CI no toma en cuenta la distribución de caracteres en un árbol o en el conjunto de caracteres.

1.3.3 Comparación mediante filogenias paralelas

El método desarrollado por Page (1990) reconcilia los cladogramas de parásitos con los cladogramas de sus hospederos, para lo cual requiere componentes extras, como la información del tiempo de los eventos de cladogénesis. Ya que generalmente se carece de éste tipo de información, Page (1994b) propone un algoritmo para la reconstrucción de las relaciones históricas entre los parásitos y sus hospederos. Los gráficos resultantes de éste análisis representan explícitamente la historia de las relaciones e incluyen eventos como el cambio de hospedero, la extinción y la colonización (Figura 5).

El algoritmo se basa en un criterio de elección de las reconstrucciones posibles de la evolución parásito-hospedero. Aquellas reconstrucciones que maximizan el número de eventos de especiación en la filogenia del parásito que pueden ser atribuidos a coespeciación con sus hospederos, son preferidas sobre aquellas reconstrucciones que postulan unos cuantos eventos de coespeciación (Page, 1994a). Con este propósito, se construye un cladograma del hospedero sobre el cual se mapea el cladograma del parásito asociado; en el árbol reconciliado resultante, a cada uno de los nodos correspondientes a un parásito, se asignan las distribuciones de los hospederos ocupados por dicho asociado. De este modo, los nodos

terminales representan la distribución de los hospederos encontrada actualmente y los nodos internos las distribuciones de sus ancestros.

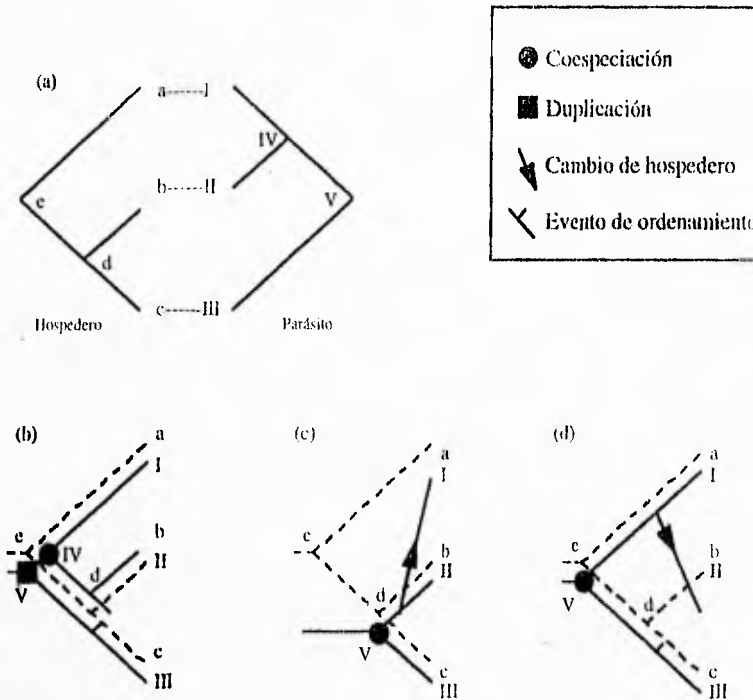


Figura 5. Comparación por filogenias paralelas.

(a) árboles incongruentes del parásito y del hospedero, (b) el árbol reconciliatorio y (c y d) dos alternativas de árboles reconciliatorios con un único cambio de hospedero. Cada reconstrucción postula diferentes combinaciones de coespeciación, especiación independiente del parásito (duplicación), cambios de hospedero y eventos de ordenamiento (ausencia del parásito donde podría producirse). En el árbol (b) se observa que el parásito IV coespeció con el hospedero e, de aquí que los parásitos I y II se encuentran asociados con sus hospederos por descendencia. Tomado de Page (1994b).

De los tres métodos descritos anteriormente el que posee mayor poder de resolución es el elaborado por Page (1994b), pero debido a la complejidad del algoritmo usado no puede hacerse un seguimiento con lápiz y papel sino que requiere un programa de computación, TREE MAP y COMPONENT (Page, 1994b). En este trabajo no se pretende elaborar una

comparación formal de las filogenias de los hongos endófitos y sus hospederos, los pinos, pues aún no se cuenta con las filogenias completas de los pinos y sus endófitos. En este trabajo se presenta un análisis preliminar, con base en el método de parsimonia para la comparación de filogenias.

1.4 Los hongos endófitos

Petrini (1992) define a un hongo endófito como aquel que habita en órganos vegetales en alguna parte de su ciclo de vida y puede colonizar tejidos internos sin causar daño aparente. Dichos hongos tienen básicamente tres mecanismos de infección: (1) tejidos aéreos infectados por esporas aéreas (transmisión horizontal), (2) infección transmitida desde la planta madre hacia la semilla (transmisión vertical) y (3) la transmisión llevada a cabo por insectos que inoculan el endófito en la planta (transmisión horizontal).

Pirozynski *et al.* (1988) afirman que debido a que los hongos endófitos generalmente se encuentran íntimamente ligados a su sustrato es lógico pensar que un proceso coevolutivo rige las relaciones entre las plantas y sus hongos endófitos. En las relaciones endófito-hospedero existen caracteres que pueden ser resultado de la coevolución: la planta hospedera no reacciona contra sus endófitos y los hongos endófitos disminuyen la palatabilidad hacia insectos herbívoros y actúan como antagonistas de organismos patógenos de hojas (Carroll, 1988).

Un claro ejemplo de la acción de los endófitos contra patógenos se puede encontrar en especies del género *Lophodermium*. Se ha observado que *L. seditiosum* es un patógeno de árboles jóvenes que causa la caída prematura de acículas de pinos. Otra especie, *L. conigenum*, fructifica únicamente después de que las acículas han muerto, debido a la vejez o a cualquier otra causa, por lo tanto se le considera un verdadero endófito. El patógeno coloniza y fructifica únicamente cuando *L. conigenum* está ausente, cuando está presente el patógeno es excluido de dicho microhábitat (Carroll, 1988).

A pesar de que las comunidades endofíticas son muy diversas en todas las plantas investigadas, existe sólo una o unas cuantas especies fungales dominantes. Uno de los géneros más reportados como endófito de coníferas en general y en particular de los pinos es *Lophodermium* (Minter, 1979; Minter y Millar, 1980; Wilson *et al.*, 1994; Hata y Futai., 1995).

La condición para que un hongo endófito se encuentre en tejidos vegetales, es por un lado, que la planta hospedera no reaccione de la misma manera en que reacciona en contra de hongos patógenos, lo cual puede ser el resultado de un complejo de reconocimiento hongo-hospedero que permite al endófito penetrar en los tejidos del hospedero sin activar las barreras

de defensa, usualmente activadas en la presencia de patógenos. Por otro lado, el endófito podría activar los mecanismos de defensa y tolerarlos. Los pinos presentan mecanismos de defensa relativamente complejos en comparación con otras coníferas, ya que están dotados con conductos resiníferos con un alto nivel de desarrollo anatómico; cuando uno de estos conductos presenta una ruptura por un patógeno, las resinas preformadas inundan el sitio de infección formando una barrera contra la desecación y los patógenos (Lewinsohn *et al.*, 1991). Por lo tanto, la presencia de un hongo endófito como *Lophodermium* puede ser el resultado de una serie de eventos históricos, que implican por un lado la evasión, por parte del hongo, de mecanismos de defensa tan drásticos como los presentes en los pinos y por otro lado la aceptación, por parte de la planta hospedera, de la presencia del endófito y finalmente el desarrollo de mecanismos de reconocimiento. Estos mecanismos de reconocimiento implican una cercana coevolución entre los endófitos y sus hospederos (Petrini, 1992). Por lo anterior y debido a la constante presencia de *Lophodermium* como endófito mutualista en distintas especies de pinos y en otras especies de coníferas en áreas geográficas distantes (Minter y Millar, 1980), dicho género se puede postular como un importante candidato a mostrar un patrón de coespeciación con sus hospederos los pinos.

Debido a que algunos endófitos aparentemente inocuos pueden causar síntomas patogénicos cuando el hospedero se encuentra en condiciones desfavorables y a la evidencia de que los endófitos estudiados se encuentran taxonómicamente relacionados con conocidos herbívoros o antagonistas patógenos, se sugiere que los endófitos (mutualistas) han evolucionado directamente de hongos patógenos de plantas. De ser cierta esta hipótesis, es posible que las toxinas contra animales herbívoros y contra otros patógenos han evolucionado a partir de las toxinas contra plantas (Carroll, 1988). Petrini (1992) postula una hipótesis acerca de la evolución de la relación endófito-hospedero, proponiendo que de una relación antagonista patógeno-hospedero hubo una transición hacia una relación neutral entre el hongo y la planta hasta la relación mutualista endófito-hospedero.

Carroll (1988) postula que la evolución de la relación mutualista entre los endófitos y las plantas está relacionada con los tiempos generacionales de las especies interactuantes. Por un lado, durante el tiempo de vida de un árbol su genotipo se encuentra fijo y por tanto con una mínima variación en sus mecanismos de defensa. Por otro lado, los insectos herbívoros y otros patógenos que pueden desarrollar múltiples generaciones en un tiempo relativamente corto, pueden especializarse y superar las defensas de un solo individuo hospedero. Por lo tanto, la presencia de los endófitos con un ciclo de vida corto, brinda heterogeneidad de defensas a las plantas de ciclos de vida largos, sobre todo por parte de hongos que producen un amplio repertorio de micotoxinas.

1.5 OBJETIVOS

Objetivos generales:

Optimizar e implementar técnicas de biología molecular para la extracción de DNA total y amplificación del espaciador interno transcrito (ITS) de DNA ribosomal nuclear (nrDNA) de hongos endófitos de pinos.

Evaluar la variación en secuencias del ITS para hongos endófitos y realizar inferencias preliminares de sus relaciones filogenéticas, así como un análisis preliminar de las relaciones evolutivas de estos y sus especies hospederas de pinos.

Objetivos particulares:

Optimizar el protocolo de extracción de DNA total de acículas estériles de pinos.

Montar los protocolos de extracción de DNA de hongos endófitos cultivados en medio líquido.

Montar el protocolo para la amplificación del ITS de hongos endófitos a partir del DNA total de pinos y del DNA total de hongos endófitos aislados y cultivados en medio líquido.

Analizar la variación de las secuencias de los ITS de los hongos.

Reconstruir con el uso del criterio de parsimonia, la filogenia de los endófitos utilizando el ITS como marcador.

Analizar las relaciones de especificidad entre los hongos endófitos con especies de pinos hospederos usando como marco de referencia la taxonomía del género *Pinus* y la filogenia obtenida con el ITS para el mismo.

CAPÍTULO II

OPTIMIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

2.1 Introducción

Para realizar la inferencia filogenética de los hongos endófitos de pinos, se utilizó como marcador molecular al espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal (rDNA), por lo que fue necesario montar y optimizar las técnicas necesarias para amplificar el ITS de tal manera que fuera posible su secuenciación.

Para la obtención de secuencias del ITS de los hongos endófitos de pinos, se siguieron dos estrategias. Por un lado, se extrajo DNA total de acículas estériles de pinos y a partir de este sustrato, con oligonucleótidos específicos para hongos, se amplificó el ITS de los endófitos, que se distingue del ITS de los pinos por su tamaño. Por otro lado, los endófitos fueron aislados en un medio de cultivo rico con agar y cultivados posteriormente en medio líquido; los micelios obtenidos de estos cultivos se utilizaron para la extracción de DNA total de hongos endófitos. EL DNA obtenido se utilizó como templado para la amplificación del ITS con los mismos oligonucleótidos.

Para llevar a cabo las dos estrategias se requería el montaje y la optimización de las técnicas de extracción de DNA total de acículas de pinos y de DNA total de hongos cultivados en medio líquido. Además, se requería montar el protocolo para la amplificación de los ITS de los endófitos, a partir de los dos distintos sustratos.

2.2 Extracción de DNA total de pinos

2.2.1 Introducción

El uso de la genética molecular para el análisis evolutivo y taxonómico dentro de las poblaciones y entre especies, requiere principalmente de un método de extracción de DNA que permita obtener un alto número de muestras de buena calidad (sin degradación y de alta concentración) a un bajo costo y en tiempos cortos. En plantas, el aislamiento de DNA se dificulta debido a la presencia de polisacáridos y taninos; además de la pared celular que impide la salida de los componentes celulares y debe romperse por medios mecánicos. Para esto, se han elaborado protocolos que permiten la eliminación de compuestos secundarios y aseguran que el DNA obtenido pueda usarse como templado para la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction; RAPD, secuenciación, PCR-RFLP, etc.), en análisis de RFLP's tradicionales y para técnicas de DNA recombinante.

Para el proyecto "Filogenias moleculares y especificidad de hongos endófitos del género *Pinus*.", se requería un protocolo de aislamiento de DNA que permitiera extraer DNA de un amplio número de muestras en poco tiempo, con concentraciones y características que permitieran la amplificación del ITS por medio de la PCR. La PCR puede ser sensible a diversos factores como las concentraciones de los oligonucleótidos y del sustrato, así como a impurezas en las preparaciones de DNA (Whitkus *et al.*, 1994). Es por esto que uno de los objetivos de esta tesis fue desarrollar un protocolo para el aislamiento de DNA que redujera el número de pasos y la cantidad de tejido requeridos para la extracción. El método original desarrollado por Murray y Thompson (1980), que se basa en el uso de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se ha usado ampliamente, pero ha sido modificado debido a sus requerimientos de gradientes de Cloruro de Cesio y cantidades relativamente grandes de tejido. El método usado originalmente para la extracción de DNA de acículas de pinos, consistió en un protocolo modificando basado en el uso de CTAB desarrollado por Doyle y Doyle (1987), el cual requiere de muchos pasos y requiere 10 gramos de tejido.

La mayoría de los protocolos de rápido aislamiento incluyen el uso de morteros y nitrógeno líquido para pulverizar el tejido rompiendo paredes celulares, pero este mecanismo no es siempre efectivo, principalmente en algunas plantas que presentan paredes celulares gruesas en las hojas, como es el caso de las gimnospermas. Es por esto que en general los protocolos de aislamiento de DNA en gimnospermas requieren de numerosos pasos que permitan la extracción, además de una gran cantidad de tejido, lo cual implica un mayor uso de reactivos y una reducción del número de muestras obtenidas en un tiempo determinado.

Durante la extracción, uno de los principales problemas es el de la degradación del DNA que tiene tres causas principales: la presencia de desoxirribonucleasas (DNAsas), compuestos secundarios (*v. gr.* quinonas y taninos) y la degradación mecánica. Se debe tomar en cuenta también, que la calidad del DNA, muchas veces se ve afectada por el origen del material y el almacenamiento de las muestras. Además, durante la extracción, es posible que suceda un co-aislamiento de polisacáridos que impiden la actividad de endonucleasas de restricción (Milligan, 1992). Por lo tanto, cualquier protocolo para la extracción de DNA requiere de un método y del uso de reactivos que eliminen los factores de degradación.

Los pasos generales en cualquier protocolo de extracción de DNA total en plantas son: (1) rompimiento de paredes celulares, (2) detención de la actividad enzimática desoxirribonucleasa, (3) aislamiento del DNA de los demás compuestos celulares y (4) purificación del DNA.

