

03058  
4  
22j



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE ECOLOGIA

EVOLUCION Y FILOGENIA EN PINOS  
Y SUS HONGOS ENDOFITOS:  
ASPECTOS SISTEMATICOS DE LA COESPECIACION

T E S I S

Que para obtener el grado de  
DOCTOR EN ECOLOGIA

presenta:

SOL ORTIZ GARCIA

Directora de Tesis: Maria Elena Alvarez-Buylla Rocas

México, D. F.

1999  
272865

TESIS CON  
FALLA DE ORIENTE



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.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
PRESENTACIÓN .....	vi

### CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....1

1.1 Resumen	
1.2 Historia de las interacciones planta - hongo.	
1.3 El proceso Coevolutivo	
1.4 El enfoque filogenético.	
1.4.1 El método cladista y la inferencia de filogenias	
1.5 El sistema de estudio	
1.5.1 <i>Pinus</i> Linneo	
1.5.2 <i>Lophodermium</i> Chevalier	
1.6 Referencias bibliográficas	

### CAPÍTULO II: INTEGRATING MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DATA FOR PHYLOGENETIC RECONSTRUCTIONS IN *Pinus* (PINACEAE).....37

2.1 Abstract	
2.2 Introduction	
2.3 Materials and methods	
2.4 Results	
2.5 Discussion	
2.6 Literature cited	
2.7 Appendix	
2.8 Acknowledgments	

TABLA DE CONTENIDO (continuación)

CAPÍTULO III. MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES AMONG PINE  
*Lophodermium* FUNGI AND RELATED GENERA.....88

3.1 Abstract

3.2 Introduction

3.3 Materials and Methods

3.4 Results

3.5 Discussion

3.6 Literature cited

3.7 Acknowledgments

CAPÍTULO IV. COMPARACIÓN DE FILOGENIAS ENTRE *Lophodermium* Y  
*Pinus*. EL PAPEL RELATIVO DE LA COESPECIACIÓN, EL CAMBIO DE  
HOSPEDERO Y LA DISOCIACIÓN EN LA EVOLUCIÓN DE *Lophodermium* EN  
PINOS.....126

4.1 Resumen

4.2 Introducción

4.3 Materiales y Método

4.4 Resultados

4.5 Discusión

4.6 Referencias bibliográficas

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....152

BIBLIOGRAFÍA.....155

APÉNDICE.....174

AGRADECIMIENTOS .....176

## RESUMEN

Existen diferentes enfoques para el estudio de las asociaciones simbióticas. En esta tesis se presenta un análisis de una interacción planta-hongo mediante el uso de la inferencia filogenética. El sistema de estudio comprende al género *Lophodermium* (Rhytismataceae), que incluye en su mayoría hongos endófitos; y sus árboles hospederos del género *Pinus* (Pinaceae). El enfoque histórico utilizado para el estudio de esta interacción involucra tres etapas: la reconstrucción independiente de hipótesis filogenéticas para ambos linajes, la comparación formal de dichas filogenias y la estimación de la divergencia. Se llevó a cabo la reconstrucción filogenética de 46 especies de pinos y dos especies de Pináceas como grupo externo (*Cathaya* y *Piceae*). Se evaluaron los efectos de ordenar y pesar caracteres morfológicos sobre la estimación filogenética. Se llevaron a cabo análisis separados y combinados de caracteres morfológicos y moleculares. La hipótesis generada a partir de utilizar toda la evidencia disponible presentó mayor resolución que las reconstrucciones independientes y además apoyó varios grupos monofiléticos aceptados en revisiones recientes del grupo. El uso de análisis separados y combinados permitió, además de explorar niveles de congruencia entre diferentes grupos de datos, precisar posibles fuentes de conflicto. La incongruencia en reconstrucciones independientes en las relaciones de especies de la subsección *Cembrae* se explica como producto de evolución convergente asociada a la dispersión de semillas por pájaros. Los análisis de reconstrucción filogenética de *Lophodermium* y especies relacionadas mostraron que varios caracteres morfológicos utilizados para la delimitación de especies no definen grupos monofiléticos. Todas las especies de *Lophodermium* en pinos formaron un grupo monofilético que incluye a dos especies, también con hospederos pinos, segregadas en otros géneros (*Meloderma desmazierei* y *Elytroderma deformans*). Con base en estos resultados, se evidenció el escaso valor taxonómico de caracteres morfológicos, como la forma de la ascospora, para establecer grupos monofiléticos en la familia Rhytismataceae. La posición de tres hongos patógenos de pinos en la filogenia obtenida, sugiere que la patogenicidad ha evolucionado más de una vez de manera independiente en este linaje y que el endofitismo es la condición ecológica ancestral del grupo. La comparación de las hipótesis filogenéticas de *Lophodermium* y pinos mediante la reconstrucción de asociaciones, reveló la presencia de eventos de

especiación conjunta. Sin embargo, existen altos niveles de incongruencia entre filogenias, debido a eventos de especiación independiente de los hongos y a frecuentes cambios de hospedero. El patrón descubierto posiblemente se debe al mecanismo de transferencia horizontal de estos hongos que facilita los cambios de hospedero, y a la eventual divergencia de linajes de hongos endófitos en respuesta a variación poblacional en la composición química de algunas especies de pinos hospederos.

## ABSTRACT.

There are different approaches for the study of symbiotic associations. In this thesis we analyzed a plant- fungus interaction using phylogenetic inference. The study system includes endophytic fungi from the genus *Lophodermium* (Rhytismataceae) and their pine hosts in the genus *Pinus* (Pinaceae). The historical approach used in the study of this interaction involves three steps: independent tree building for each associated lineage, phylogenetic comparisons and estimation of divergence. Phylogenetic analyses were performed for 46 pine species with *Picea* and *Cathartaya* as outgroups. The effect of different character weighting and ordering strategies for morphological characters on phylogenetic reconstructions was evaluated. Independent and combined phylogenetic analyses were done for molecular and morphological data sets. The combined phylogenetic hypothesis showed higher resolution than independent phylogenies and many monophyletic groups accepted in recent taxonomic treatments of the genus were supported. This analytical approach allowed us to explore levels of incongruence and to established possible sources of conflict. Incongruence between independent phylogenetic hypotheses for species in subsection *Cembrae* may be due to convergent evolution associated to bird dispersal of seeds. Phylogenetic reconstructions of *Lophodermium* species and related genera, showed high levels of homoplasy in traditional morphological characters. All *Lophodermium* species with pine hosts formed a monophyletic group that included two species from other genera (*Meloderma desmazierei* and *Elytroderma deformans*), also with pine hosts. Based on this results, the poor taxonomic value of ascospore shape as a character for delineating monophyletic groups in the family Rhytismataceae was evidenced. Three pathogenic species, showed evidence for multiple origins of pathogenicity in the pine *Lophodermium* clade, and their position suggested that endophytism is the ancestral ecological condition. The comparison of phylogenetic hypotheses between *Lophodermium* and pines by association reconstruction revealed parallel speciation. Nevertheless, high levels of incongruence were observed, due to independent speciation within the fungi and host switching. Low phylogenetic congruence may be due to horizontal transfer mechanisms that facilitate host switching, and to eventual fungal lineage divergence associated with population variation of secondary compounds in pine hosts species.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Posibles patrones filogenéticos entre linajes de simbioses.....	5
Figura 2.1. Strict consensus of 144 equally parsimonious trees obtained from the ITS data set .....	50
Figura 2.2. Strict consensus tree of 24 equally parsimonious trees obtained from the morphological data set .....	54
Figura 2.3. Strict consensus tree of 24 equally parsimonious trees obtained from the combined data set .....	59
Figura 3.1. One of eight most parsimonious trees obtained from parsimony analysis for <i>Lophodermium</i> isolates and related genera.....	106
Figura 3.2. Strict consensus tree of eight equally parsimonious trees for <i>Lophodermium</i> isolates and related genera.....	101
Figura 4.1. Comparación hipótesis filogenéticas de 14 especies de pináceas y sus hongos asociados.....	138
Figura 4.2. Mapa de las reconstrucciones filogenéticas de 14 especies de pináceas y sus hongos asociados.....	140
Figura 4.3. Comparación de filogenias de 8 especies de pinos y sus hongos asociados.....	143
Figura 4.4. Mapa de las reconstrucciones filogenéticas de 9 especies de pináceas y sus hongos asociados.....	145



## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Sampled pine species and out groups.....	41
Tabla 2.2. Statistical information for <i>Pinus</i> phylogenetic reconstructions obtained from the different data sets .....	46
Tabla 2.3. Results of constraint analyses.....	56
Tabla 2.4. Summary of Subsection relationships in strict consensus cladogram topologies.....	61
Tabla 2.5. Results from the Templeton test.....	63
Tabla 3.1. Taxa included in the phylogenetic analysis.....	94
Tabla 3.2. Selected characters and character states analyzed on the phylogenetic reconstructions.....	98
Tabla 3.3. Morphological data matrix for 33 isolates.....	100
Tabla 3.4. Sequence characteristics of the ITS region.....	103
Tabla 4.1. Aislados de hongos de la familia Rhytismataceae, incluidos en cada uno de los dos análisis filogenéticos.....	133
Tabla 4.2. Especies de pinos incluidas en cada uno de los dos análisis de reconstrucción filogenética.....	134

## PRESENTACIÓN

El presente trabajo de tesis forma parte del programa de investigación desarrollado para entender la evolución y la diversidad de los pinos mexicanos. Este esfuerzo se efectúa de manera conjunta en el laboratorio de Genética y Evolución, a cargo del Dr. Daniel Piñero, y en el laboratorio de Genética Molecular y Evolución, a cargo de la Dra. Elena Álvarez-Buylla. En particular esta tesis contribuye al Proyecto titulado "Filogenia molecular y especificidad de hongos endófitos en el género *Pinus* L." propuesto por Álvarez-Buylla y Espinosa-García (1995). Este proyecto surge de la observación de patrones congruentes entre la filogenia de especies de *Picea*, obtenida con base en análisis de fragmentos de restricción de DNA de cloroplasto (Sigurgeisson y Smidt, 1993) y la filogenia de hongos endófitos asociados obtenida del análisis de secuencias de la región ITS y la subunidad 18S del DNA ribosomal de núcleo (Smith y Klein, 1994). El análisis de estas secuencias, que se suponía eran de especies de *Picea*, y que en realidad corresponden a hongos ascomicetos filamentosos (Liston y Álvarez-Buylla, 1995), sugirió una historia de especiación paralela entre estos organismos y sus hospederos.

En este trabajo se explora la dinámica histórica de la asociación de hongos endófitos del género *Lophodermium* y sus pinos hospederos, mediante el uso de métodos analíticos de inferencia filogenética. En el primer capítulo de esta tesis se describe el contexto dentro del cual se desarrolla esta investigación, así como los métodos utilizados y los organismos que constituyen el sistema de estudio. En el segundo capítulo se presenta la reconstrucción filogenética para los hospederos del género *Pinus*. El tercer capítulo presenta la inferencia filogenética de los hongos endófitos y el cuarto capítulo corresponde a la comparación de las hipótesis filogenéticas de ambos linajes. El último capítulo describe brevemente algunas conclusiones generales y las perspectivas del trabajo.

Otros trabajos desarrollados como parte del proyecto general y que también contribuyen al conocimiento de este sistema son: "Filogenia de hongos endófitos en el género *Pinus* L. : implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares" elaborado por Alejandra Vázquez Lobo (1996) y "La inferencia filogenética como una aproximación a la historia natural del género de hongos endófitos *Lophodermium* Chev.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 1.1 Resumen

En este capítulo se presenta una revisión de la literatura concerniente al estudio de las asociaciones simbióticas, particularmente para interacciones planta-hongo. Se fundamenta además, el enfoque utilizado para generar evidencia de asociaciones por descendencia entre hospederos pinos y sus hongos endófitos. También se describen de manera general los métodos de reconstrucción filogenética así como las estrategias de búsqueda utilizados en este trabajo. Por último se incluye una revisión de los aspectos relevantes del sistema de estudio: hongos ascomicetos en su mayoría endófitos, del género *Lophodermium* Chev. (Rhytismataceae) y sus árboles hospederos del género *Pinus* L. (Pinaceae).

### 1.2 Historia de las interacciones planta - hongo.

La simbiosis puede ser definida como la interacción de dos o más organismos en asociación íntima (Margulis y Schwartz 1981). Esta definición comprende todo un espectro de asociaciones, desde aquellas en las que un miembro de la interacción es totalmente dependiente del otro para su existencia y además éste causa un daño cuantificable al otro miembro (parasitismo), hasta aquellas en las que ambos simbiosiontes no pueden existir en la ausencia del otro (mutualismo obligado) (Futuyma y Slatkin 1983). Las plantas y los hongos presentan un amplio rango de asociaciones simbióticas que constituyen sistemas útiles para estudiar dinámicas de coadaptación, coespeciación, evolución de la especialización y coevolución, entre especies que pertenecen a *Phyla* muy lejanos y con niveles de complejidad muy contrastantes. El estudio de las interacciones hongo-planta es importante también para entender la evolución de los mecanismos de reconocimiento, resistencia y la evolución de la patogenicidad. Finalmente el estudio de estas interacciones puede cobrar relevancia

aplicada al campo de prevención y manejo de plagas de hongos, en sistemas forestales así como en el desarrollo de estrategias de control biológico.