Durante esta parte del trabajo, el objetivo fue optimizar la extracción del DNA y la implementación de un protocolo ("mini-prep") con el uso de menos tejido vegetal y menos pasos. Una vez implementado y optimizado el protocolo de extracción los resultados se compararon con los obtenidos a partir del protocolo usado anteriormente y al cual denominamos "maxi-prep".

2.2.2 Método

MUESTRAS

Las colectas de acículas de pinos se realizaron en el Pinetum "Maximino Martínez" del Centro de Genética Forestal A. C. de la Universidad Autónoma de Chapingo, Edo. de México. Dicho Pinetum cuenta con árboles de 60 especies y variedades de pinos mexicanos con edades mínimas de 10 años. Se colectaron aproximadamente 10 granos de acículas de un año de edad de cada especie y de las variedades. Las acículas se guardaron en bolsas de plástico con cierre hermético en hieleras, posteriormente se esterilizaron para evitar la presencia de hongos epífitos y se empaquetaron completamente secas en papel aluminio. La temperatura de almacenaje varió dependiendo del tiempo que permanecieron guardadas las muestras antes de la extracción. Para evitar la degradación de DNA durante el almacenaje de las acículas de pinos, se deben guardar secas a bajas temperaturas, para evitar las actividades de enzimas degradativas por lo cual es recomendable mantener las muestras a -70°C cuando deberán permanecer más de dos semanas antes de usarse para la extracción de DNA.

BUFFER DE EXTRACCIÓN

Para evitar la degradación y el co-aislamiento de polisacáridos, durante la extracción, debe usarse un buffer de extracción adecuado para el sistema y un protocolo determinado. Para la extracción de DNA a partir de acículas de pinos se usó un buffer ampliamente utilizado cuyo principal elemento es el CTAB, el cual es un detergente catiónico, que solubiliza membranas y forma un complejo con los ácidos nucleicos (Milligan, 1992), facilitando su separación de los demás componentes celulares. El buffer de extracción requiere un pH adecuado para evitar la actividad de enzimas degradativas de DNA cuyo pH óptimo es alrededor de 7 (Milligan, 1992). Por lo tanto, es recomendado un pH de 7.8 a 8.5. El pH del buffer utilizado en este método es de 8. Para mantener este pH estable, se usa una solución TRIS-HCl pH 8 (Tris[1hidroximetil] aminometano) y Cloruro de Sodio (NaCl). Otro componente importante del buffer es el Tetracetato de Etilendiamina (EDTA), cuya función principal es la de inhibir enzimas dependientes de metales, ya que quelata cationes divalentes como Mg^{++} y Ca^{++} . Finalmente, el 2-

Mercapto Etanol (2-ME) se utiliza como agente reductor contra quinonas, disulfuros, peroxidasas y polifenoles.

Durante el montaje de esta técnica se probó el uso de otro detergente, el N-Lauroil-Sarcosil, que es menos sensible al frío y tiende menos a la cristalización, pero su naturaleza aniónica impide la formación de un complejo con los ácidos nucleicos (Rickwood y Patel, 1995). Se observó que el uso de este detergente no es tan efectivo como el CTAB, ya que las muestras obtenidas mediante su uso tienen bajas concentraciones.

En algunos protocolos se recomienda el uso de BSA (suero de albúmina bovina) que causa degradación superficial de enzimas degradativas (Price, 1983) y PVP (Polivinilpirrolidona) que disminuye el efecto de compuestos secundarios como quinonas y taninos. Para mantener el BSA en un buffer de extracción se requiere refrigeración, lo cual puede originar la precipitación del CTAB, por lo cual es recomendable no utilizarlo. Además, se observó que su uso, al igual que el PVP, no incrementan las concentraciones finales ni disminuyen la degradación. Todas las concentraciones de los componentes se encuentran presentadas en los resultados.

PROTOCOLO

El primer paso de la extracción consiste en el rompimiento de paredes celulares mediante el uso del nitrógeno líquido. Para esto se usa un mortero, en el que se muele aproximadamente un gramo de acículas junto con el nitrógeno, hasta que quedan pulverizadas. Una punta de espátula (≈ 0.2 g) del tejido en polvo resultante es depositada en otro mortero junto con el buffer de extracción y se homogeneiza la muestra. En estos dos pasos se consigue el rompimiento de paredes y membranas celulares, además de que comienza la acción de inhibición enzimática por el EDTA y el CTAB. Durante la implementación, este fue un paso crítico, ya que no basta moler el tejido con el nitrógeno líquido para que el CTAB inicie su actividad dentro de la célula, sino que también fue necesario implementar el paso descrito anteriormente en el cual se muele el tejido junto con el buffer.

A continuación se centrifugó la muestra (los tiempos y velocidades utilizadas en las centrifugaciones se especifican más adelante) para eliminar el buffer usado eliminando el sobrenadante para poder usar un buffer nuevo para la incubación y la formación del complejo ácido nucleico-CTAB. Hasta este punto, se recomienda realizar todos los pasos en frío, manteniendo las muestras en hielo y usando una centrifuga refrigerada (4°C). Después de éste punto no es recomendable mantener las muestras en hielo para evitar la precipitación del complejo DNA-CTAB (Taylor, 1993), pero las centrifugaciones siguen realizandose en frío preferentemente. Entonces, se resuspende el pellet con buffer CTAB 2X y se incuba a 60°C,

durante diez minutos. El tiempo y la temperatura de incubación varía en distintos protocolos, dependiendo del tipo de tejido, por lo cual para la implementación de este método se hicieron varias pruebas de temperatura y tiempo para encontrar la combinación óptima, en la que no hubiera degradación de DNA y el CTAB se uniera a los ácidos nucleicos.

En este punto el DNA puede separarse de los demás componentes celulares. Con este fin se utiliza una solución de cloroformo/octanol. En algunos protocolos el octanol es sustituido por alcohol isoamílico, por lo cual se probaron ambos y se observó que su uso puede ser indistinto, ya que no se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos. Mediante una centrifugación y la solución de cloroformo/octanol, se pueden separar tres fases, la inferior contiene la mayoría de las paredes celulares, membranas, proteínas desnaturalizadas y la mayoría de los polisacáridos (Milligan, 1992), la fase intermedia es más sólida y contiene los restos de tejidos. En la fase acuosa superior se encuentran los ácidos nucleicos, que se deben recuperar para purificarse. Con este fin, se traslada la fase acuosa superior y se le añade isopropanol frío para precipitar ácidos nucleicos. En este punto se deja reposar a -20°C de 30 minutos a 12 horas, tomando en cuenta que a tiempos más largos existe un incremento en la precipitación de ácidos nucleicos. Después de una centrifugación se forma un precipitado de DNA y puede eliminarse el sobrenadante; para asegurar la limpieza del DNA se pueden hacer lavados mediante el uso de etanol al 70%. El etanol se desecha y los restos pueden evaporarse dejando los tubos abiertos de preferencia en una cámara de flujo laminar (para evitar contaminaciones) o utilizando un liofilizador.

El DNA se resuspende y se disuelve en un buffer compuesto por Tris-HCl pH8 10 mM y EDTA 1mM (TE 1X). En este estado el DNA puede usarse para análisis de PCR, pero se debe tomar en cuenta que debido a la naturaleza de los ácidos nucleicos, difícilmente se aísla DNA sin co-aíslar RNA. La presencia de RNA puede interferir en la PCR y por ésto es recomendable eliminarlo por medio de una enzima ribonucleasa, lo cual implica un tratamiento más largo y un protocolo particular (Apéndice I). Es importante que dicha enzima este libre de actividad desoxirribonucleasa, para evitar que se degrade el DNA. Este protocolo requiere además la eliminación de la enzima, ya que ésta también puede interferir en el análisis y en el uso posterior del DNA. La eliminación del RNA tiene dos inconvenientes principales, el primero por el uso de acetato de amonio durante la precipitación de proteínas, que también interfiere en la amplificación mediante la PCR. El segundo consiste en la disminución de la concentración del DNA.

Para estimar la concentración del DNA obtenido mediante ambos métodos se utilizó un espectrofotómetro, que proporciona valores directos de la concentración en $\mu\text{g/ml}$ calculando la absorbancia del DNA a 260 nm. Además, mediante la observación de los geles de agarosa, se

puede realizar una estimación cualitativa de la concentración y degradación del DNA, ya que si se observa una banda intensa en comparación con el marcador y sin barridos se puede suponer que se trata de DNA de buena calidad (figura 6). Los geles de agarosa son teñidos con bromuro de etidio 10mg/ml.

2.2.3 Resultados y discusión

Antes de implementar la técnica de "mini-prep", utilizábamos un método de extracción modificado de Doyle y Doyle (1987), que requiere 10 gramos de acículas de pinos. Este se lleva a cabo en 17 pasos (sin incluir la limpieza del precipitado para la eliminación de restos de los buffers) y requiere del uso de centrifugas refrigeradas con rotores con capacidad para tubos de 50ml en los cuales caben generalmente de 4 a 8 tubos, mientras que en las microcentrifugas requeridas para el "mini-prep", caben hasta 24 tubos de 1.5 a 2 ml. Debido a la cantidad de tejido requerida para el protocolo anterior, el tiempo invertido en obtener un polvo fino es mucho mayor, y en general cada uno de los pasos se lleva mucho mas tiempo y cantidad de reactivos. Podría calcularse que una persona trabajando sola puede obtener hasta 48 muestras de DNA en un día con el uso del "mini-prep", mientras que con el protocolo "maxi-prep" se podían obtener hasta 12. Por los volúmenes utilizados para la extracción mediante el "mini-prep", el requerimiento de reactivos es mucho menor lo cual implica una disminución de costos.



Figura 6. Extracción de DNA total de acículas de pinos mediante el protocolo "mini-prep". Electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Muestras de DNA total de acículas de pinos obtenidas mediante el mini-prep. 5µl de muestra por carril.

A continuación, se muestra el protocolo de extracción de DNA de acículas de pinos ("mini-prep"). El protocolo usado anteriormente se encuentra en el apéndice I, junto con el protocolo de eliminación de RNA

"MINI-PREP"

- 1- Moler en un mortero $\approx$ 1 gramo de tejido con nitrógeno líquido
- 2- Moler en un micromortero el equivalente a punta de espátula de tejido pulverizado ($\approx$ 0.2 g) junto con 1 ml de buffer de CTAB 2X (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%)
- 3- Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos a 4°C
- 4- Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de buffer CTAB 2X. Incubar en un baño a 60°C durante 10 minutos
- 5- Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 minutos a 4°C (10 a 15 minutos, hasta que el sobrenadante quede transparente)
- 6- Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 μ l) y precipitar el DNA con 2/3 del volumen final (500 μ l aprox.) de isopropanol frío. Dejar reposar de 30 minutos a 12 horas a -20°C
- 7- Centrifugar a 9000 rpm durante cinco minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante
- 8- El pellet puede limpiarse agregando 1 ml de etanol 70% frío y centrifugando a 7000 rpm durante 5 minutos a 4°C
- 9- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM)

Durante la optimización de la extracción de DNA a partir de acículas de pinos los puntos críticos fueron el rompimiento de paredes celulares y la formación del complejo DNA-CTAB para el aislamiento del DNA. Para obtener buenas concentraciones de DNA se debe procurar obtener un polvo muy fino durante la trituración con nitrógeno líquido, así como evitar la descongelación para evitar la degradación de las muestras.

Con el protocolo "mini-prep" implementado se han extraído más de 240 muestras de DNA. Se tomaron 30 de ellas para medir concentraciones y analizar estadísticamente las diferencias de las distribuciones de frecuencia con 30 muestras obtenidas mediante el antiguo protocolo.

Para calcular las diferencias en la dispersión de los datos entre los dos métodos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Zar, 1974). Mediante dicha prueba se determinó que no existe diferencia significativa entre los dos grupos de datos: la muestra de concentraciones obtenidas mediante el "maxi-prep" y las obtenidas mediante el "mini-prep" ($t=1.3897$; $g.l.= \infty$; $p>0.05$). Además, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para

probar si las diferencias de las distribuciones de frecuencias de concentraciones son diferentes para las muestras de los dos métodos (Figura 7). Los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre los dos conjuntos de datos ($D=0.233$; $n=30$; $p>0.05$).

Con el protocolo "maxi-prep" se pueden obtener algunas muestras de DNA altamente concentradas, aunque las gráficas y las pruebas estadísticas muestran que no existe una diferencia significativa. Tomando en cuenta que con el uso del "mini-prep" se pueden obtener más muestras en un tiempo más corto, esta diferencia es compensada, ya que durante una extracción pueden realizarse réplicas y obtenerse más muestras.

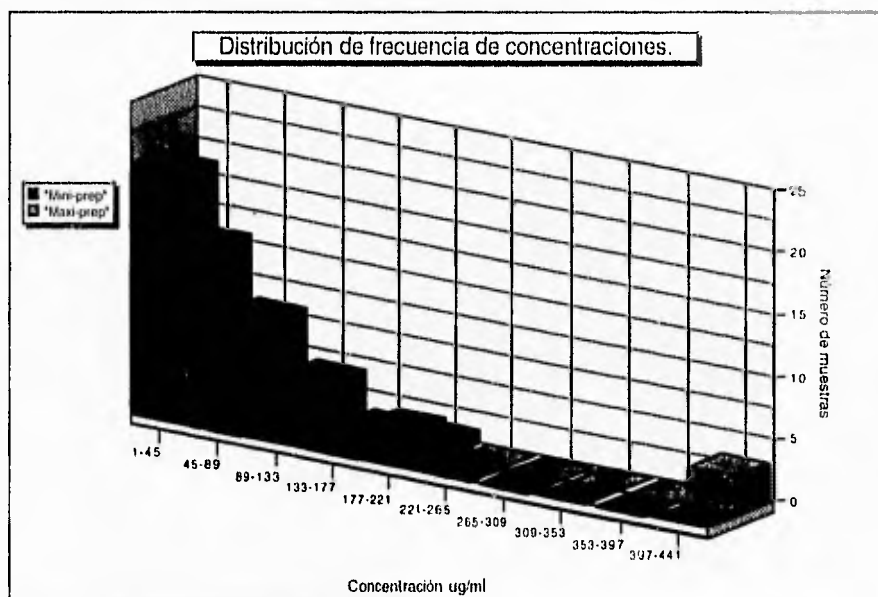


Figura 7. Distribución de frecuencias de las concentraciones obtenidas en 30 muestras de DNA mediante los dos protocolos de extracción utilizados.

2.3 Aislamiento de DNA total de hongos de cultivo

2.3.1 Introducción

Otro acercamiento para el análisis molecular de hongos endófitos de pinos es mediante el cultivo y la extracción de DNA total de hongos endófitos en cultivo. El protocolo implementado se basó en el desarrollado por Xu *et al.* (1994) el cual tiene básicamente los mismos componentes y pasos que el mencionado anteriormente para la extracción de DNA total de plantas, ya que se basa también en el uso de CTAB. La principal diferencia radica en el

método para la ruptura de paredes celulares que en este caso es a partir de la liofilización de tejidos. La ruptura de paredes celulares es importante para permitir la salida y el aislamiento del DNA. Para esto, se requiere inocular esporas en medio líquido para obtener micelio en cantidades suficientes y para desprenderlo por completo. El liofilizador elimina toda el agua del micelio mediante bajas temperaturas, un solvente y vacío, permitiendo la ruptura de paredes celulares mecánicamente con la ayuda de una espátula.

Para esta parte del análisis es importante el cultivo y el aislamiento de los hongos, ya que se deben evitar las contaminaciones para impedir la extracción de DNA de las especies que se encuentren en el mismo cultivo.

2.3.2 Método

El método utilizado para el cultivo y el aislamiento de hongos endófitos de acículas de pinos consiste básicamente en la esterilización superficial de las acículas mediante lavados con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio al 4 %. Después, las acículas se cortan en segmentos de 1 cm aproximadamente y 10 de los segmentos se colocan en cajas de Petri con medios de agar enriquecidos (Apéndice II). Cuando los hongos se desarrollan y crecen en el agar, pueden aislarse individualmente, por especies, en distintas cajas (Figura 8). Cuando se obtiene un micelio de una sola especie, se aísla para crecerlo en medio líquido. Una vez que el micelio se desarrolla en el se deposita en tubos eppendorf de 1.5 ml a 2 ml y congelada en nitrógeno líquido; una vez congelado, el micelio se liofiliza por aproximadamente cuatro horas. El tiempo varía dependiendo de la cantidad de muestra para cada tubo, ya que cuando se tiene poca muestra el tejido puede llegar a resecarse y compactarse en exceso.

Una vez liofilizado el tejido, la extracción puede llevarse a cabo. El protocolo de Xu *et al.* (1994) se siguió con una única modificación en el primer paso, en el cual se agrega el buffer de extracción. El protocolo original sugiere que se agregue el buffer directamente en el micelio liofilizado y con la ayuda de una espátula se haga homogénea la muestra. Durante la implementación de esta técnica, se probó que la concentración del DNA aislado aumentaba finalmente si el micelio seco se pulveriza antes de agregar el buffer, lo cual puede hacerse de igual manera con la ayuda de una espátula delgada. El buffer contiene los mismos reactivos utilizados en la extracción de DNA de pinos, pero en distintas concentraciones, como se muestra más adelante.

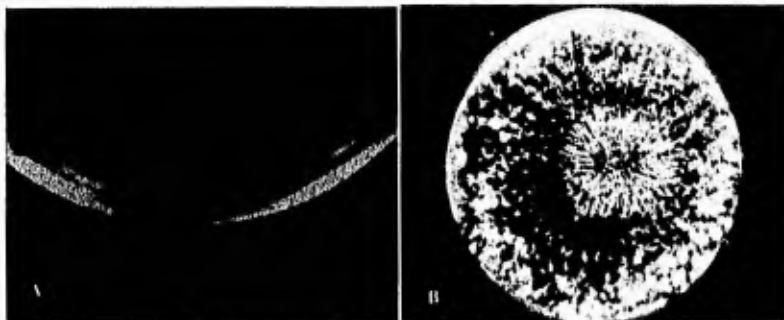


Figura 8. Aislamiento y cultivo de hongos endófitos de pinos.

Foto A: se observan los segmentos de aculeas en el medio de cultivo (1) y el micelio de un hongo endófito creciendo a partir de un segmento (2). Foto B: micelio aislado de un hongo endófito y crecido en un medio enriquecido. Fotos de Rodolfo Salas.

Para la formación del complejo DNA-CTAB, no se requiere del uso de temperaturas elevadas, ya que este proceso se puede llevar al cabo a una temperatura ambiente con buenos resultados. Una vez formado el complejo, se pueden separar las fases mediante la centrifugación. La fase inferior es acuosa y contiene paredes celulares, proteínas, polisacáridos y restos membranales, la fase intermedia está compuesta por los restos del micelio y la superior contiene los ácidos nucleicos.

2.3.3 Resultados y discusión

El método para la extracción de DNA total a partir de hongos endófitos cultivados en medio líquido implementado es el siguiente:

- 1- Desprender el micelio completo del medio líquido y eliminar el exceso de agua, para congelar y liofilizar el tejido en tubos eppendorf de 1.5 ml o de 2 ml durante cuatro horas
- 2- Moler el tejido liofilizado dentro del tubo con una espátula, hasta obtener un polvo fino
- 3- Agregar a cada tubo 600 μ l a 800 μ l de buffer de CTAB 1X (CTAB 1%, NaCl 0.7 M, Tris HCl 50 mM pH 8) y agitar hasta homogeneizar
- 4- Incubar los tubos a temperatura ambiente (con las tapas abiertas) durante 30 minutos dentro de una campana de flujo laminar
- 5- Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo-octanol 24:1 (un volumen igual) y agitar hasta homogeneizar
- 6- Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C.

- 7- Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo y precipitar el DNA con un volumen igual de 2-propanol frío.
- 8- Centrifugar a 9 000 rpm durante 5 minutos y lavar el pellet eliminando el sobrenadante y agregando 1ml de etanol al 70 % frío
- 9- Centrifugar a 7 000 rpm durante cinco minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante.
- 10- Secar el pellet dejando los tubos abiertos en la cámara de flujo laminar durante 45 minutos aproximadamente. Resuspender el pellet con 200 µl TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA)

Debido a que los micelios se aíslan y se utilizan para la extracción durante su crecimiento, existe una alta actividad metabólica y por lo tanto se co-aíslan altas concentraciones de RNA, por lo cual es recomendable eliminar el RNA mediante el método mencionado anteriormente (ver apéndice I).

Con este protocolo se han extraído 25 muestras de DNA total con concentraciones adecuadas para su utilización en la PCR. Este método requiere muy poco tiempo para su realización, a excepción del tiempo requerido para la liofilización, por lo cual puede ser recomendable liofilizar muchas muestras al mismo tiempo y mantener los tejidos secos en tubos eppendorf cerrados a una temperatura de -20°C, hasta que se lleve al cabo la extracción.

2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.4.1 Introducción

Una vez aislado el DNA, el siguiente paso consiste en la amplificación de la región a analizar para la inferencia filogenética, mediante la PCR. El método utilizado para la amplificación de la región depende principalmente de su tamaño y del número de copias encontradas dentro del genoma. Para el análisis de los hongos endófitos, en este trabajo es necesaria la amplificación del ITS del rDNA a partir del DNA total de acículas de pinos y de hongos cultivados, por lo tanto se requiere un protocolo específico para su amplificación a partir de cualquiera de las muestras de DNA.

La PCR es una técnica desarrollada por Kary B. Mullis (1983), cuya principal ventaja es la de permitir generar millones de copias de una región del DNA a partir de una sola molécula, y se basa en la actividad de síntesis de la DNA polimerasa y las temperaturas de desnaturalización y de alineación del DNA. Las primeras aplicaciones de la técnica fueron en diagnósticos prenatales (Saiki *et al.*, 1985). Posteriormente, la PCR comenzó a utilizarse como una herramienta de estudio genético y en técnicas de DNA recombinante, así como en el área de

la biología evolutiva como una herramienta para la amplificación de fragmentos usados como marcadores moleculares. A diferencia de otras técnicas de clonación, esta técnica permite separar la región de interés del resto del DNA genómico, requiere poco tiempo, pocos reactivos y una cantidad muy pequeña de DNA para iniciar la reacción.

Los requerimientos para la actividad de síntesis de la DNA polimerasa son los siguientes: (1) templado, que consiste en una cadena única de ácido desoxiribonucleico, (2) oligonucleótidos o "primers", que son cadenas cortas únicas de DNA complementarias a los extremos 3' de la secuencia blanco y sirven como señal para la iniciación de la actividad de síntesis, (3) magnesio (Mg^{++}), para la actividad de la enzima y (4) deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP), para la formación de las nuevas cadenas sintetizadas.

La PCR consiste en la repetición de un ciclo de tres temperaturas: (1) temperatura de desnaturalización, (2) temperatura de alineación de los oligonucleótidos y (3) temperatura de extensión. Se usa una temperatura de desnaturalización que separa las dos cadenas de DNA, generando dos cadenas únicas. Mediante la temperatura de alineación, dos oligonucleótidos se unen respectivamente en los extremos 3' de ambas cadenas únicas. A continuación, durante la temperatura de extensión, la DNA polimerasa sintetiza las copias a partir de los "primers" hacia los extremos 5'. Debido a que no existe señal de alto, las dos hebras recién sintetizadas tienen distinto largo, dependiendo de la duración de la temperatura de extensión y de la velocidad de incorporación de nucleótidos por parte de la enzima. Las dos dobles cadenas resultantes son sometidas nuevamente a una temperatura de desnaturalización, se permite nuevamente la alineación de los oligonucleótidos y la actividad de síntesis de la polimerasa. En este caso las secuencias recién amplificadas tienen el tamaño justo de la región blanco, ya que la síntesis comienza justo en el sitio de unión del "primer" y termina hasta el final del templado, que es justo la región donde comenzó la síntesis en el primer ciclo (Griffiths *et al.*, 1993). Así el proceso puede repetirse indefinidamente (hasta que se acaban los nucleótidos o los "primers"), hasta obtener un alto número de copias de la secuencia blanco del tamaño justo delimitado por los oligonucleótidos.

La temperatura de desnaturalización varía dependiendo de la proporción de pares de bases. Una región rica en G-C, requiere de una temperatura de desnaturalización alta, pues este par de bases es más estable ya que se encuentra unido por un triple enlace hidrógeno; una región rica en A-T requiere de una temperatura más baja de desnaturalización, pues este par de bases se encuentra unido sólo por un doble enlace hidrógeno y por lo tanto es más inestable. La temperatura de desnaturalización se encuentra generalmente entre los 85°C y los 95°C (Lewin, 1994).

Debido al uso de temperaturas tan altas se usa una polimerasa termoestable, extraída originalmente de una bacteria termófila: *Thermus aquaticus*. Por este origen se denomina a la

enzima *Taq* DNA polimerasa. Actualmente esta enzima se sintetiza en laboratorios y se extrae de otras bacterias termoeestables.

Los principales problemas que se pueden encontrar durante la implementación del protocolo para la amplificación son: (1) no existe la amplificación, (2) el producto se encuentra a muy bajas concentraciones, (3) presencia de amplificaciones inespecíficas y formación de dímeros de los oligonucleótidos.

Taq DNA POLIMERASA

La concentración de enzima usada durante la reacción es uno de los principales factores que pueden originar amplificaciones inespecíficas, formación de dímeros o bajas concentraciones de amplificación. En general se recomienda usar de 1 a 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa por reacción (Innis y Gelfand, 1990). Se define a una unidad de enzima *Taq* DNA polimerasa como aquella que convierte 10 nanomoles de dNTP en ácido insoluble en 30 minutos a 74°C.

A bajas concentraciones de enzima es posible obtener bajos rendimientos en los resultados, pero cuando las unidades por reacción superan las 3 unidades de enzima, se incrementa la inespecificidad y la formación de dímeros (Innis y Gelfand, 1990).

NUCLEÓTIDOS

Las concentraciones recomendadas para el uso de dNTP's varían entre 20 y 200 μ M dependiendo del largo de la secuencia a amplificar, de la efectividad y velocidad de síntesis de la enzima y de la calidad de los dNTP's, así como del número de ciclos programados para la amplificación. Las bajas concentraciones producen un bajo rendimiento, mientras que las altas concentraciones aumentan la probabilidad de amplificaciones inespecíficas y la formación de dímeros de los oligonucleótidos.

La mezcla de dNTP debe contener igual concentración de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dTAP, dCTP y dGTP), para disminuir las posibilidades de incorporaciones equívocas.

MAGNESIO

En la reacción, el Mg^{++} se encuentra en forma de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Por un lado, la concentración del catión en la reacción es crucial, debido a que la enzima es dependiente de Mg^{++} , por lo tanto su eficiencia varía dependiendo de las concentraciones a las que éste se encuentre. Cuando se encuentra muy concentrado afecta la alineación de los oligonucleótidos y la temperatura de disociación del DNA y del producto, por lo que las concentraciones recomendadas oscilan entre 0.5 y 2.5mM (Saiki, 1989).

Se debe tomar en cuenta también la presencia EDTA en los buffer utilizados ya que, como se mencionó anteriormente, es un potente quelante catiónico, y si se le encuentra muy concentrado puede inhibir la actividad polimerizadora capturando Mg^{++} .

BUFFER DE REACCIÓN

Las sustancias contenidas y sus concentraciones en las soluciones de reacción varían dependiendo del laboratorio que produce la enzima. El buffer se encuentra generalmente en un pH alrededor de 8 y contiene Tris-HCl y cloruro de potasio. La enzima se encuentra en un buffer que contiene glicerol para permitir mantenerla a bajas temperaturas sin que se congele y se cristalice, además contiene EDTA y Tris-HCl pH8.

OTROS

Las reacciones de amplificación pueden complementarse con la adición de compuestos desnaturalizadores y estabilizadores. El dimetil sulfoxido (DMSO) y la formamida se usan para evitar la formación de estructuras secundarias en el DNA de cadena única y para facilitar la desnaturalización de la doble cadena y son usados sobre todo cuando el fragmento a amplificar es grande (Landre *et al.*, 1995). También pueden usarse estabilizadores como BSA, que en muchos casos favorecen el resultado final evitando la degradación de DNA.

El volumen final de la reacción también es crítico ya que, dependiendo de éste, varía el tiempo en el que se alcanzan las temperaturas (Innis y Gelfand, 1990) y no en todos los termocicladores se puede hacer este ajuste.

PROGRAMA

Otro punto crítico durante la amplificación es la elección de temperaturas y tiempos de amplificación, debido a que se debe encontrar las temperaturas y duración óptimas para los tres pasos principales de la PCR (desnaturalización, alineación y extensión).

Desnaturalización. La temperatura de desnaturalización varía dependiendo de la composición de pares de bases de la región blanco, que recae generalmente entre los 85°C y los 95°C. En general se usan temperaturas por arriba de los 90°C, por lo cual el tiempo de desnaturalización debe ser corto (entre 5 y 15 segundos por ciclo) para evitar amplificaciones inespecíficas. Aunque se ha reportado que el tiempo de vida medio de la enzima es de 45 a 96 minutos a 95°C y de 9 minutos a 97.5°C (Landre *et al.* 1995), es recomendable no dejar largos tiempos arriba de los 90°C, para evitar la inactivación de la enzima.

Alineación. La temperatura y el tiempo de alineación dependen de la naturaleza de los oligonucleótidos y de la región a amplificar. En general se usan temperaturas entre los 40 y 60°C (Saiki, 1989). Para hacer una amplificación más específica se requieren temperaturas mas

cercanas a los 60°C y tiempos cortos (10 a 15 segundos). Pero, al hacer este tipo de restricciones se corre el riesgo de eliminar la amplificación, ya que en este punto las altas temperaturas podrían impedir la unión de los oligonucleótidos a los extremos de la secuencia blanco.

Extensión. Las temperaturas de extensión recomendadas son entre 70 y 75°C y varían de acuerdo al largo del segmento que se quiere amplificar. En condiciones óptimas una molécula de enzima incorpora 150 nucleótidos por segundo (Gelfand, 1989). Aunque ésta velocidad puede variar en la presencia de DMSO y glicerol (Landre *et al.*, 1995), por lo cual se deben hacer ajustes de tiempo para permitir que la enzima sintetice todo el segmento. Tiempos amplios de extensión favorecen amplificaciones inespecíficas.

2.4.2 Método

Para montar el protocolo de amplificación del ITS de hongos a partir de DNA total extraído a partir de acúsculas de pinos y de hongos endófitos cultivados se hicieron pruebas de temperaturas y tiempos así como una curva de concentración de Mg^{++} para encontrar las concentraciones óptimas de reactivos para la reacción.