La gran mayoría de las especies de hongos dependen de las plantas vasculares para su existencia ya que obtienen carbohidratos y otros nutrientes imprescindibles directa o indirectamente de éstas. Este es el caso tanto de hongos en asociaciones antagonistas como mutualistas, así como en los hongos que intervienen en el proceso de descomposición y que obtienen sus nutrientes de tejidos muertos (Cannon y Hawksworth 1995). Estas interacciones tienen una amplia distribución geográfica así como temporal. Pese a la dificultad de identificar caracteres diagnósticos en fósiles, existe evidencia de que existen hongos ascomicetos desde el Paleozoico, en el Silúrico tardío (Taylor 1994). La interacción entre micorrizas simbiotes y plantas es considerada entre las interacciones ecológicas más importantes ya que determinan la biodiversidad, la variación y la productividad de un ecosistema (Van der Heijden et al. 1998). Existe evidencia fósil de que las micorrizas vesículo - arbusculares (VAM) estaban bien establecidas desde el Mesozoico temprano (215 ma); (Stubblefield y Taylor, 1983). La reevaluación de fósiles de plantas primitivas del Devónico (410-360 m.a.) sugiere que éstas pudieron haber estado asociadas desde entonces con hongos micorrízicos (Pirozynski y Dalpe 1989 en Taylor 1990). Simon et al. (1993) estimaron tiempos de origen y divergencia de hongos VAM mediante la alineación de secuencias de la subunidad pequeña de genes ribosomales. Estimaron que estos hongos micorrízicos se originaron hace 462 a 353 millones de años. Esto es consistente con evidencia del registro fósil y apoya la hipótesis de que los hongos simbióticos fueron de crucial importancia durante la colonización del ambiente terrestre por las plantas primitivas. Además, existen fósiles que evidencian interacciones saprofiticas y parasíticas entre hongos y plantas, que datan del Pérmico y del Carbonífero Superior respectivamente (Taylor 1990). Las interacciones simbióticas entre plantas y hongos han evolucionado y se han mantenido durante periodos de tiempo tan largos que permiten establecer el escenario evolutivo indispensable para que ocurra especialización entre los simbiotes, coadaptación, asociaciones por descendencia y especiación paralela, aspectos que constituyen parte del proceso coevolutivo.

### 1.3 La Coevolución

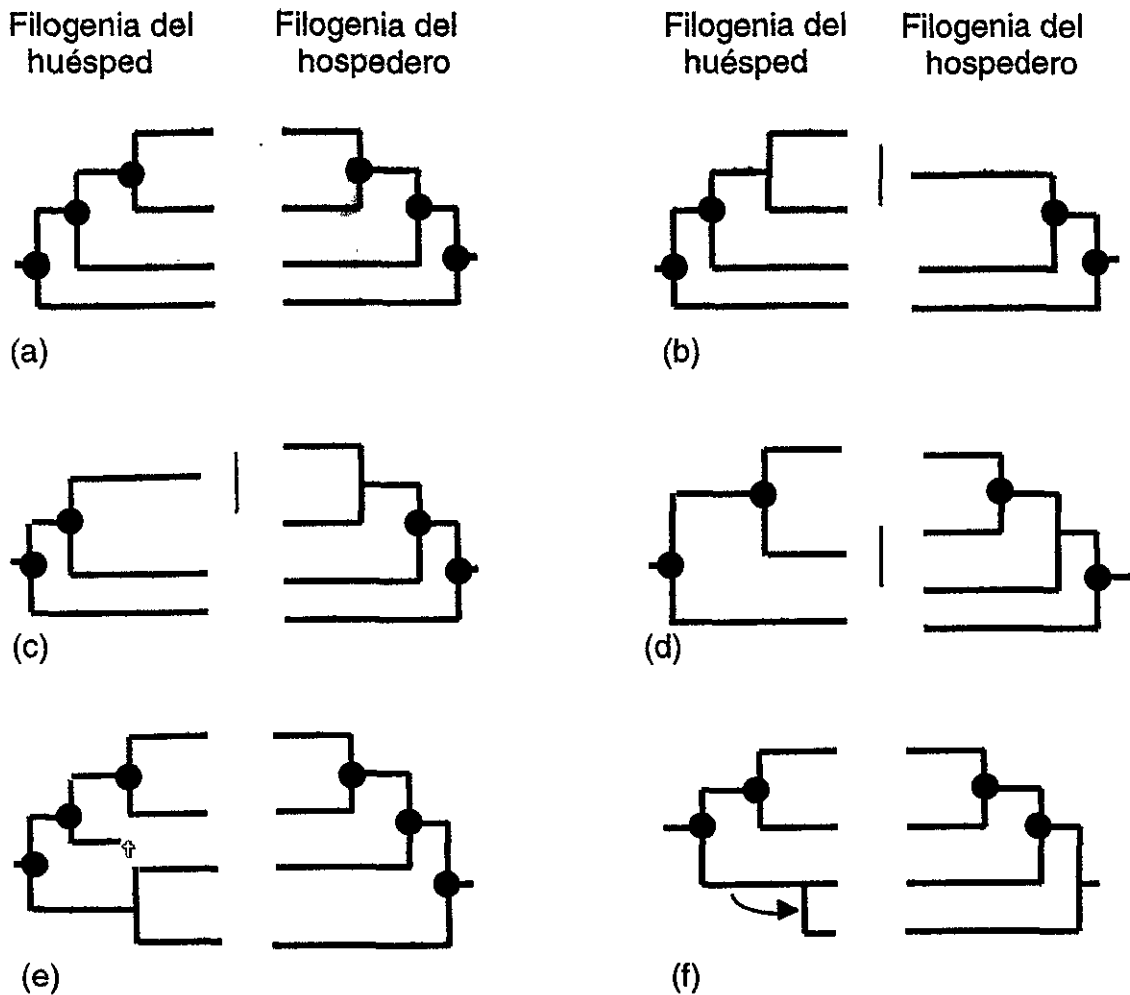
El concepto de coevolución ha sido interpretado de diferentes maneras desde que fue propuesto por Erlich y Raven (1964). Esto se debe a que ha cambiado la percepción y la manera de estudiar los procesos y los mecanismos involucrados en generar cambio evolutivo recíproco, y además a que el estudio de la coevolución puede llevarse a cabo desde distintos enfoques (Thompson 1989).

En principio, es relativamente sencillo demostrar adaptación de una especie a un rasgo particular de otra. Sin embargo, la demostración de que existe coevolución pareada es más difícil, ya que se tiene que mostrar que dos o más especies evolucionaron una en respuesta de la otra (Futuyma y Slatkin 1983). Existen diversos enfoques para estudiar el fenómeno coevolutivo. En el enfoque matemático se utilizan modelos que muestran que los patrones de interacción observados entre especies pueden ser resultado de procesos coevolutivos. Sin embargo, la consistencia en un modelo matemático no prueba la existencia de la coevolución. La observación directa de cambios genéticos en respuesta a la interacción, es un enfoque que nos proporciona evidencia de que la coevolución es posible, sin embargo este enfoque está limitado a sistemas con tiempos de generación relativamente cortos, y aunque nos informa que la coevolución es posible no nos indica qué tan comúnmente ocurre en la naturaleza ni su duración real. El registro fósil puede proporcionar evidencia de coevolución en escalas de tiempo mucho mayores que las de estudios experimentales. Aunque el registro fósil pocas veces es suficientemente completo, es una fuente de evidencia para estimar la importancia macroevolutiva de la coevolución. El análisis meticuloso de caracteres únicos o especiales en cada una de las especies interactuantes, puede mostrar que estos caracteres son adaptaciones de una especie a otra, y proporcionar evidencia indirecta de coevolución (Futuyma y Slatkin 1983). Otro enfoque alternativo para el estudio de la coevolución en donde ocurre especiación, involucra la comparación de los patrones filogenéticos entre los grupos de linajes interactuantes. La congruencia entre filogenias proporciona evidencia, desde una perspectiva histórica, de procesos de coespeciación conjunta y por lo tanto de posible coevolución (Fig1 a). La cladogénesis paralela indica que los simbiosistas han

permanecido asociados durante periodos de tiempo tan largos que la asociación de ambos linajes se ha mantenido incluso durante procesos de especiación hasta la actualidad. Sin embargo, no necesariamente demuestra que uno haya sido la causa de la especiación del otro y viceversa. Una incongruencia en los patrones filogenéticos indica eventos de especiación independientes (Fig1b,c), especiación conjunta posterior a un evento de especiación independiente (Fig1d), posibles extinciones o pérdida de la asociación (Fig1e), o bien asociación por colonización, es decir, cambios de hospedero (Fig1f). Evidencia de coevolución generada mediante distintos enfoques y en varios grupos de linajes, puede integrar la prueba última de su existencia e importancia en la naturaleza.