Tabla 1. Reactivos y concentraciones utilizadas en cada reacción de 100µl para la amplificación del ITS de hongos endófitos de pinos.

Reactivos	Volumen por tubo	Concentración final
ddH ₂ O estéril	72.5µl	--
DMSO	2µl	2 %
BSA 10mg/ml	2µl	0.2mg/ml
Buffer 20 X (Tris-HCl pH 8.3 200 mM, KCl 1 M, Tween 20 0.10 %, y NP-40 0.10 %)	5µl	1X (Tris-HCl 10 mM, KCl 0.05 M, Tween 20 0.005% y NP-40 0.005%)
MgCl ₂ 25mM	6µl	1.5 mM
dNTP 2.5mM	4µl	100 µM
Oligonucleótidos 100µM	2µl	2 µM
Templado	3µl	--
DNA polimerasa (5U/µl)	0.5µl	2.5 unidades

En la tabla 1 se enlistan las concentraciones usadas para cada reacción de 100µl con reactivos obtenidos de un paquete de amplificación de REPLITHERM (Epicentre Technologies Corporation, Madison, Wisconsin). También se usaron DMSO como desnaturalizador y BSA como estabilizador.

Los reactivos se agregaron en el tubo de reacción en el mismo orden que se presenta en la tabla 1, la preparación de la reacción se realizó en frío. El programa para la amplificación del ITS de hongos consiste en un periodo de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, un periodo de 15 segundos para la alineación de los "primers" a 55°C. A continuación un periodo de tiempo variable (dependiendo del número de tubos) a 72°C para depositar 0.5µl de enzima (2.5 U) en cada tubo de reacción. Una vez agregada la enzima comienzan 35 ciclos de tres temperaturas de PCR, que consisten en una temperatura de desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, un periodo de 20 segundos para la alineación de los oligonucleótidos a 55°C y un tiempo de extensión de 1 minuto 11 segundos a 72°C. Al terminar los 35 ciclos se realiza una última extensión a 72°C durante 6 minutos para terminar la síntesis de los productos inconclusos (Figura 9).

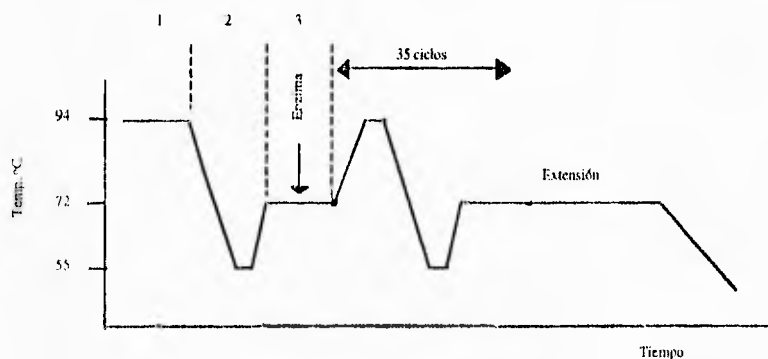


Figura 9. Esquematación del programa implementado para la amplificación del ITS de hongos endófitos. 1 y 2 representan la desnaturalización y la alineación iniciales. Durante el tiempo 3 se agrega la enzima.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del ITS de hongos endófitos de pinos, y sus secuencias son las siguientes: ITS 1F (Gardes y Bruns, 1993), que se une a la región que codifica para la subunidad 18S del rDNA y NL6A (Egger, 1995), que permite el inicio de la síntesis desde una porción de la subunidad 28S del rDNA (Figura 10). Las

secuencia del ITS-1P es: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' y la del oligonucleótido NL6A: 5'-CAAGTGCTTCCC TTCAACA-3'.

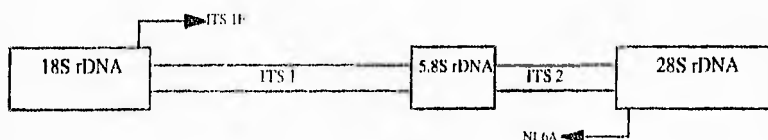


Figura 10. Sitios de unión de los oligonucleótidos al rDNA. Las flechas indican la dirección hacia la cual se lleva a cabo la polimerización.

2.4.3 Resultados y discusión

El principal inconveniente durante la implementación de las técnicas de amplificación de regiones específicas del DNA, se debe a que los parámetros utilizados para el incremento de la especificidad de la amplificación implican un decremento en la concentración del producto amplificado. Por lo tanto, debe encontrarse un equilibrio entre especificidad y concentración para que el producto posteriormente pueda utilizarse para la secuenciación o para análisis de PCR-RFLP. Otro problema, es que no existe un protocolo apropiado para todos los sistemas, por lo tanto cada nueva aplicación requiere un ajuste de los parámetros para la optimización.

Las amplificaciones resultantes, a partir del DNA que es extraído de hongos cultivados en medio líquido y del DNA obtenido a partir del protocolo para aislar DNA total de pinos ("mini-prep") varían en la concentración final, ya que en el segundo, el DNA de los endófitos se encuentra a bajas concentraciones. Sin embargo, se encontró que dicho protocolo es el óptimo para ambos casos.

Las amplificaciones observadas en los geles de agarosa, muestran que al agregar la enzima después de la desnaturalización final y de un tiempo para que ocurra la alineación, no se obtienen dímeros de oligonucleótidos y por lo tanto se incrementa la amplificación, ya que la región blanco no compete con otro sustrato por la enzima (Figura 12). El tiempo en el que se agrega la enzima es variable lo cual se debe a que es conveniente adicionar la polimerasa en el menor tiempo posible, para evitar la formación de los dímeros de oligonucleótidos. Por lo tanto, se debe calcular el tiempo que llevará poner en cada tubo de reacción la enzima, para programar el tiempo que termociclador debe mantener la temperatura de 72°C. Se encontró que en tiempos más largos de 3 minutos para este paso, se obtienen muestras altamente inespecíficas. En todas las amplificaciones se usaron como controles positivos DNA's ya usados para la amplificación de ITS de hongos endófitos y como control negativo un tubo de

reacción sin templado para comprobar la ausencia de contaminación. Con este protocolo se han amplificado 46 ITS de secuencias fungales de a partir de DNA total de acículas de pinos de diferentes especies (Figura 11) y 22 ITS de hongos

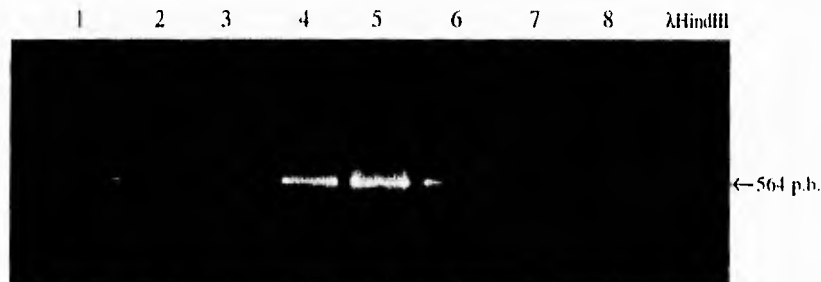


Figura 11. Amplificaciones de ITS fungal a partir de DNA total de pino.

Electroforésis en un gel de agarosa 0.8%. En los carriles 5 y 8 se observa una segunda banda, que puede corresponder a una segunda secuencia fungal. ITS fungal de *P. lagunae* (1), *P. pinetum* (2), *P. discolor* (3), *P. culminicola* (4), *P. johannis* (5), *P. cembroides* (6), *P. edulis* (7) y *P. johannis* (8). 5 μ l de muestra por carril.

obtenidos de DNA de hongos cultivados en medio líquido (Figura 12). Con excepción de un individuo de una especie (*P. johannis*; ver Figura 11), en todas las amplificaciones a partir de DNA total de pinos, se obtuvieron bandas de amplificación únicas, mientras que durante el cultivo en agar de los hongos a partir de acículas, se han obtenido hasta cinco especies fungales de una sola especie de pino y del mismo individuo. Esto se puede deber a que existen endófitos



Figura 12. Tres amplificaciones de ITS de hongos cultivados a partir de acículas estériles de pinos en un gel de agarosa 0.8%. *P. flexilis* (carril 1), *P. rezekowskii* (carril 2), *P. ayacahuite* (carril 3) y el marcador λ HindIII en el carril 4.

generalistas que se pueden desarrollar rápidamente en cultivos enriquecidos y competir con los endófitos específicos. Mientras que en condiciones naturales, los endófitos especialistas se encuentran con mayor frecuencia e impiden el crecimiento de los generalistas. Esto aumenta la probabilidad de que la secuencia fungal amplificada a partir de DNA total de pino, pertenezca a un hongo más específico y disminuye la posibilidad de que en los cultivos se encuentre el hongo más específico, sobre todo cuando los medios de cultivo no son específicos.

2.5 Conclusiones

Las técnicas implementadas para este análisis pueden utilizarse en otros sistemas para el estudio de hongos endófitos. El protocolo "mini-prep" ha sido utilizado para la extracción de DNA total de hojas de árboles del género *Abies* con buenos resultados. El método para la amplificación de secuencias de ITS fungales puede utilizarse en DNA total de hongos de cultivo y en DNA que se co-aisla de las hojas de plantas hospederas. En otros estudios serán necesarias pocas las modificaciones dependiendo del tipo de termociclador y el diseño de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

La implementación y la optimización de las técnicas son el primer paso para poder realizar el análisis filogenético con base en marcadores moleculares. Este tipo de análisis, con dos acercamientos para la obtención de resultados, brinda dos distintas perspectivas. Por un lado, cuando se extrae DNA de acículas de pinos para amplificar el ITS de hongos endófitos, se trabaja bajo el supuesto de que se amplificará el DNA del hongo endófito más abundante y por lo tanto, probablemente el endófito más específico. Por otro lado, cuando se amplifica el ITS de hongos cultivados, se pueden hacer determinaciones de los hongos de los cuales se obtiene la secuencia y analizar las relaciones sistemáticas de los endófitos. Este doble análisis puede utilizarse para la creación de sondas, a partir de los ITS de hongos de cultivo, para hibridaciones *in situ* en acículas, gametofitos, embriones y en otros tejidos de los pinos. Una vez determinada la especie de hongo, la generación de sondas y la utilización de la técnica de hibridación tiene dos aplicaciones importantes en este estudio: (1) la ubicación de una especie de endófito dentro de los diferentes tejidos de la planta, (2) mediante hibridaciones en gametofitos y embriones se puede determinar si existe una especie fungal que es transmitida verticalmente por semilla. Los resultados obtenidos, presentados en este capítulo, constituyen un avance para la realización de esta parte del proyecto, pero para complementarlos se requiere la determinación de los hongos cultivados, a partir de los cuales se obtenga la sonda.

El hecho de que exista un común co-aislamiento del DNA de la planta y del hongo endófito, junto con el gran número de endófitos reportados en fanerógamas, puede indicar que el error en el reporte de secuencias de Smith y Klein (1994; ver capítulo I) no es raro. Si se toma en cuenta que los oligonucleótidos universales para la amplificación del ITS fueron

diseñados originalmente a partir de secuencias fúngales (Gardes y Bruns, 1993), las posibilidades de amplificaciones de DNA de los endófitos son mayores. Por tanto, podría ser recomendable la implementación de un análisis, basado en los resultados presentados en este capítulo, para asegurar que las regiones amplificadas no pertenecen a secuencias fúngales. Por un lado, en especies cuyo ITS es de un tamaño similar al de un ITS fúngal, se puede realizar un análisis de similitud o un análisis filogenético con el uso de parsimonia, en el que se incluyan secuencias conocidas de hongos. Si la secuencia es muy distinta o se agrupa en un clado diferente al de los hongos, entonces se puede asegurar que no se tratan de secuencias fúngales (siempre y cuando no haya transferencia horizontal). Por otro lado, en los análisis basados en los RAPD's, si se realiza un co-aislamiento de DNA fúngal, entonces existe una alta probabilidad de que algunas de las bandas resultantes del análisis sean atribuibles a la presencia de hongos endófitos. Una manera de comprobar el co-aislamiento, puede ser mediante la amplificación del ITS con "primers" específicos para hongos. Si la amplificación es positiva puede suponerse que la presencia de DNA fúngal afectará los resultados finales del análisis, lo cual puede evitarse diseñando oligonucleótidos utilizando el uso preferencial de codones.

Los resultados obtenidos pueden usarse para la realización de un análisis preliminar de las relaciones filogenéticas de los hongos endófitos de pinos, para la comparación de secuencias y para buscar evidencia inicial de la existencia de patrones coevolutivos entre los hongos endófitos y los pinos.

CAPÍTULO III

EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO

3.1 INTRODUCCION

Para realizar el análisis de las asociaciones históricas, se requiere el uso de la inferencia filogenética como herramienta. Es por esto que, para probar la existencia de patrones coevolutivos en la relación pino-endófito, el primer paso consiste en reconstruir la filogenia de cada uno de los taxa por separado. La inferencia filogenética implica la reconstrucción a partir de una matriz de caracteres que pueden ser de tipo morfológico o molecular. Para probar la hipótesis de coevolución en este sistema se eligió el uso de un marcador molecular, el ITS del nrDNA. Una vez inferidas las filogenias, es posible realizar el análisis comparativo de éstas. Para este trabajo se cuenta solamente con un avance de la filogenia de los pinos inferida mediante secuencias parciales del ITS, por lo que uno de los objetivos de este trabajo es proporcionar los resultados preliminares de la filogenia de los hongos endófitos para así, analizar esta asociación histórica.

Los métodos de comparación de filogenias desarrollados por Brooks (1988) y Page (1994b), no han sido ampliamente usados en la búsqueda de patrones de coespeciación. En general, las interpretaciones se basan en el contraste de las dos filogenias inferidas (la del parásito y la del hospedero), simplemente poniendo una frente a la otra para encontrar patrones de similitud. Un ejemplo de este tipo de análisis es el trabajo de Chapela *et al.* (1994), que aunque no trata de una relación de parásito hospedero, sí busca un patrón de similitud para demostrar coevolución. En dicho trabajo se contrasta una filogenia inferida a partir de DNA ribosomal, con una inferida a partir de caracteres morfológicos. Otro tipo de análisis que ha sido reportado es el del mapeo de los clados de la filogenia o de los grupos taxonómicos tradicionales del hospedero sobre la filogenia del parásito u hospedero, según el caso (v. gr. Beveridge, 1986). Este enfoque utiliza básicamente los principios de parsimonia. Las comparaciones de filogenias mediante el uso de parsimonia reportadas por Brooks (1993) y por Humphries *et al.* (1986), se han hecho con base en filogenias inferidas a partir de caracteres morfológicos, al igual que las reportadas por Page (1994a y b). Los ejemplos dados corresponden a asociaciones parásito hospedero, de tipo invertebrado-vertebrado; a excepción del trabajo de Chapela *et al.* que reporta una asociación entre hormigas y los hongos que éstas cultivan. Por lo tanto, las comparaciones de taxa con relaciones mutualistas son escasas, y en general, las comparaciones en donde ambas filogenias son inferidas con base en datos

moleculares son también poco comunes todavía. Más raras aún, son las comparaciones en las que ambas filogenias se han inferido con el mismo marcador molecular. Este es el caso del trabajo que se persigue en el laboratorio de Genética Molecular y Evolución para el caso de los pinos y sus endófitos.