#### **1.4 El enfoque filogenético**

El enfoque filogenético para el estudio de la coevolución involucra dos pasos. El primero es establecer de manera independiente las relaciones filogenéticas de los simbioses. El segundo consiste en comparar las filogenias de ambos grupos de simbioses y establecer el grado de congruencia entre éstas (Barret 1986). El estudio del origen y la evolución de asociaciones entre plantas y hongos se ha enfrentado con varios problemas. Se requiere entender el origen, evolución y taxonomía de los hongos asociados. Un impedimento mayor para establecer clasificaciones que reflejen relaciones filogenéticas para la mayoría de los hongos y en particular para los ascomicetos filamentosos, radica en la dificultad de diferenciar convergencia de homología en caracteres morfológicos (Samuels y Seifert 1995) y poder establecer homologías primarias. Los caracteres moleculares ofrecen datos independientes de la morfología y por lo tanto son útiles para evaluar homología *versus* convergencia de la forma. Otro problema consiste en establecer si existe especificidad de hospedero. Los aislados de hongos idénticos o casi idénticos que se encuentran en diferentes géneros o especies de hospederos se consideran poco específicos. Sin embargo, linajes en diferentes especies o géneros de plantas hospederas pueden presentar aislamiento reproductivo o niveles de variación molecular correspondientes a especies distintas. Los datos provenientes de DNA son también una herramienta importante para



**Figura 1.1.** Posibles patrones filogenéticos entre linajes de simbioses. Los eventos de coespeciación se ilustran con un círculo negro (●). (a) cladogénesis paralela, congruencia de filogenias, (b) especiación independiente del huésped, (c) especiación independiente del hospedero, (d) coespeciación de huésped y hospedero subsecuente a un evento de especiación independiente del hospedero, (e) especiación independiente seguida de la pérdida de los huéspedes, (f) colonización de nuevo hospedero (Modificado de Page 1994).

reconocer y caracterizar especies en grupos en donde la identificación es difícil, y así establecer rangos reales de colonización de hospederos.

Además del reciente auge de la sistemática molecular, otros aspectos que han contribuido al desarrollo de la sistemática son: el perfeccionamiento de métodos objetivos con criterios explícitos para la estimación de árboles filogenéticos, la producción de nuevos y más eficientes algoritmos para inferir los árboles filogenéticos, así como la implementación de éstos en computadoras más rápidas que posibilitan el análisis de mayores y más complejos grupos de datos (Moritz y Hillis 1996).

#### 1.4.1 El método cladista y la inferencia de filogenias.

El cladismo es un método de la sistemática propuesto por Hennig en 1950 y 1960, que se utiliza para reconstruir árboles genealógicos de organismos y producir clasificaciones naturales. El cladismo o sistemática filogenética supone que todos los organismos, tanto vivos como extintos, ocupan una posición única en un árbol filogenético que se enraíza en el origen de la vida de este planeta (Brooks y McLennan 1991). El objetivo del cladismo es reconstruir cladogramas, estos diagramas de ramificación muestran las relaciones genealógicas entre especies o taxa terminales (Minelli 1993). Además, pueden ser la base para asociar los caracteres y las transformaciones de los estados de carácter a las ramas en donde se originaron.

En términos generales, Hennig propone que la filogenia de los organismos puede ser reconstruida si se investigan caracteres individuales y luego la información de cada carácter se combina de acuerdo a un grupo de reglas establecidas. La regla conocida como regla de agrupamiento establece que solamente las sinapomorfías, o caracteres derivados compartidos proporcionan evidencia de relaciones ancestro-descendiente, es decir de ancestría común. Pero las simplesiomorfías, caracteres ancestrales compartidos, así como las convergencias o paralelismos son inútiles para este propósito (Brooks y McLennan 1991). Sin embargo, no se requiere conocer *a priori* si el carácter es homólogo o si el carácter es homoplásico, ya que el principio auxiliar de Hennig establece que se debe suponer homología en ausencia de evidencia contraria. Este principio es un recurso útil para llevar a cabo la reconstrucción del



cladograma que ilustra la serie de transformación de estados de carácter. Para ésto, se recurre la regla de inclusión / exclusión, que establece que la información de dos series de transformación puede ser combinada en una sola hipótesis de relación si la información permite la completa inclusión o la completa exclusión de los grupos que se formaron con las series de transformación por separado. Cuando los grupos se sobrelapan, se generan dos o más hipótesis de relaciones de parentesco debido a que la información no puede ser combinada directamente en una sola hipótesis. En los casos en los que diferentes series de transformación proporcionen evidencia contradictoria de las relaciones filogenéticas de los taxa en estudio, se recurre a un criterio para resolver el conflicto. El criterio utilizado es el de máxima parsimonia, que indica que dadas varias soluciones, la que debe preferirse sobre las otras es la más simple. El criterio de parsimonia maximiza la congruencia entre caracteres, ya que al seleccionar el árbol con el menor número de pasos se obtiene el árbol que incluye el mayor número de homologías y el menor número de homoplasias.

El método cladista en términos prácticos, al igual que otros métodos de reconstrucción filogenética, inicia con la selección de los taxa a estudiar y la obtención y construcción de una matriz de datos. Para la codificación de caracteres es importante establecer lo que se conoce como homología primaria o transformacional que implica la definición de caracteres y la delimitación de los estados de cada carácter (Hawkins et al. 1997, Seitz et al. en prensa). Para matrices de caracteres morfológicos, Wiley (1981), distinguió tres criterios para la identificación de homologías: 1) criterio de similitud del parecido, 2) criterio de calidad de parecido o composición especial y 3) criterio de continuación de la similitud de formas a través de formas intermedias. En el caso de caracteres moleculares, por ejemplo de secuencias de nucleótidos de genes ortólogos, se establece la homología primaria mediante la alineación de cada posición de las secuencias de los diferentes taxa. La siguiente etapa del análisis cladista corresponde a encontrar el árbol que requiere del menor número de cambios para explicar los datos. Este proceso involucra tres pasos: selección del criterio de optimización para inferir el árbol, selección del algoritmo que se emplea en la búsqueda de árboles óptimos y la medida que se utiliza para evaluar el resultado.