En este trabajo se usan secuencias de ITS de los hongos endófitos de pinos como matriz de caracteres para la inferencia filogenética. Con base en estos datos y en datos preliminares de la filogenia de las especies de pinos y de la taxonomía tradicional, planteamos las siguientes preguntas: (1) ¿cuáles son las relaciones filogenéticas de los hongos endófitos de pinos y su relación con deuteromicetos y ascomicetos conocidos?, (2) ¿existen patrones en la filogenia de los endófitos que reflejen especificidad por parte de los hongos respecto a los dos subgéneros de los pinos? y (3) ¿se pueden encontrar patrones de especificidad también a nivel de las subsecciones de pinos sugeridas en la taxonomía tradicional?. Para responder estas preguntas se requiere de la inferencia filogenética de los hongos y del mapeo de los grupos distintos de pinos sobre la filogenia de los hongos. La especificidad en la asociación se sugeriría en el caso en que los hongos pertenecientes a cada uno de los subgéneros o a cada una de las secciones de pinos se agrupen en ramas independientes.

3.1.1 Secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS) como marcadores moleculares

Dentro de la sistemática molecular se han desarrollado técnicas para la utilización de marcadores moleculares basados en la información del DNA. Los marcadores moleculares tienen ventajas de uso sobre los caracteres morfológicos para el análisis filogenético, ya que permiten trabajar directamente con el material genético y ofrecen una escala común de divergencia en todos los organismos (Avice, 1994). Entre los marcadores basados en la información del DNA se encuentran el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP; Dowlin *et al.*, 1990; Saghai Maroof *et al.*, 1995), el Polimorfismo en la Amplificación al Azar del DNA (RAPD; Williams *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1993) y la secuenciación (Gardes *et al.*, 1993). Para elegir entre los distintos marcadores se debe tomar en cuenta el costo y el tiempo invertido en el uso de cada técnica y principalmente el grado de resolución con base en la variabilidad así como el nivel taxonómico en el cual se realiza la inferencia filogenética (Avice, 1994). En el caso de la secuenciación, es importante tomar en cuenta ciertas características de las regiones utilizadas para la inferencia. Por un lado, existen genes altamente conservados, cuyas tasas de evolución son muy lentas, a partir de los cuales no se puede inferir una filogenia en niveles taxonómicos inferiores, ya que no se encuentran diferencias entre especies cercanas. Por otro lado, existen regiones del DNA con tasas de evolución mucho más altas y por lo tanto se encuentra una gran variación, incluso entre

individuos de la misma especie, lo cual no permite inferir relaciones en niveles taxonómicos superiores (Hillis y Dixon, 1991). Las principales ventajas del uso de la secuenciación de una región del DNA como marcador son las siguientes: (a) proporcionan un mayor número de caracteres y por lo tanto aumenta el poder de resolución, (b) permite la observación del modo de variación de la secuencia. Por ejemplo para discernir entre transiciones y transversiones así como entre las mutaciones silenciosas y las que no lo son, (c) se pueden definir las zonas más variables y las mas conservadas y (4) gracias a los bancos de datos electrónicos como el Genbank, se tiene acceso a secuencias de ciertas especies sin hacer el análisis directo.

Para la comparación, es recomendable usar el mismo marcador, para inferir las filogenias de los dos grupos de taxa a comparar. Esto evita los errores originados por la comparación de dos genes que difieren en sus tasas de evolución. Por lo tanto, un requerimiento para estos marcadores es que cumplan la misma función en los dos taxa a comparar.

El uso de marcadores moleculares para inferir las relaciones filogenéticas entre los hongos, es particularmente importante debido a la simple y frecuentemente convergente morfología fungal, a la carencia de registro fósil y a su amplia diversidad y distribución. Para inferir la filogenia de los hongos endófitos y de los pinos se decidió usar secuencias del ITS del DNA ribosomal.

Una región ampliamente utilizada dentro de la sistemática molecular es el DNA ribosomal (rDNA; Williams *et al.*, 1988; Gouy y Li, 1989; Hillis y Dixon, 1991). El rDNA nuclear de eucariontes esta constituido por cientos de copias de unidades de transcripción y espaciadores no transcritos. Dicha naturaleza multicopia facilita su amplificación a partir de muestras pequeñas de DNA, diluidas o altamente degradadas (Gardes *et al.*, 1993).

Dentro del rDNA existe una región ampliamente usada en la inferencia filogenética entre especies de plantas (Baldwin, 1992; Soltis y Kuzoff, 1993) y hongos (Jaslarovich *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 1995) que es el espaciador interno transcrito (por sus siglas en inglés: ITS, Internal Transcribed Spacer). La región del ITS esta constituida por dos regiones variables no codificantes, dichas regiones se denominan ITS1 e ITS2. Entre los dos espaciadores internos se encuentra el gen que codifica para la subunidad 5.8S. El conjunto del ITS1, el ITS2 y el gen 5.8S conforman el ITS total. El ITS se encuentra flanqueado por secuencias altamente conservadas, que son los genes que codifican para las subunidades pequeña y grande del RNA ribosomal (18S y 28S; Mitchell *et al.*, 1995). Debido a la presencia de estas regiones conservadas se facilita el análisis de esta región, ya que se pueden diseñar oligonucleótidos "universales" que amplifiquen un amplio rango de especies y faciliten la localización de regiones homólogas durante la alineación de secuencias. Debido a un fenómeno de

homogeneización, denominado evolución concertada, ésta familia multigénica de espaciadores presenta una baja variación intraindividual e intraespecífica (Arnheim, 1983).

En los hongos es particularmente recomendable el uso del ITS como un marcador molecular, ya que la región completa tiene un largo de 600 a 800 pares de bases (p.b.) lo cual permite su amplificación y su secuenciación completa. Además, muchos estudios han demostrado que la región del ITS tiene la variación suficiente para distinguir entre especies fungales (Gardes y Bruns, 1993).

3.1.2 Alineación de secuencias

Cuando se usan secuencias para la inferencia filogenética, cada posición corresponde a un carácter y cada nucleótido a un estado de carácter, para lo cual la alineación de secuencias es básica, ya que mediante los algoritmos de alineación se buscan las homologías posicionales por parsimonia. Una vez hecha la alineación se puede hacer la inferencia filogenética usando como matriz de caracteres el resultado de la alineación.

La comparación de dos o más secuencias homólogas implica la identificación del sitio donde pudieron haber ocurrido inserciones o deleciones en dos o más linajes desde su divergencia de un ancestro común. Ningún algoritmo de alineación permite distinguir en cual de las secuencias hubo una inserción y en cual hubo una deleción por lo cual se denomina a los dos tipos de eventos como huecos (en inglés "gap"; Li y Graur, 1991). A lo largo de una alineación se pueden encontrar tres tipos de apareamientos por sitio: (1) existe correspondencia; cuando en las dos secuencias se encuentran bases iguales, (2) no hay correspondencia; cuando en el mismo sitio, para las dos secuencias se encuentran bases distintas y (3) cuando en una secuencia se encuentra una base y en la otra un "gap". La explicación para el primer caso es que no han existido cambios desde la divergencia o se encuentra una convergencia de los dos linajes, el segundo caso se explica mediante un evento de sustitución, y el tercer caso se debe a eventos de inserción o deleción.

Durante la alineación de secuencias divergentes se debe equilibrar el número de sitios impares y de "gaps" que se insertarán, para hacer la alineación más parsimoniosa. Al disminuir el número de sitios impares (donde no existe correspondencia) aumenta el número de espacios y viceversa, al disminuir el número de espacios se aumenta la probabilidad de aparición de sitios impares.

El algoritmo de alineación se elige dependiendo del tamaño y del número de secuencias a comparar. Además depende también del grado de divergencia entre las secuencias. Cuando se comparan únicamente dos secuencias muy parecidas se pueden alinear mediante una inspección visual. Debido al número y tamaño de las secuencias comparadas para este trabajo, se utilizó un algoritmo de alineaciones múltiples de secuencias, mediante un programa de computadora

denominado Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Este algoritmo se basa en obtener alineaciones múltiples a partir de una serie de alineaciones binarias (Doolittle, 1986).

Básicamente, el algoritmo de alineación múltiple de secuencias consiste en tres pasos: (1) todas las secuencias son alineadas separadamente por pares para calcular la matriz de distancia y encontrar el grado de divergencia para cada par de secuencias, (2) se calcula un "árbol gúfa" a partir de la matriz de distancia y (3) las secuencias son alineadas progresivamente de acuerdo al orden de ramificación del árbol gúfa (Thompson *et al.*, 1994). Las posiciones de los espacios o "gaps" que fueron introducidas durante los primeros alineamientos de secuencias cercanamente relacionadas, preferentemente no cambian durante la adición y alineación de las nuevas secuencias, que son las más divergentes. Debido a lo anterior cuando existen errores durante la alineación, el problema real es originado durante las alineaciones iniciales.

3.1.3 La inferencia filogenética y el uso de máxima parsimonia.

Existen distintos algoritmos numéricos para inferir filogenias a partir de una matriz de caracteres, uno de los cuales se basa en el principio de máxima parsimonia (Hillis y Moritz, 1990). Este método se basa en seleccionar los árboles que contengan el número mínimo de cambios evolutivos (cambios de un estado de carácter a otro). El algoritmo consiste básicamente en los siguientes pasos: (1) indentificar los sitios informativos, (2) para cada árbol posible se calcula el número mínimo de sustituciones en cada sitio informativo, y (3) se suma el número total de cambios de todos los sitios informativos para cada árbol y se elige el árbol con el menor número de cambios en los sitios informativos (Li y Graur, 1991).

La búsqueda de árboles con menor longitud se llevo al cabo con el programa PAUP (Phylogentic Analysis Using Parsimony, versión para Macintosh) desarrollado por Swofford (1993). Dentro de este programa existen tres tipos de búsquedas, que se usan dependiendo del número de especies incluidas en el análisis, relacionado con la capacidad de memoria y la velocidad de trabajo de la computadora. Cuando se cuenta con un número pequeño de especies (menos de 11), se puede realizar una búsqueda exhaustiva, la cual se basa en la evaluación de todos los árboles posibles (estrictamente dicotómicos). El algoritmo consiste simplemente en conectar los tres primeros taxa de la matriz de caracteres que forman el único árbol posible sin raíz. En el siguiente paso se adiciona el cuarto taxon a cada una de las ramas del árbol de tres taxa inicial, de lo cual se generan tres árboles. Se continua con la adición de los siguientes taxa a cada una de las ramas de los árboles que se generan en cada paso y finalmente se eligen los árboles más parsimoniosos, es decir, con el menor número de pasos. Se debe puntualizar que el orden de adición de los taxa no tiene importancia; la adición puede hacerse al azar o por cercanía (Li y Graur, 1991).

Dado que las búsquedas exhaustivas no representan una buena estrategia cuando se trabaja con más de 11 taxa, frecuentemente se utiliza el método de "branch and bound". Este método es muy similar al algoritmo de búsqueda exhaustiva descrito anteriormente. La diferencia consiste en que si durante la búsqueda, un arreglo de taxa origina un árbol de mayor longitud que la de un árbol inicial generado al azar, entonces no se continúa la búsqueda en esa topología, ya que al conectar los taxa adicionales no será posible disminuir la longitud de dicho árbol. Se eliminan todas las topografías que descendan de dicho nodo y se inicia la adición de taxa en otra topografía inicial. De esta manera es posible eliminar de la memoria todos aquellos árboles menos parsimoniosos.

Cuando un grupo de datos es demasiado grande, no se pueden utilizar métodos exactos. Se debe utilizar un enfoque heurístico que aunque disminuye la certeza de una búsqueda óptima, disminuye el tiempo de cómputo (Swofford, 1993). Generalmente las búsquedas heurísticas utilizan un árbol inicial generado al azar para comenzar el proceso; en este árbol se realizan distintos rearrreglos de tal manera que se reduce el número de pasos y si un arreglo es exitoso en encontrar un árbol de menor longitud, se adicionan taxa en este último árbol. Cuando no hay manera de mejorar el árbol la búsqueda se detiene, y se puede reiniciar con otro árbol. La desventaja de este método es que no se puede saber si el árbol final más corto es realmente el árbol más corto posible, ya que puede tratarse de un árbol óptimo local y no un óptimo global. Existen dos estrategias básicas para optimizar una búsqueda heurística: (1) realizar varias repeticiones de la búsqueda iniciando cada vez con árboles distintos y (2) especificar distintas opciones de arreglar los clados. Se pueden realizar búsquedas con varias alternativas posibles, ya que cada una de ellas puede proporcionar potencialmente un punto de inicio distinto, que a su vez puede generar un árbol más parsimonioso.

Para estimar la confianza estadística de una hipótesis filogenética, obtenida mediante cualquiera de los tres tipos de búsquedas, se puede usar la técnica de "bootstrap" (Li y Zharkikh, 1994), que es un método de submuestreo o remuestreo. Dicha técnica se basa en la generación de representaciones del error de muestreo, para probar la confiabilidad de la matriz de caracteres y de las hipótesis filogenéticas inferidas a partir de dicha matriz. Como el muestreo en la reconstrucción filogenética no existe, el remuestreo se hace a partir del conjunto original de datos. Los caracteres son remuestreados con reemplazamientos hasta que el conjunto de datos tiene el tamaño original, entonces se lleva a cabo la reconstrucción del árbol. En otras palabras, tomando en cuenta que una matriz de caracteres se compone por caracteres (columnas) y taxa (renglones), una columna (un caracter con todos sus estados) es duplicada dentro de la matriz de datos reemplazando a otra columna, generando una matriz de caracteres diferente, a partir de la cual se genera un nuevo árbol. Lo anterior comprende únicamente a una réplica de "bootstrap". El nivel de confianza para una hipótesis filogenética (cualquier

dicotomía en el cladograma) puede estimarse por el porcentaje de veces que la hipótesis se sustenta entre el número de réplicas de "bootstrap" (Sanderson, 1995).

3.2 Método

Los métodos de colecta, extracción de DNA y amplificación del ITS se encuentran detallados en el Capítulo II. Los ITS amplificados fueron purificados para la secuenciación, por medio de reamplificaciones mediante la PCR o con el uso de protocolos de purificación (ver Apéndice III). Se secuenciaron 22 ITS fungales obtenidos de DNA total de pinos y solamente 2 de hongos cultivados y aislados (secuencias correspondientes a *P. gregii* y *P. arizonica*). Los templados de PCR se secuenciaron en un secuenciador automático (ABI; Liston *et al.*, 1996) del Departamento de Botánica y Patología de Plantas de la Universidad Estatal de Oregon. En el laboratorio del Dr. Aaron Liston, del mismo Departamento, se obtuvo una secuencia parcial de ITS de 130 pares de bases (pb) a partir de un micelio cultivado del género *Lophodermium*. Sólo en los casos de *P. lagunae* y *P. culminicola*, se obtuvieron dos secuencias fungales distintas, ya que se contaba con dos individuos de cada una de las dos especies de pinos. La secuencia más corta corresponde al hongo de *P. pseudostrobus* con 374 pares de bases y la más larga corresponde a *P. michoacana* con 633 pb. Del Genbank se sacaron 6 secuencias de ITS de hongos deuteromicetos y ascomicetos.

La riqueza en contenido de cada uno de los diferentes nucleótidos se obtuvo con el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993; versión 1.02 para PC). En el programa PHYLIP (Felsenstein, 1993; versión 3.5 para Macintosh) se construyó una matriz de distancia para todas las secuencias para estimar el número de sustituciones nucleotídicas por sitio (k) mediante la fórmula de Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980).

Las secuencias fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL W versión 1.4 para Macintosh (Thompson *et al.*, 1994) y utilizadas como matriz de caracteres para la inferencia filogenética. Para la inferencia filogenética se utilizó el programa PAUP versión 3.0 para Macintosh (Swofford, 1991).

Para responder las preguntas planteadas en la introducción de este capítulo, se hicieron tres análisis distintos para inferir la filogenia de los hongos endófitos y para los análisis preliminares de la comparación. Para cada uno de ellos se realizó una alineación independiente. El primer análisis incluye todas las secuencias obtenidas y las extraídas del Genbank. El segundo contiene solamente las secuencias que se obtuvieron de los hongos endófitos de pinos y el tercero únicamente las secuencias fungales que corresponden a pinos del subgénero *haploxylo*. Para las dos primeras reconstrucciones se utilizaron búsquedas heurísticas; la tercera reconstrucción se obtuvo a partir de una búsqueda de tipo "branch and bound". Debido a que no se cuenta con la determinación de los hongos endófitos que se mencionan en este

trabajo, el nombre asignado es el mismo que el de la especie de pino del cual se obtuvo la secuencia fúngal.

El objetivo de la primera reconstrucción es analizar si los hongos endófitos secuenciados se agrupan en un grupo separado de aquellas ramas en las que se incluyen los hongos más generalistas elegidos para el análisis, cuyas secuencias se obtuvieron del Genbank. Las especies de deuteromicetos y ascomicetos utilizadas son las siguientes: *Alternaria alternata*, *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium dendriticum*, *Gibberella avenacea* y *Trichophyton rubrum* (cuyos números de acceso al genbank son: U05195, Z29523, X65478, L14502, U26737 y U18352 respectivamente). Las dos primeras especies son deuteromicetos y las demás son ascomicetos. A excepción de los dos últimos géneros, todos han sido encontrados en los cultivos de hongos obtenidos a partir de acículas estériles. Mediante este análisis se pueden inferir las relaciones filogenéticas entre los hongos endófitos de pinos y su relación con el género *Lophodermium*. Dicho género es particularmente importante en el análisis, ya que como se mencionó en el Capítulo I, posee características que lo hacen un importante candidato para encontrar patrones de especificidad con el género *Pinus*.

Debido a que tanto la filogenia de los pinos, como la de los endófitos, se encuentran incompletas, no puede llevarse al cabo una comparación de filogenias formal. Por lo tanto, el análisis aquí presentado consiste en un mapeo de los grupos propuestos en la taxonomía tradicional de pinos sobre la filogenia de los hongos endófitos, tomando así al hospedero como estado de carácter. El primer paso para la comparación de árboles por parsimonia requiere el mapeo de una filogenia inferida sobre la filogenia del asociado, para este análisis se mapearon grupos de pinos y no la filogenia, lo cual hace el análisis menos preciso. A pesar de la poca resolución de este tipo de análisis se pueden encontrar patrones de especificidad y postular cambios de hospedero.

La taxonomía tradicional de los pinos separa al género *Pinus* en dos subgéneros: *Haploxyylon* y *Diploxyylon*, ó pinos blandos y duros, que se distinguen por tener uno o dos haces vasculares por hoja, respectivamente. En la filogenia inferida a partir de los ITS de DNA de pinos, se encontró que estos dos grupos se distinguen claramente como clados diferentes, lo cual hace interesante probar si existe esta divergencia en los endófitos. Es decir, si es posible encontrar una separación entre los clados de hongos de pinos blandos y los hongos de pinos duros. Con base en lo anterior, para la segunda reconstrucción, se utilizaron todas las secuencias obtenidas en el laboratorio, omitiendo las secuencias de endófitos generalistas obtenidas del Genbank. Sobre la filogenia inferida se mapearon los dos subgéneros.

Es posible que también exista una separación entre los clados de los hongos encontrados en especies de pinos de las diferentes secciones y subsecciones asignadas por la taxonomía tradicional dentro de cada subgénero. Debido a que se cuenta con un número mayor

de secuencias de representantes de pinos blandos, la tercera reconstrucción, que incluye únicamente pinos del género *Haploxyton*, se utilizó para mapear las secciones y subsecciones de este subgénero.

3.3 Resultados y discusión

Las tablas de composición nucleotídica y la matriz de distancia para todas las secuencias se presentan en los apéndices IV y V. Los nucleótidos T y C (26% y 25.9%) se encuentran en mayor proporción que las bases A y G (23.5% y 24.7%). Los valores porcentuales encontrados reflejan una mayor riqueza en G-C. Estos valores porcentuales son similares a los presentados por Jasalavich *et al.* (1995) para secuencias de ITS de hongos ascomicetos.

En la matriz de distancia genética se encontró que el valor más bajo es de 0.042 que corresponde a hongos endófitos de *P. culminicola* y *P. lagunae*, que son dos especies cercanamente relacionadas de acuerdo con la taxonomía tradicional, mientras que el valor más alto es de 6.002, para la pareja de *Lophodermium* sp y *P. pseudostrobus*, lo cual puede indicar que el hongo aislado de dicho pino no se encuentra relacionado con los endófitos del género *Lophodermium*. La secuencia con menor distancia genética a *Lophodermium* es la secuencia correspondiente al género *Penicillium*.

En el primer análisis, para la inferencia de las relaciones filogenéticas de los hongos endófitos, se obtuvo un árbol consenso mediante una búsqueda heurística con índice de consistencia de 0.431 y 3 158 pasos. Los índices de bootstrap en 100 réplicas indican que las ramificaciones o hipótesis filogenéticas son robustas (Figura 13). En el cladograma se observa la formación de un grupo que contiene las secuencias obtenidas en el Genbank y *Lophodermium* muy cercano a *Penicillium*; la secuencia fungal encontrada en *P. culminicola* se asocia también a este grupo. Relacionado a dicho grupo, se encuentra otro conformado por hongos encontrados en pinos duros (*P. halepensis*, *P. oaxacana*, *P. gregii* y *P. duranguensis*) y la secuencia perteneciente a *Alternaria*. Estos dos grupos se asocian con la secuencia correspondiente a *P. arizonica*. Las secuencias de hongos que corresponden a pinos blandos se agrupan aparte, pero dos secuencias fungales correspondientes a pinos duros se encuentran dentro de este grupo (*P. maximianii* y *P. herreraii*). Entonces, se encuentran dos grupos claramente separados, el primero formado en general por secuencias de pinos duros y secuencias de endófitos generalistas y el segundo formado principalmente por secuencias de pinos blandos. Unido basalmente a los dos grupos, se encuentra un clado que contiene las secuencias de hongos encontradas en *P. cutarinae* y *P. quadrifolia*. Existen dos clados separados de los demás grupos, en uno se encuentran dos secuencias de pinos blandos (*P. edulis* y *P. johannis*) y dos secuencias de pinos del subgénero *diploxyton* (*P. pseudostrobus* y

P. michoacana), el otro clado está formado por una única secuencia fungal, que es la correspondiente a *P. rzedowskii*. Las dos secuencias de hongos

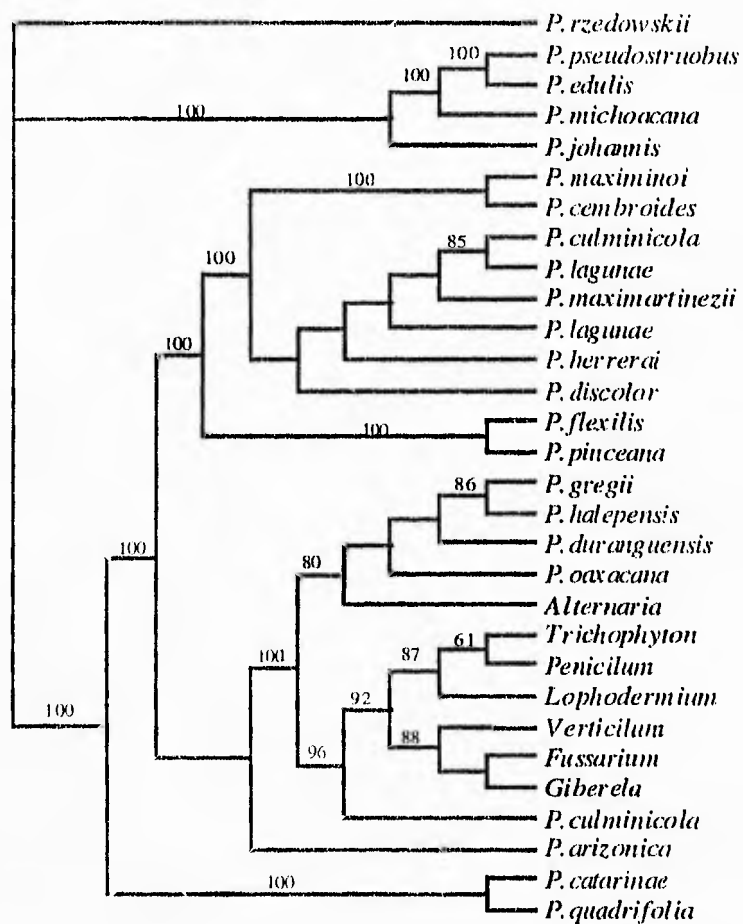


Figura 13. Filogenia de hongos endófitos obtenida mediante una búsqueda heurística. Los valores entre las ramas corresponden al los porcentajes de "Bootstrap" de cien repeticiones. I.C = 0.431, L = 3158.

encontradas en dos individuos distintos de *P. lagunae* se encuentran cercanas en la filogenia, mientras que las dos secuencias que corresponden a dos individuos distintos de *P. culminicola*

se encuentran notablemente separadas. Este último resultado indica que no todas las secuencias obtenidas son las correspondientes a los hongos más específicos, por lo cual para las siguientes reconstrucciones se eliminó del análisis a una de las secuencias de *P. culminicola*.

La segunda reconstrucción incluye únicamente a las secuencias obtenidas en este trabajo y muestra que en general sí se pueden distinguir dos clados, en uno de los cuales se encuentran las secuencias de los hongos asociados a pinos del subgénero haploxyton, y en otro, aquellos que se asocian a pinos del subgénero diploxyton (Figura 14).

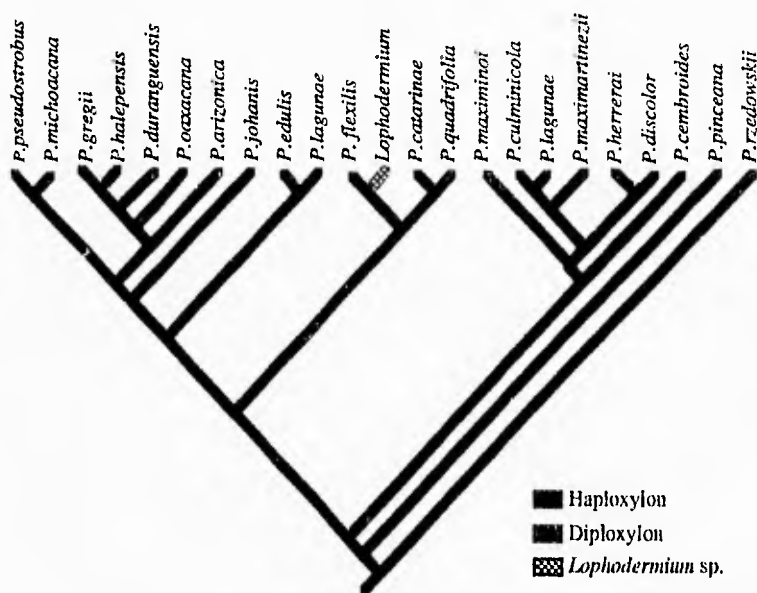


Figura 14. Filogenia de los hongos endófitos. Mapeo de los dos subgéneros del género *Pinus*, en las especies de endófitos asociados. Reconstrucción inferida a partir de una búsqueda heurística. Árbol más corto, de longitud = 2830 y CI = 0.499.

A excepción de dos especies (*P. maximinoi* y *P. herrerae*), las secuencias de endófitos encontradas en pinos duros se agrupan en un clado distinto al de las secuencias encontradas en los pinos blandos. Es posible que las ramas que se encuentran en el clado donde se encuentra la secuencia de *Lophodermium* sp. pertenezcan a especies cercanas a este género. La presencia de las secuencias encontradas en *P. maximinoi* y *P. herrerae* en el grupo de los pinos blandos

puede atribuirse a un cambio de hospedero o a que el mismo hongo se encuentra en los dos grupos (ver fig. 13 y 14). En esta reconstrucción las secuencias fungales obtenidas de *P. lagunae*, se encuentran más distantes que en la primera reconstrucción, sin embargo, las dos secuencias se agrupan con especies de pinos relativamente cercanas. Estos cambios en la agrupación de las ramas pueden ser un artefacto de las búsquedas heurísticas o un cambio por la polaridad dada por la presencia o ausencia de ciertas especies en los tres diferentes análisis y el uso de distintos grupos externos.

La tercera reconstrucción que sólo incluye los endófitos encontrados en pinos del género haploxylon (Figura 15), se utilizó para el mapeo de las secciones y subsecciones en que se encuentra dividido tradicionalmente dicho subgénero y se designó como grupo externo a la secuencia parcial correspondiente a *Lophodermium*. Haploxylon está compuesto por dos secciones: Cembra y Paracembra, la sección Paracembra se encuentra dividida a su vez en las subsecciones Cembroides y Pinceana.

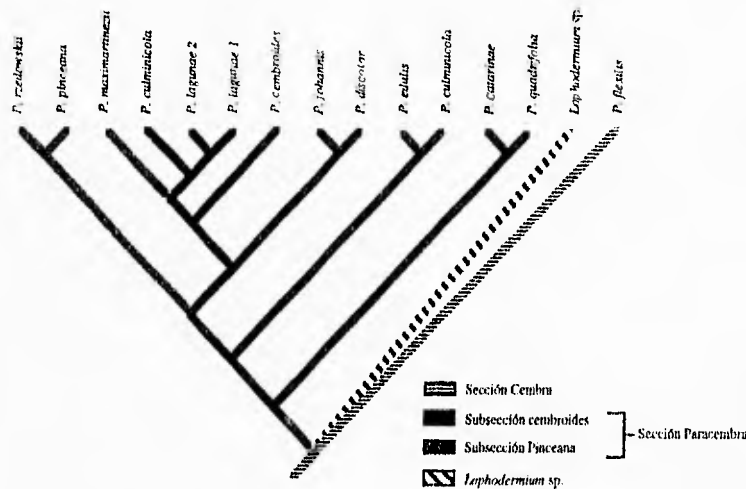


Figura 15. Mapeo de las secciones de los pinos del subgénero haploxylon en la filogenia de los endófitos encontrados en pinos blandos. Reconstrucción hecha a partir de una búsqueda de tipo "branch and bound". Árbol más corto, de longitud = 1400 y CI= 0.678.

El mapeo de las subsecciones sobre el cladograma de las secuencias de endófitos, muestra que sí existe asociación entre las subsecciones y los clados definidos en la filogenia.