El criterio de optimización es el que especifica las restricciones impuestas a los cambios de carácter. El criterio de optimización a utilizar se selecciona en función del modelo que se considere el más apropiado para los datos que se van a analizar. Los criterios de optimización más utilizados son: la parsimonia de Wagner para caracteres codificados de manera aditiva, o caracteres ordenados, en donde la transformación de un estado a otro también implica la transformación a través de estados intermedios. La parsimonia de Fitch que se usa para caracteres no aditivos, o no ordenados, en donde la transformación de un estado a otro es directa. La parsimonia de Dollo para datos en los que la probabilidad de una reversión (o pérdida del estado) es mucho mayor que la adquisición del estado derivado (Quicke, 1993).

El algoritmo de búsqueda del árbol óptimo se relaciona con el problema de inspeccionar todas las topologías posibles (Williams 1994) y su elección depende del número de taxa en estudio. Los métodos para encontrar árboles de longitud mínima se dividen en dos categorías: los de búsqueda exacta y los de búsqueda heurística. La búsqueda exhaustiva corresponde a los algoritmos exactos e implica la evaluación de todos los árboles de ramificación dicotómica posibles para el grupo de datos a evaluar. Mientras que el algoritmo para evaluar todos los posibles árboles dicotómicos es relativamente simple, la dificultad de este tipo de búsqueda se incrementa conforme aumenta el número de taxa. Para un análisis con 7 taxa hay 945 árboles sin raíz, este valor se incrementa a más de  $2.2 \times 10^{20}$  para el caso de 20 taxa (Felsenstein 1978). Por esta razón este tipo de búsqueda se recomienda para grupos de datos con menos de 12 taxa. Otro tipo de búsqueda exacta es el método de *branch and bound*, que no necesariamente explora todos los árboles posibles. Este método construye cada árbol añadiendo un taxón a las ramas ya conectadas, como lo hace el método exhaustivo, la diferencia consiste en que se evalúa la longitud del árbol conforme se añade cada nuevo taxón y la construcción del árbol se detiene cuando la longitud de este ha sobrepasado un límite de longitud mínima determinado con una búsqueda heurística inicial. Este método se aplica a grupos de datos de alrededor de 25 taxa (Kitching 1994). Los métodos de búsqueda heurística proceden mediante el uso de técnicas de ensayo y error, por lo tanto no garantizan que se encuentre el árbol más parsimonioso. El principio básico de estos métodos es añadir los taxa hasta obtener un árbol con

todos y después rearrreglar sus ramas en un intento de disminuir el número de pasos. Si con un cambio aumenta el número de pasos este nuevo arreglo se descarta. Si se disminuye el número de pasos este es entonces el árbol que se sigue analizando, cuando no se obtiene un árbol más corto la búsqueda termina. Las variantes de este método incluyen diferentes maneras de determinar la secuencia con la que se añaden los taxa, así como diferentes algoritmos para el rearrreglo de las ramas. Aunque estos métodos no garantizan la obtención del árbol más corto, existen algunas estrategias de búsqueda para aumentar la posibilidad de encontrarlo. Estas consisten en: realizar varias réplicas de adición de taxa en secuencias aleatorias, retener más de un árbol de longitud mínima durante la fase de intercambio de las ramas o incluso rearrreglar las ramas sobre árboles subóptimos.

Existen diversas medidas para evaluar las hipótesis filogenéticas que son resultado de los análisis de parsimonia. Las más utilizadas para describir qué tan bien el cladograma obtenido explica el conjunto de datos son: el índice de consistencia (C.I.) definido por Kluge y Farris (1969) y el índice de retención (Farris 1989). Otros procedimientos para evaluar qué tan robusta es una topología son el análisis de *bootstrap* (Felsenstein 1985) y la obtención de índices de decaimiento (Bremer 1988). El método de *bootstrap* consiste en remuestrear caracteres con reemplazo del grupo original de datos hasta que se obtiene un nuevo grupo de caracteres que contiene el número original de observaciones. Con este grupo de datos se vuelve a obtener el árbol más corto. Este procedimiento se repite al menos 100 veces y con esto se obtiene un árbol de *bootstrap* en el que se muestra la proporción en la que se obtuvo cada clado dentro de las topologías computadas. El análisis de decaimiento consiste en determinar qué tanto soporte tienen diferentes ramas de una topología obtenida, mediante la relajación sucesiva de la parsimonia. La manera de obtener estos índices es guardando árboles un paso más largos que el más parsimonioso de manera sucesiva y calcular el consenso de éstos para registrar en cuantos pasos más se colapsa un grupo monofilético.

## 1.5 El sistema de estudio

Dentro de las relaciones simbióticas que han comenzado a estudiarse en las últimas décadas, se encuentran las de hongos endófitos y sus plantas hospederas (Carroll y Carroll 1978, Petrini y Carroll 1981, Petrini y Petrini 1985, Clay 1988a). El término endófito se refiere a hongos que viven internamente y de manera asintomática en partes aéreas de plantas durante todo su ciclo de vida, o al menos parte significativa de éste. Los hongos endófitos se distinguen de los epífitos porque éstos últimos permanecen únicamente sobre la superficie del hospedero. Sin embargo, la definición de endófito incluye un amplio rango de hongos, desde patógenos y saprobios que han extendido su periodo de latencia, hasta hongos especialistas que se consideran mutualistas obligados (Saikkonen et al. 1998). En general lo que caracteriza a un hongo como endófito es que presenta un periodo de quiescencia después de la infección de su hospedero en el que se detiene su colonización (Stone y White 1999) y ésta se vuelve a iniciar con el comienzo de la senescencia de los tejidos del hospedero.

Los estudios de registros de endófitos han mostrado la existencia de una gran diversidad de especies fúngicas que habitan dentro de los tejidos de plantas sanas (i.e. Rodrigues y Samuels 1990, Fisher et al. 1995, Kowalski y Kehr 1995) y además que se encuentran prácticamente en todas las plantas en donde se han buscado (Clay 1988b, Chapela y Boddy 1988, Espinosa-García y Langenheim 1990). En el caso de los hongos endófitos de pastos se ha documentado una relación de tipo mutualista (Clay 1988a), sin embargo el papel de los endófitos en plantas leñosas es aún indeterminado. En vista de lo general que es la ocurrencia de este tipo de interacción, surgen preguntas muy importantes en torno al origen y la evolución de las relaciones entre hongos endófitos y sus plantas hospederas. Algunas de las preguntas que se pueden explorar mediante un enfoque filogenético son las siguientes: ¿existe coespeciación entre endófitos y hospederos?, ¿que tan frecuentemente han ocurrido cambios de hospedero?, ¿los hongos endófitos se originaron de ancestros patógenos?

En este trabajo seleccionamos para explorar la historia evolutiva de la asociación entre endófitos y sus hospederos al género *Pinus* (Pinaceae) y al género *Lophodermium* (Rhytismateaceae, Ascomycota).

### 1.5.1 *Pinus* Linneaus

Clasificación del género *Pinus*.