Todos los representantes de la sección Paracembra se encuentran agrupados en un mismo clado. En el caso de la subsección pinceana, el patrón encontrado puede atribuirse a un cambio de hospedero, ya que las secuencias fungales de *P. rzedowskii* y *P. pinceana* se encuentran agrupadas en un clado, mientras que la secuencia del hongo endófito asociado a *P. maximartinezii* se encuentra dentro del clado donde se encuentran las secuencias de la subsección cembroides. Las dos secuencias correspondientes a hongos asociados a dos individuos distintos de *P. lagunae* se encuentran cercanamente relacionadas, lo cual puede deberse a que en este caso sí se encontró la secuencia del hongo más específico para esta especie de pino.

Para un análisis más completo, sería necesario contar con un mayor número de secuencias completas representantes de cada sección, ya que en este análisis los hongos asociados al subgénero Haploxyton se encuentran sobrerrepresentados, así como los asociados a la sección Cembra se encuentran subrepresentados. Además, en los análisis filogenéticos preliminares presentados en este trabajo se debe tomar en cuenta que existen varias fuentes probables de sesgo en los resultados. En primera instancia, como ya se ha mencionado mediante búsquedas heurísticas se encuentran siempre árboles óptimos locales y no óptimos globales y en segunda instancia, los análisis filogenéticos varían mucho en los resultados finales dependiendo de las especies incluidas en cada análisis. Una vez que se cuente con un conjunto de datos más completo se harán análisis de filogenia con adición aleatoria de árboles para explorar distintas "islas" de árboles y minimizar el riesgo de encontrar óptimos locales. Otra causa posible de un sesgo en este análisis es el hecho de que la secuencia de *Lophodermium* se encuentre incompleta, lo cual disminuye el número de sitios informativos útiles para la inferencia filogenética. Es importante que en análisis posteriores se incluya un mayor número de secuencias obtenidas de hongos cultivados y determinados, para que de esta manera las secuencias obtenidas de DNA total de pinos puedan ser identificadas, además esto permitiría encontrar más géneros que presenten patrones de especificidad con los pinos.

A pesar de los posibles sesgos, el análisis aquí presentado representa una guía para la búsqueda de patrones de especificidad, para la selección de las especies que se utilizarán en análisis posteriores y para tener un panorama general de las relaciones filogenéticas de los hongos endófitos de los pinos. La topología de los árboles de endófitos indica especificidad a nivel de los dos subgéneros de los pinos y a nivel de secciones en el subgénero Haploxyton. Esta congruencia puede tomarse como evidencia preliminar de la existencia de especificidad, pero se debe tomar en cuenta que la especificidad no es siempre consecuencia de la coevolución, así como la congruencia entre las filogenias de los asociados no significa necesariamente coevolución.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El montaje y la optimización de las técnicas son el primer paso para la obtención de resultados reproducibles en cualquier análisis que utilice marcadores moleculares. Las técnicas montadas, presentadas en este trabajo, ofrecen resultados que han permitido obtener datos preliminares para la inferencia filogenética de los hongos endófitos de pinos y para encontrar evidencia de especificidad y de posibles patrones coevolutivos en dicha relación. Pero para hacer comparaciones formales con los métodos aquí revisados, es necesario completar las filogenias de ambos grupos. Este análisis puede servir para dirigir el estudio e identificación en los hongos de cultivo mediante el seguimiento de las agrupaciones en los clados y por análisis en las secuencias como los aquí presentados.

Debido al creciente interés en el estudio de los pinos y de los hongos endófitos en general, la técnica para la extracción de DNA total de pinos montada, presentada en el capítulo II, puede ser publicada como nota técnica (ver apéndice VI). Dicho protocolo ha sido probado (con pocas muestras) para la extracción de DNA de gametofito y embriones de pinos. También se ha probado para otras especies de coníferas con el mismo éxito. A partir de este DNA se pueden buscar, mediante amplificaciones del ITS con oligonucleótidos específicos secuencias fungales para buscar evidencias de transmisión vertical de hongos endófitos por vía materna.

Bajo la hipótesis de que los patrones de especificidad son de clados o grupos (por ejemplo a nivel de subsecciones) y no de especie, será recomendable hacer un análisis tomando en cuenta únicamente a representantes de las distintas secciones o subsecciones, o tomar como base los clados formados en la filogenia completa de los pinos. Un paso importante para el análisis, es encontrar las condiciones de cultivo para *Lophodermium* sp. y la búsqueda de otros géneros de endófitos de pinos para los cuales se puedan hacer análisis detallados de patrones de especificidad. Es importante tomar en cuenta que la congruencia entre las filogenias es sólo una evidencia preliminar de coevolución en esta asociación endófito-hospedero, para tener más evidencia se debe analizar si la interacción afecta la dinámica poblacional y las proporciones génicas de las especies asociadas.

El estudio de patrones de especificidad en esta asociación, puede ser la base para estudios posteriores en este sistema endófito-hospedero. Este tipo de análisis macroevolutivo puede ser la base para entender la evolución de los sistemas de reconocimiento y los mecanismos de defensa del hospedero, así como en la evolución de los endófitos a partir de un ancestro parásito ó en la búsqueda de patrones biogeográficos. Por otro lado a un nivel microevolutivo, se pueden analizar los mecanismos de infección, de transmisión y de fructificación, así como los índices de infección y análisis de variación poblacional de los hongos en una población de pinos. Además, como se ha mencionado en la introducción, una

vez definidos los géneros de hongos con especificidad en pinos, se podría pensar en aplicaciones biotecnológicas de algunos de estos endófitos para el control de hongos patógenos.

Los resultados preliminares presentados en este trabajo representan únicamente un avance para el estudio de la especificidad de hongos endófitos y pinos. En el proyecto de "Filogenias moleculares y especificidad de hongos endófitos del género *Pinus* L." se completará la filogenia de los endófitos y se realizará una comparación de filogenias formal.

LITERATURA CITADA

- Adams, E. N. 1972. Consensus techniques and the comparison of taxonomic trees. *Syst.Zool.* **21**: 390-397.
- Alvarez-Buylla R. E. y F. J. Espinosa. 1995. Proyecto presentado al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Tecnológica de la UNAM.
- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution. pp. 38-61. En: Evolution of genes and proteins. Nei, N. y Koehn, R. K. (eds.), Sinauer. Sunderland, Massachusetts. 331pp.
- Avice, C.J. 1994. Molecular markers, natural history y evolution. Chapman y Hall, New York. 511pp.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic Utility of the Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in plants: An Example from the Compositae. *Mol. Phyl. y Evol.* **1**(1): 3-16
- Barrett, J. A. 1983. Plant-fungus symbioses. pp. 137-160. En: Coevolution. Futuyma, D.J. y M. Statkin (eds.), Sinauer, Massachusetts. 555pp
- Beveridge, I. 1986. Coevolutionary relationships of the helminth parasites of australian marsupials. pp 93-117. En: Coevolution and Systematics. Stone, A. R. y Hacksworth, D. L. Clarendon Press. Oxford. 147pp
- Brooks, D.R. 1981. Hennig's parasitological method: a proposed solution. *Syst Zool.* **30**:229-249.
- Brooks, D.R. 1988. Macroevolutionary comparisons of host and parasite phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**:235-59.
- Brooks, D.R., R.T.O'Grady y E.O. Wiley. 1986. A measure of the information content of phylogenetic trees, and its use as an optimal criterion. *Syst. Zool.* **35**:571-81.
- Brooks, D.R. y D. McLennan. 1991. Phylogeny, Ecology and Behavior. The University of Chicago Press. Chicago. 434pp.
- Bruns, D.T., T. J. White y Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular sistematics. *Anna. Rev. Ecol. Syst.* **22**:525-64.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology.* **69**(1):2-9.
- Chapela, I. II., S. A. Rehner, T. R. Schultz y U. G. Muller. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ant and their fungi. *Science.* **266**: 1691-1694
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology.* **69**(1):10-16
- Craig, T. P., P. W. Price, K. M. Clancy, G. L. Waring y C.F. Sacchi. 1988. Forces preventing coevolution in the three trophic level system: Willow a gall-forming herbivore and parasitoid. pp57-80. En: Chemical Mediation of Coevolution. K.C. Spencer (ed.), Academic Press. San Diego. 609pp

- Doolittle, R.F. 1986. Of urfs and orfs. University Science Books. Mill Valley. 103pp.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Dowling, T. E., C. Moritz, y J. Palmer. 1990. Nucleic acids II: Restriction site analysis. pp250-317. En: Molecular systematics. D. M. Hillis y C. Moritz (eds.), Sinauer, Sunderland. 588pp
- Egger. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* (in press)
- Ehrlich, P.R. y P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18:586-608.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, version 3.5c. Distributed by the author. Department of genetics. University of Washington, Seattle.
- Futuyma, D.J. y M.Slatkin. 1983. En: Coevolution. Futuyma, D.J. y M.Slatkin (eds.). pp. 1-13 Sinauer, Massachusetts. 555pp.
- Gardes, M y T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2:113-118
- Gelfand, D. 1989. *Taq* DNA polymerase. En: Erlich, H.A (ed.). PCR Technology. pp. 17-22 Stockton Press. New York. 246pp.
- Gouy, M., y W-H. Li. 1989. Molecular phylogeny of the Kingdoms Animalia, Plantae and Fungi. *Mol. Biol. Evol.* 6:109-122
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W. M. Gelhart. 1993. Genetic Analysis. 5a edición. Freeman. New York. 840pp.
- Hata, K. y K. Futai. 1995. Endophytic fungi associated with healthy pine needles and needles infested by the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *Can. J. Bot.* 73:384-390
- Hennig, W. 1966. Phylogenetic Systematics. Univ. Illinois Press. Urbana. 263pp.
- Higgins, D.G., A.J. Bleasby y R.Fuchs. 1992. Clustal V: improved software for multiple alignment. *Cabios*. 8(2):189-191
- Hillis, D. M. y M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The quarterly review of biology*. 66(4): 411-431
- Hillis, D. M. y C. Moritz. 1990. Molecular systematics. Sinauer. Massachusetts. 588p
- Humphries, C. J., J. M. Cox y E. S. Nielsen. 1986. *Nothofagus* and its parasites, a cladistic approach to coevolution. pp 55-76. En: Coevolution and Systematics. Stone, A. R. y Hacksworth, D. L. (Eds.). Clarendon Press. Oxford. 147pp
- Innis, A.M. y D.H. Gelfy. 1990. En: Sninsky, J.J., y White T. J. (eds.). PCR protocols: a guide to the methods and applications. 3-11pp. Academic Press, San Diego
- Jasulavich, C.A., V.M. Morales y L. E. Pelcher. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Aternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* 99(5): 604-614

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating the evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary analysis, versión 1.02. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Landre, P. A., D.H. Gelfand y R.M. Watson. 1995. En: PCR Strategies. Innis, M.A., Gelfand, D.H. y Shinsky, J.J. (eds.) 3-16pp. Academic Press, San Diego. 373pp.
- Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press, Oxford. 1272pp.
- Lewinsohn, E., M. Gijzen y R. Croteau. 1991. Defense Mechanisms of conifers. *Plant Physiol.* **96**: 44-49.
- Li, W-H y Graur, D. 1991. Molecular Evolution. Sinauer, Massachusetts. 284pp.
- Li, W-H y A. Zharkikh. 1994. What is the bootstrap technique?. *Syst. Biol.* **43**(3): 424-430
- Liston, A., W. A. Robinson, J. M. Oliphant y E. R. Alvarez-Buylla. 1996. Length variation in the Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region of Non-Flowering Seed Plants. *Systematic Botany* **21**(2):1-12
- Liston, A., A. Klein y E. Alvarez-Buylla. (en rev.). Nuclear ribosomal DNA sequences of conifers: "there is a fungus among us". *Mol. Phyl. y Evol.*
- Martínez, M. 1992. Los pinos mexicanos. 3a edición. Ediciones botas. México D.F. 361pp.
- Milligan, B.G. 1992. DNA isolation with CTAB. En: Hoelzel A. R. (ed.). *Molecular genetic analysis of populations*. pp. 59-88. Oxford University Press, New York..
- Minter, W.D. 1979. *Leptostroma* on pine needles. *Can. J. Bot.* **58**: 906-917.
- Minter, W.D. y C.S. Millar. 1980. Ecology and biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *Pinus sylvestris*. *Eur. J. For. Path.* **10**: 169-181
- Mitchell, J. I., P.J. Roberts y S.T. Moss. 1995. Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *Mycologist.* **1995**(5): 64-75
- Mitter, C. y D.R. Brooks. 1983. En: Coevolution. Futuyma, D.J. y M. Slatkin (eds.) Sinauer, Massachusetts.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific Res.*
- Murray, M.G. y W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high weight plant DNA. *Anal. Biochem.* **8**:4321-4325
- Page, R.D. 1990. Temporal congruence and cladistic analysis of biogeography and cospeciation. *Syst. Zool.* **39**(3):205-226.
- Page, R.D. 1994a. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms and areas. *Syst. Biol.* **43**:58-77
- Page, R. D. 1994b. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics.* **10**:155-173

- Perry, P.J. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231pp.
- Petrini, O. 1992. Fungal endophytes of tree leaves. Andrews, J.H. y. Hirano, S. S. (eds.). pp. 179-197. En: *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag. New York.
- Pirozynski, K. A. y D. L. Hawksworth. 1988. Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview. En: Pirozynski, K.A. y Hawksworth D.L.(eds). *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic Press, London.
- Price, C.A. 1983. En: Hall, J.L y Moore A.L. (eds.). *Isolation of membranes and organelles from plant cells*. Academic Press, London. 10pp.
- Rickwood, D. y D. Patel. 1995. *Cell and molecular biology*. Wiley. London. 224pp.
- Ronquist F. y S. Nylin. 1990. Process and pattern in the evolution of species associations. *Syst. Zool.* **39** (4): 323-344
- Russell, J. R., F. Hosein, E. Johnson, R. Waugh, y W. Powell. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* **2**(2): 89-97
- Rzedowski, J. 1986. *Vegetación de México*. Limusa. México D.F. 432pp.
- Saenz R. C. 1991. Control genético de algunas características de progenies de medios hermanos de *Pinus patula* Schiede y Deppe, procedientes de Sudáfrica y probadas en Veracruz, México. Tesis de Maestría. UACH. México.
- Saghai Maroof, M. A., Q. Zhang, y R. Biyashev. 1995. Comparison of restriction fragment length polymorphisms in wild and cultivated barley. *Genome*. **38**: 298-306
- Saiki, R.K. 1989. En: PCR Technology, H.A. Erlich ed. 17-22pp. Stockton Press. New York. 246pp.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, G.T. Horn, H.A. Erlich y N. Arheim. 1985. Enzymatic amplification of α -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. **230**:1350-1354.
- Sanderson, J.M. 1995. Objections to bootstrapping phylogenies: a critique. *Syst. Biol.* **44**(3): 299-320.
- Siegel, M. R. y C. L. Schardl. 1991. Fungal Endophytes of Grasses: Detrimental y Beneficial Associations. En: Andrews, J. H. y Hirano, S. S. (eds.), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York. 198-221pp.
- Sigurgeirsson, A., y A. E. Szmidt. 1993. Phylogenetic y biogeographic implications of chloroplast DNA variations in *Picea*. *Nord.J. Bot.* **13**:233-246
- Slatkin, M. 1983. Models of coevolution: their use and abuse. En: (Nitecki, M.H. (ed.), *Coevolution*. The University of Chicago Press. 339-370pp.
- 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 1 region. *Mol. Phyl. y Evol.* **3**(1):17-26

- Soltis, D. E. y R. K. Kuzoff. 1993. ITS variation within and among populations of *Lomatium grandifolium* and *L. laevigatum*. *Mol. Phy. Evol.* 2:166-170
- Styles, B.T. 1993. The pines. En: Ramamoorthy, T., Bye, P., Lot, A. (eds.). Biological diversity of Mexico: origin and distribution. 812pp.
- Swofford, D.L. 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Computer program distributed by The Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois.
- Taylor B.H., J.R. Manhart y R. M. Amasino. 1993. En: Click, R.B y Thompson, J.E.(eds.). Method in plant molecular biology and biotechnology. pp37-47. CRC press. London.360pp
- Thompson, D.J., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22(22): 4673-4680
- Thompson, J. N. 1989. Concepts of coevolution. *TREE*. 4(6): 179-183
- Thompson, J. N. 1994. The Coevolutionary Process. The University of Chicago Press. Chicago. 375pp.
- Whitkus, R., J. Doebley y J. Wendel. 1994. En: Phillips, R.L.y Vasil, I.K (eds.). DNA-based markers in plants. pp116-141. Kluwer Academic Publishers. Norwega.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. Iivak, J. A. Rafalski, y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18:6531-6535
- Williams, S.M., R.W. DeBry y J.L.Feder. 1988. A commentary on the use of ribosomal DNA in systematic studies. *Syst. Zool.* 37(1):60-62
- Wilson, R., R. Wheatcroft, J.D. Miller y N. J. Whitney. 1994. Genetic diversity among natural populations of endophytic *Lophodermyium pinastri* from *Pinus resinosa*. *Mycol. Res.* 98(7):740-744
- Wood, I. 1990. Plant fungus keeps its host in good health. *New scientist*. 1990:27-29
- Xu, J., J.Yoell y J. Anderson.1994. An efficient protocol for isolating DNA from higher fungi. *Trends in Genetics*. 10(7):226-227.
- Zar, J. H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. Londres. 620p.

Apéndice I

"MAXI-PREP"

- 1-Moler en un mortero 10g de acúculas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
- 2-Vaciar en un matraz el polvo junto con 30ml de buffer de extracción (BSA 0.1%, Sorbitol 0.35M, Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 5mM, PEG (3350) 10% y 2-ME 0.5%) y moler con una licuadora de mano o con polytron.
- 3-Dejar reposar durante 10 minutos a 4°C.
- 5-Filtrar todo a través de una gasa de cuatro capas y un papel filtro, con ayuda del vacío, y depositar el líquido en tubos para centrifuga de 50ml.
- 6-Centrifugar a 9000 RPM a 4°C durante 10 minutos. Los tubos se deben nivelar por pares con buffer agua destilada.
- 7-Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado con buffer de lavado (Sorbitol 0.35M, Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 25mM y 2-ME 0.1%) con ayuda de una varilla de vidrio.
- 8- Agregar 1/5 del volumen final (2ml aprox.) de Sarcosil 5% y agitar vigorosamente. Dejar reposar durante 15 minutos en agua a temperatura ambiente.
- 9-Añadir 1/7 del volumen final de cloruro de sodio 5M y agitar vigorosamente.
- 10-Agregar 1/10 del volumen final de CTAB 2% y agitar. Incubar en agua a 60°C durante 10 minutos.
- 11-Añadir una solución de cloroformo-octanol 24:1 hasta tener de 30 a 35ml de solución y agitar vigorosamente.
- 12-Balnear los tubos por pares para la centrifugación, mediante la solución de cloroformo-octanol y centrifugar a 6500 RPM a 4°C de 10 a 20 minutos (hasta clarear el sobrenadante).
- 13-Trasladar el sobrenadante a otro tubo de 50ml y se agregan 2/3 del volumen final de isopropanol frío.
- 14-Agitar por inversión suavemente hasta precipitar el DNA.
- 15-Transferir el precipitado, con ayuda de una pipeta pasteur, a un tubo eppendorf de 1.5ml, que contenga 250µl de una solución de etanol 76% y acetato de amonio 10mM. Dejar reposar de 10 minutos a 12 horas.
- 16-Eliminar toda la solución mediante el uso de una micropipeta y dejar secar el precipitado durante una hora.
- 17- Añadir de 800 a 1000µl de TE 1X para disolver el DNA.

PROTOCOLO PARA LA 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 100 μ l (1/2 Vf) de acetato de amonio 7.5M frío. Colocar a 4°C por 15 minutos con agitaciones ocasionales.
- 3- Centrifugar a 10K durante 10 minutos y recuperar el sobrenadante.
- 4- Agregar 2-2 1/2 Vf de etanol 95% para precipitar el DNA.
- 5- Centrifugar a 8 500 RPM por 4 1/2 minutos y eliminar el sobrenadante.
- 6- Lavar el precipitado con el tubo lleno de etanol al 70% para remover el acetato de amonio. Repetir.
- 7- Centrifugar a 6K durante 4 minutos y eliminar el alcohol. Secar el DNA con los tubos abiertos a 37°C o en una cámara de flujo laminar.
- 8- Resuspender en 200ml de TE 1X.

Apéndice II

MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS ENDÓFITOS

Medio

	1000ml	700ml	
Solución de sales 20X	50 ml	35ml	
Elementos traza	1 ml	0.7ml	
D-Glucosa	10g	7g	
Agar	12.5g	8.75g	
Extracto de levadura	1g	0.7g	
Extracto de malta	2g	1.4g	

1.- Solución de sales 20X.

En medio litro de ddH₂O añadir una a una las siguientes sales, esperando que se disuelva la anterior para agregar la siguiente. Una vez disueltas las sales se afora a 1 litro.

Guardar a temperatura ambiente.

NaNO ₃	120g
KCl	10.4g
MgSO ₄ •7H ₂ O	10.4g
KH ₂ PO ₄	30.4g

2.- Elementos traza

Añadir los sólidos en orden a 80 ml de ddH₂O, disolviendo completamente uno antes de añadir el siguiente. Calentar la solución hasta hervir y enfriar a 60°C inmediatamente enfriar a temperatura ambiente y ajustar el volumen a 100 ml con ddH₂O.

Ajustar el pH a 6.5

ZnSO ₄ •7H ₂ O	2.2g
H ₃ BO ₃	1.1g
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.5g
Fe SO ₄ •7H ₂ O	0.5g
CoCl ₂ •5H ₂ O	0.16g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.16g

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	0.11g
Na ₄ EDTA	5.0g

3.- Aforar todos los ingredientes a 1 litro o 700ml de ddH₂O y esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

No intentar ajustar el pH del medio con el agar incluido

Agregar el antibiótico cuando el medio no este muy caliente.

4.-Antibióticos

Antibiótico	Disolver en:	[] de Stock (mg/ml)	[] de Trabajo (µg/ml)	700 ml (µl/ml medio)
Ampicilina	Etanol 70% (en H ₂ O estéril)	40	50	875
Cloranfenicol	Metanol o Etanol absoluto	10	10	700
Tetraciclina	H ₂ O estéril	10	10	700

Agitar el medio sin hacer burbujas antes de vaciarlo en cajas de petri.

Para el medio de cultivo líquido se usan los mismos reactivos y las mismas concentraciones, pero no se agrega agar.

Apéndice III.

PROTOCOLO PARA LA PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE REAMPLIFICACION

1. Preparar un gel de agarosa/TBE 0.5X (Tris-Borato 45mM, EDTA 1mM) 1% teñido con 10µl de bromuro de etidio 10mg/ml.
2. Correr 20µl del producto de PCR a purificar a 80 V durante 2 horas aproximadamente.
3. En un transiluminador de luz ultravioleta seleccionar la banda a purificar y tomar con una micropipeta 3 a 5µl de muestra.
4. La muestra tomada del gel es utilizada como sustrato para una amplificación mediante la PCR, siguiendo el mismo protocolo usado en la primera amplificación.
Para la reamplificación es recomendable modificar el programa de PCR, haciéndolo mas específico. Por ejemplo, reduciendo el número de ciclos y la temperatura de alineación.
5. Precipitar el producto con 2 1/2 de etanol absoluto helado y centrifugar a 13 000 rpm durante 30 minutos y eliminar el sobrenadante.
6. Limpiar el precipitado con etanol 70% y centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado.
7. Resuspender en 20µl de agua destilada estéril o en TE IX.

PROTOCOLO PARA LA PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE EL PAQUETE DE QUIA GEN

1. Preparar un gel de agarosa/TBE 0.5X (Tris-Borato 45mM, EDTA 1mM) 1.2% teñido con 10 µl de bromuro de etidio 10mg/ml.
2. Correr todo el producto de PCR a purificar a 80 V durante 2 horas aproximadamente.
3. Con una navaja cortar completa la banda seleccionada a purificar en el transiluminador de luz ultravioleta.
4. Pesar el segmento de agarosa cortado y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5ml. El segmento cortado debe pesar como mínimo 400 mg.
5. Tomando en cuenta que 100 mg $\approx$ 100 µl, añadir 3 volúmenes del buffer QXI a un volumen de gel.
6. Incubar a 50°C durante 10 minutos para disolver el gel.
7. Añadir lo correspondiente a un volumen del gel de isopropanol frío.
8. Con papel, medir el pH y si es mayor de 7.5, reducirlo con acetato de sodio 3M pH 5.
9. Colocar toda la muestra en la columna superior y centrifugar a 10 000 g.

10. Eliminar el contenido de la columna inferior y montar nuevamente bajo la columna superior.
11. Lavar con 0.75 ml de buffer PE el tubo superior y centrifugar a 10 000 g durante 1 minuto. Eliminar el líquido de la columna inferior.
12. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto y colocar la columna superior en tubo eppendorf limpio y sin tapa.
13. Agregar 50 µl de TE 1X o agua bidestilada estéril y centrifugar a máxima velocidad, un minuto. Este paso se puede repetir agregando 20 µl más y volviendo a centrifugar.

Apéndice IV

Tabla de composición nucleotídica para el ITS por especie.
Todos los valores están dados en porcentajes, exceptuando el total.

Especie	A	T	C	G	Total
<i>P. rzedowskii</i>	22.1	27.3	26.8	23.8	466
<i>P. pseudostrobus</i>	35.8	13.9	27.3	23.0	374
<i>P. maximiloi</i>	23.4	29.7	27.0	19.9	381
<i>P. gregii</i>	22.2	29.1	24.4	24.4	464
<i>P. durangensis</i>	23.6	28.5	24.3	23.6	478
<i>P. halepensis</i>	22.1	29.6	24.8	23.5	476
<i>P. flexilis</i>	24.2	29.8	22.2	23.8	483
<i>P. culminicola1</i>	24.6	24.8	24.6	26.1	464
<i>P. arizonica</i>	21.3	25.8	26.7	26.2	431
<i>P. catarinae</i>	25.1	28.0	23.8	23.1	550
<i>P. herrevii</i>	22.7	26.3	22.4	28.5	585
<i>P. michoacana</i>	23.1	24.3	30.6	22.0	633
<i>P. maximartinezii</i>	25.5	26.4	23.3	24.8	455
<i>Tricophyton</i>	24.9	21.9	27.4	25.7	470
<i>Verticillium</i>	21.5	25.	29.0	23.9	451
<i>Fussarium</i>	26.9	24.6	25.8	22.7	516
<i>Alternaria</i>	24.4	29.1	23.5	23.1	550
<i>Penicillium</i>	17.6	24.9	28.4	29.2	518
<i>P. lagunae1</i>	24.2	26.1	23.3	26.5	533
<i>P. pinceana</i>	21.6	25.9	25.9	26.7	529
<i>P. quadrifolia</i>	25.0	24.8	26.3	23.9	476
<i>P. oaxacana</i>	20.4	27.1	30.9	21.6	476
<i>P. edulis</i>	20.7	22.2	30.3	26.8	482
<i>P. johannis</i>	20.8	26.9	24.8	27.5	499
<i>P. culminicola2</i>	25.1	23.5	26.4	25.1	443
<i>P. lagunae2</i>	25.0	25.6	22.0	27.3	523
<i>P. discolor</i>	20.6	27.2	27.4	24.8	540
<i>P. cembroides</i>	24.2	27.5	23.7	24.6	472
<i>Gibberella</i>	25.2	23.0	28.8	23.0	473
<i>Lophodermium</i>	27.3	29.7	24.2	18.8	130
Total	23.5	26.0	25.9	24.7	14319

Apéndice VI

Mini-prep for easy DNA extraction of conifer species

A. Vázquez Lobo, S. Ortiz, E. R. Alvarez-Buylla

* Laboratorio de Genética Molecular y Evolución,
Centro de Ecología, UNAM.

Research in molecular phylogenetics and intraspecific variation often requires fast and efficient extraction of high quality genomic DNA, from a large number of samples. In ceceplants that produce secondary compounds, DNA extraction is notoriously difficult since polysaccharides and polyphenols form insoluble complexes with nucleic acids once the cell is disrupted (Milligan, 1992). Cesium chloride gradients can solve this problem (Taylor *et al.*, 1993) but are expensive and time-consuming. Furthermore, DNA extraction in some gymnosperms is troublesome because of hard, rough cell walls. In particular, *Pinus* needle leaves exhibit striking xerophytic attributes. The leaf surface is covered by a heavily culinized epidermis within which there are one or more thick-walled hypodermal layers, and the mesophyll is compact, with few air spaces between cells. Protocols for gymnosperm DNA isolation are thus cumbersome, requiring large amounts of tissue and involving several steps, with the consequent mounting of time and expenses.

We report an easy and inexpensive DNA isolation protocol (modified from Murray and Thompson 1980) to obtain genomic DNA from very small quantities of needle and seed tissues of pines. DNA isolated by this method has been used in PCR amplification, and random amplified polymorphic DNA (RAPD) with excellent results.

Few needles (preferably fresh) are grinded with liquid N₂ in a micromortar until tissue is powdered. A spatula-tip of nitrogen powdered tissue is added to other micromortar with 1 µl of CTAB 2X extraction buffer (100mM Tris-HCl pH 8, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, CTAB 2% and 0.3% b-ME). Grind with micropestle until sample flows smoothly. Transfer all the product to labeled Eppendorf tube. Spin at 10K for 8-10 minutes. Pour off supernatant and resuspend pellet in 600µl extraction buffer. Place in 60°C water bath for 10 minutes. Add an equal volume of chloroform-octanol (24:1 v/v) and mix vigorously. Spin at 7K for 10-15 minute until the supernatant is clear. Remove upper aqueous phase (600 ml) and transfer to a new tube. Add 2/3 volume of ice cold isopropanol and mix

several times by inversion; store as -20°C for at least 30 minutes or overnight to increase precipitation. Spin at 9K for 5 minutes and pour off supernatant. Pellet is washed with full tube of 70% EtOH to remove chloroform-octanol. Resuspend pellet in 200µl TE (10mM Tris-HCl pH8, EDTA 1mM).

Aknowledgments.

We thank to Adrian Quijada, Rosalinda Tapia, Angeles Cortez and Rodolfo Salas for their comments and helping.

References

- Milligan, B.G. 1992. in *Molecular genetic analysis of populations*. (ed. A.R. Hoelzel). Oxford University Press, New York. 59-88p.
- Murray , M.G. and W.F.Thompson. 1980. Rapid isolation of high weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321-4325
- Taylor B.H., J.R. Manhart and R. M. Amasino. 1993. in *Method in plant molecular biology and biotechnology*. R.B Click and J.E. Thompson, eds. pp37-47. CRC press. London.360p