El género *Pinus* L. (Pinaceae), incluye alrededor de 110 especies, es el género más numeroso de coníferas y el grupo de árboles más ampliamente distribuido del Hemisferio Norte. Los pinos crecen desde el nivel del mar hasta la línea límite en las altas montañas, tanto en el subtropical como en las montañas del trópico hasta el subártico (Florin 1963, Farjon, 1984). Además diversas especies de pinos habitan en ambientes con temperaturas extremas desde -65° C que experimenta *Pinus sylvestris* en Siberia hasta temperaturas de 45° a 50° C en los veranos de las zonas áridas en las que se distribuyen varios pinos piñoneros. Los centros de diversidad de pinos se encuentran en América central, México y el oeste de Norteamérica, así como en el este de Asia. Aparentemente Europa también fue un centro de diversidad durante el Terciario (Mai 1989).

Los pinos han sido ampliamente estudiados, sin embargo, aún no hay acuerdo en el número exacto de especies. Por ejemplo, la clasificación del género por Gausson (1960) distingue hasta 120 especies mientras que Little y Critchfield (1969) reconocen 94 especies. Esto, se debe en parte a que el género presenta una amplia distribución con taxa que muestran variación geográfica, además de que existen eventos de especiación "reciente" en regiones aisladas. Se han propuesto muchas clasificaciones del género (revisión reciente en Price et al. 1998). Las clasificaciones modernas reconocen dos linajes principales, con base en el número de haces fibrovasculares en las acículas. El subgénero *Strobus* (pinos suaves o haploxylon) con un sólo haz vascular y el subgénero *Pinus* (pinos duros o diploxylon) con dos haces vasculares. La clasificación infragenérica del género propuesta por Little y Critchfield (1969) se basa en la clasificación temprana de Shaw (1914) y en evidencia de experimentos de hibridación por cruas controladas. Estos autores dividen al género *Pinus* en 3

subgéneros, 5 secciones, 15 subsecciones. Farjon (1984, 1996) siguiendo el sistema propuesto por Van Der Burgh (1973), reconoce 104 diferentes especies en 2 subgéneros, 8 secciones y 22 subsecciones. El tratado reciente del género presentado por Price et al. (1998), incluye varios cambios en la delimitación de los grupos. Estos autores se basan en los trabajos de Van der Burgh (1973), Rushforth (1987) y Klaus (1989), así como en recientes estudios moleculares de reconstrucción filogenética que utilizaron comparaciones de sitios de restricción del DNA de cloroplasto (Krupkin et al. 1996). En su clasificación reconocen 2 subgéneros: el subgénero *Pinus* con 10 subsecciones y el subgénero *Strobus* con 7 subsecciones, y un total de 111 especies (Price et al. 1998).

Varios estudios han documentado una gran distancia genética entre los dos subgéneros (Strauss y Doerksen 1990, Wang y Szmidt 1993, Krupkin et al. 1996). Sin embargo, estos estudios tuvieron un muestreo de especies restringido. Además no incluyeron grupos externos apropiados de otros géneros de la familia Pinaceae, y por lo tanto no pusieron a prueba de manera explícita la hipótesis de monofilia de los dos subgéneros (pero ver Wang et al. en prensa). En los anteriores trabajos, los autores excluyeron de sus análisis a cuatro especies de pinos con rangos de distribución geográfica muy restringidos, con caracteres morfológicos únicos (*P. krempfii*, *P. maximartinezii*, *P. nelsonii* y *P. rzedowskii*) que y han sido consideradas como potenciales relictos (Buchholz 1951, Styles 1993, Farjon 1996).

Liston et al. (1999), publicaron análisis de reconstrucción filogenética del género *Pinus*, con base en secuencias de espaciadores internos transcritos del DNA ribosomal de núcleo (ITSmDNA). Estos autores exploraron las relaciones de 47 especies de pinos con representantes de prácticamente todas las subsecciones reconocidas. Utilizaron dos enfoques distintos para analizar las secuencias de nucleótidos. Varios grupos monofiléticos consistentes con diversos tratamientos taxonómicos del género, fueron recuperados en ambos análisis. Sin embargo, algunas de las especies y subsecciones mostraron afinidades inciertas. Estas incluyen entre otras a *P. krempfii*, *P. rzedowskii* y *P. nelsonii*. *Pinus krempfii* una especie vietnamita con acículas aplanadas y una anatomía de la madera peculiar (Buchholz 1951). Este pino se ha considerado como perteneciente a un género monotípico (Chevalier 1944 en Buchholz

1951.) o como un subgénero (Little y Critchfield, 1969). Dos especies mexicanas: *P. rzedowskii* y *P. nelsonii*, se han clasificado en la subsección Cembroides, que incluye a los pinos piñoneros por algunos autores. No obstante, un análisis de caracteres morfológicos de esta subsección, sugiere que estas especies son distintas de los demás pinos piñoneros (Malusa, 1992). *Pinus rzedowski* tiene escamas ovuladas con umbos dorsales protuberantes y semillas aladas (Madrigal y Caballero 1969), Styles (1993), lo consideró de alguna manera entre los dos subgéneros. Carvajal (1986) y Klaus (1989) también han comentado sobre la posición única de esta especie y en clasificaciones más recientes se ha asignado a la subsección monotípica Rzedowskianae. Otros trabajos lo asignan junto con *P. maximartinezii* a la sección Parryanae (Farjon y Styles 1997). *Pinus nelsonii* es único en el subgénero Strobilus ya que posee acículas unidas y vainas persistentes por lo que Farjon (1996) le ha asignado una subsección (*Nelsoniae*) que comparte con *P. pinceana*. Un estudio que utilizó análisis de sitios de restricción del DNA de cloroplasto mostró a *P. nelsonii* en una tricotomía no resuelta entre los dos subgéneros (Perez de la Rosa et al. 1995). Sin embargo este estudio estaba limitado por un reducido número de especies (13) y pocos caracteres potencialmente informativos (15).

Existen pocos trabajos que hayan llevado a cabo estudios cladísticos con base en caracteres morfológicos. Únicamente Malusa (1992) y Farjon (1996), se han adentrado en analizar un grupo relativamente pequeño de pinos para establecer relaciones dentro de subsecciones o en grupos con determinada distribución geográfica. Ambos estudios usaron un número relativamente pequeño de caracteres morfológicos. Existen varios estudios filogenéticos basados en caracteres moleculares (Strauss y Doerksen 1990, Govindaraju et al. 1992, Krupkin et al. 1996, Bergmann y Gillet 1997, Liston et al. 1999). En este trabajo se presenta un análisis cladístico con base en caracteres morfológicos, y además, un análisis combinado para 46 especies de pinos utilizando caracteres morfológicos y moleculares.

#### Historia evolutiva del género *Pinus*.

El tiempo de origen del género es aún incierto. Restos de pináceas del Triásico y del Jurásico identificados como del género *Pinus* han sido re-examinados y designados como *Pityostrobus*, un grupo ancestral a partir del cual se cree que

emergieron los pinos actuales (Axelrod 1986, Miller 1976). El registro fósil más antiguo asignado al género es *Pinus belgica* (Alvin 1960). Este fósil data del Cretácico temprano (ca. 130 -125 MA), y aparentemente representa al subgénero *Pinus* (Miller 1976). El registro fósil es relativamente escaso en la mayoría de las rocas del Cretácico y del Paleogeno, por lo tanto se sabe poco de la historia temprana del género.

Mirov (1967) ha propuesto que el origen del género ocurrió en el Mesozoico, temprano a medio. Puesto que en el Jurásico temprano y en el Jurásico medio el este de Norteamérica y el oeste de África aún formaban una masa relativamente continua, (Smith et al. 1994), el Jurásico medio, hace alrededor de 160 Ma, marca el posible origen más temprano para el género. Si el origen fuera anterior a esta época se debería encontrar evidencia en África y/o Sudamérica de la presencia del género en el registro fósil. Poco después de la aparición del género, migraciones iniciales fueron acompañadas por radiaciones mayores que probablemente ocurrieron durante el Cretácico temprano. Evidencia en la distribución de las líneas paleocostas (Smith et al. 1994) muestran que el límite sur de Laurasia durante todo el Cretácico y parte del Terciario temprano era el mar de Tethys. Durante el Cretácico temprano las tierras emergidas del oeste de Norteamérica y el este de Eurasia se mantuvieron relativamente estables y aisladas una de la otra. Por el contrario el este de Norteamérica y el oeste de Eurasia mostraron gran fluctuación en los límites de tierra y mares, generando conexiones ocasionales entre estas regiones. El clima además era más caliente y seco que en la actualidad con estaciones marcadas en latitudes medias. Este fue probablemente el tiempo para la ocurrencia de la diversificación de los dos subgéneros (*Pinus* y *Strobus*) ya que ambos tienen especies actuales en el norte de América y Eurasia además de representantes fósiles en el Cretácico temprano (Peny 1947, Miller y Malinky 1986). Durante el Cretácico medio, el nivel del mar se elevó y se formaron mares internos en Norteamérica y Eurasia. Aparentemente, la dispersión de pinos entre el este y el oeste de cada gran masa continental estaba limitada. Este paisaje geográfico continuó durante todo el Cretácico tardío y su influencia en la evolución del género se refleja en afinidades entre pinos del este de Norteamérica y el oeste de Europa y el oeste de Norteamérica y el este de Asia.



Se cuenta con un registro fósil de 25 especies del Cretácico tardío, se atribuyen estos restos a los dos grandes subgéneros así como a cinco subsecciones. En contraste con esta diversidad del Cretácico tardío, ningún fósil de *Pinus* se ha descrito de sedimentos del Paleoceno de Norteamérica ( de hace 65-53 ma). Los fósiles de pinos son más numerosos en el Eoceno, sin embargo se encuentran restringidos a altas y bajas latitudes, y a tierras altas en latitudes medias del hemisferio norte. Esta distribución de fósiles del Eoceno llevó a Millar (1993, 1998) a proponer que estas regiones representan refugios en los cuales los pinos habitaron durante los periodos cálidos y húmedos que rigieron en el Paleoceno y Eoceno. Más aún, ella hipotetizó que volcanismo, levantamientos montañosos y fluctuaciones climáticas, llevaron a la migración, aislamiento y especiación de pinos durante el Eoceno. De acuerdo a su hipótesis, dos subsecciones se originaron en estos refugios (*Oocarpae* y *Sabinianae*), otras cuatro subsecciones precedentes se dividieron a lo largo de los refugios (*Contortae*, *Ponderosae*, *Pinus*, *Strobi*), y cuatro subsecciones de edad intermedia exhibieron especiación en refugios particulares (*Australes*, *Canarienses*, *Leiophyllae*, *Cembroides*).

El Pleistoceno fue una época de grandes fluctuaciones en el clima, pero a diferencia del Eoceno, las temperaturas tendieron a disminuir y a dar lugar a ciclos de glaciaciones periódicas (Willis et al. 1998). Estos eventos tuvieron grandes efectos en la vegetación, incluyendo a los bosques de pinos. Las especies con distribuciones en altas latitudes se dispersaron hacia el sur debido a la expansión de los hielos continentales, mientras que especies de altas montañas se dispersaron a zonas de menor elevación (Axelrod 1980). Muy probablemente los cambios que experimentaron las poblaciones de pinos, incluyendo contracciones y expansiones de sus poblaciones, así como cambios drásticos en los regímenes de selección, afectaron la estructura genética de varias especies, posibilitando la hibridización (Millar, 1998).

#### Los Pinos Mexicanos

México es considerado uno de los centros de diversidad de pinos (Styles 1993, Farjon 1994). En México ocurren un total de 43 a 51 especies dependiendo del autor, además de varios taxa infraespecíficos. Alrededor del 50% del total de especies se encuentran en nuestro país. Una de las revisiones más importantes de los pinos

mexicanos fue publicada por el botánico mexicano Maximino Martínez (1948), hace ya más de 50 años. En su tratado, él reconoció 39 especies y varias subespecies y variedades. La gran diversidad de pinos en México se debe en parte a las características geológicas del país. Virtualmente todos los tipos de ambientes en los que se distribuyen los pinos alrededor del mundo ocurren en México. Además, existe una marcada diferenciación climática en zonas relativamente cercanas, debido a la variación altitudinal y latitudinal (12° N a 33° N) que ocurre a lo largo de las cadenas montañosas (Farjon y Styles 1997). Dos ejes montañosos recorren el país de norte a sur, la Sierra Madre Oriental en el este y la Sierra Madre Occidental en el oeste, además el Eje Neovolcánico Transversal une estas dos cadenas montañosas en su extremo sur, con montañas que alcanzan alturas de 3000 y 4000 m.s.n.m., a lo largo de los estados de Puebla, Morelos, México y Michoacán. En la parte sudoeste del país la Sierra madre del Sur se continúa a lo largo de la costa del Océano Pacífico. La Sierra Madre Oriental después de unirse al Eje Neovolcánico, se continua hacia el sureste y se une con la Sierra Madre del Sur alrededor del valle de Oaxaca. A partir de este punto el rango montañosos se extiende hasta el Istmo de Tehuantepec. Al este del istmo ocurre una nueva elevación que alcanza más de 2000 metros y nuevamente se divide en dos rangos principales la Sierra Madre de Chiapas y la Mesa de Chiapas (Ferrusquía, 1993). El levantamiento de estas montañas representó cambios monumentales que tuvieron efectos muy importantes en las poblaciones de pinos distribuidas en vastas regiones del país. Muchas especies se extinguieron totalmente mientras que otras redujeron su distribución hasta verse convertidas en especies relictuales. Más aún otras especies sufrieron la fragmentación de sus poblaciones lo que probablemente dió origen a nuevas especies. Las cadenas montañosas de México se han formado en diferentes épocas geológicas, la más antigua, la Sierra madre Occidental data de hace alrededor de 85 millones de años, mientras que las demás son de formación más reciente. Otro efecto de los ejes montañosos es que sin duda constituyeron rutas de dispersión para muchas especies de pinos. Dos centros de diversidad de pinos en el país están asociados con características topológicas y climáticas particulares. En el Eje Neovolcánico Transversal, con extensiones hacia la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur, se distribuyen especies de pinos

endémicas y además esta región constituye el centro de distribución de tres complejos de especies que presentan gran variación morfológica y genética: *P. devoniana*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. El otro centro de diversidad corresponde al noreste mexicano en donde se encuentran de 14 a 18 taxa en la mayoría de los estados de la República. Esta región aparentemente corresponde a especies de pinos que se han adaptado a condiciones áridas, que han influido en la diversificación de especies y llevado a la colonización de ambientes en los que pocos grupos de plantas son exitosos. Las comunidades de pinos incluyen a los pinos piñoneros, algunos de los cuales también se distribuyen en el sudoeste de los Estados Unidos. El aislamiento geográfico constituye otro importante componente de la distribución de los pinos mexicanos. Entre las especies que representan endemismos muy restringidos se encuentran: *P. culminicola*, *P. maximartinezii*, *P. nelsonii*, *P. rzedowskii* y *P. pinceana* (Eguiluz-Piedra 1985, Styles 1993).

#### Diversidad Ecológica.

Los pinos son componentes de muchas asociaciones ecológicas. Se presentan en grandes bosques monoespecíficos, así como con otras especies de pinos, otras coníferas o bien con árboles decíduos o siempre verdes de hojas anchas (Mirov, 1967). La variación en morfología e historias de vida es considerable. En general lo que separa a los pinos de otras plantas leñosas es que son más abundantes en sitios donde la productividad fotosintética y por lo tanto la competencia con otras plantas, están limitadas, ya sea por la escasez de recursos o por la perturbación del ambiente o ambas. El papel ecológico de los pinos ha sido acertadamente resumido por Keeley y Zedler (1998). Ellos describen a estos árboles como especialistas en hábitats con moderada a baja fertilidad, capaces de explotar ambientes poco poblados debido a condiciones severas que limitan el crecimiento, ya sea por aridez, frío extremo o bien perturbaciones recurrentes. En este último sentido estos autores han reconocido la importancia del fuego como un factor que ha influido en gran medida sobre la diversidad de historias de vida en los pinos, tanto en las etapas de persistencia de los adultos como durante el reclutamiento de plántulas.

Se ha observado la reiteración de grupos ecológicos similares en distintas áreas geográficas. Estas asociaciones agrupan pinos con rasgos de historia de vida

similares. Mediante un análisis multivariado que utilizó 18 caracteres ecológicos McCune (1988), segrega a los pinos de norteamérica en 5 grupos ecológicos. El grupo uno, que él llama de especies resistentes al fuego, comparte características como son: una gran altura, corteza gruesa, acículas largas, conos grandes y armados con espinas voluminosas y semillas relativamente grandes con alas largas. Las especies de este grupo pueden incluso tener características que favorecen el fuego como por ejemplo la producción de hojarasca con resinas que propician el fuego. El grupo dos, caracterizado por especies mesofíticas relativamente tolerantes a la sombra, comparten características como son poca retención de acículas, conos sin espinas y tasas de crecimiento altas. El grupo tres corresponde a especies tolerantes al estrés, con tasas de crecimiento muy lentas, en general son arbustos o árboles pequeños que se encuentran en sitios secos, con acículas persistentes durante mucho tiempo, presentan semillas grandes con alas vestigiales. El grupo cuatro se caracteriza por comprender especies que responden al fuego. Sus rasgos más importantes son la presencia de conos serótinicos, semillas pequeñas y reproducción precoz. Las poblaciones de estas especies tienden a sobrevivir como semillas dentro de los conos cerrados durante fuegos catastróficos pero infrecuentes. El último grupo se compone de especies que comparten características del grupo uno como son rápido crecimiento y acículas largas y del grupo dos como son poco tiempo de retención de las acículas y distribución en sitios relativamente húmedos. Sin embargo, estas especies no son tolerantes a la sombra. Estos grupos que ilustran la variación ecológica de los pinos en norteamérica, pueden asignarse también a las especies de pinos distribuidas en otras regiones del hemisferio norte. Las especies que presentan características intermedias entre los grupos antes definidos, ilustran que las analogías que los delimitan no son perfectas. En algunos casos la variación entre especies puede estar asociada a grupos relacionados filogenéticamente. Lo anterior sugiere que la evolución y la adaptación del género ha sido influenciada tanto por la diversidad de ambientes que colonizan los pinos como por restricciones filogenéticas debidas a ancestría común.

El estudio de la evolución de las estrategias de historia de vida en los pinos, involucra establecer la relación entre características estructurales y funcionales de estos organismos y características del ambiente que habitan. Uno de los aspectos mas

estudiados del ambiente de los pinos incluyen intervalos de regímenes de fuego y productividad del medio ambiente. En particular, un gran número de especies de pinos duros muestran grupos de caracteres que representan adaptaciones al fuego. Un análisis detallado de estas características y el ambiente en el que se distribuyen las diferentes especies de pinos llevaron a Keeley y Zedler (1998) a postular cinco regímenes de fuego en términos de su recurrencia, predictibilidad y tipo de fuego. Estos regímenes de fuego a su vez corresponden a determinados caracteres adaptativos que agrupan distintas especies de pinos.

Además de la gran diversidad biológica y ecológica de los pinos, estos árboles establecen asociaciones con una gran variedad de organismos. Por ejemplo aves cascanuécas del género *Nucifraga* (Tomback y Linhart 1990), cotorras serranas del género *Rhynchopsitta* (Enkerlin y Madero-Enkerlin 1999) y varias especies de ardillas (Snyder, 1999) se alimentan de sus semillas. Hongos micorrízicos establecen asociaciones con varias especies de pinos (Lussenhop y Fogel 1999). Hongos patógenos tanto de acículas como causantes de royas en los conos tienen hospederos pinos (Millar y Kinloch 1991, Sinclair et al. 1996). Varias especies de escarabajos barrenadores del género *Dendroctonus* se alimentan de la corteza de pinos (Kelley y Farrell 1999). Plantas epífitas parásitas del género *Arceuthobium* (Nickrent et al. 1994) se asocian estrechamente a varias especies de pinos. Además una gran diversidad de hongos endófitos se aíslan de acículas sanas de los árboles de este género (Hata y Futai 1995).

### 1.5.2 *Lophodermium* Chevalier

La familia Rhytismataceae.

La familia Rhytismataceae Chev. forma parte del orden Rhytismatales (Ascomycota) y se compone de alrededor de 43 géneros (Hawksworth et al. 1995). La familia Rhytismataceae se encuentra ampliamente distribuida en regiones templadas y tropicales del planeta (Cannon y Minter, 1986; Johnston 1997). Los miembros de esta familia se caracterizan por presentar un apotecio inmerso en los tejidos del hospedero con el himenio expuesto mediante la separación de estos tejidos para la liberación de

las ascosporas (Minter y Cannon, 1984). La segregación de esta familia con otros hongos discomicetes también inmersos en tejidos del hospedero, se basa en caracteres de las ascas que generalmente son de paredes delgadas y que descargan las ascosporas a través de un agujero o grieta previamente sin formar (Minter y Cannon, 1984). En contraste, los miembros de la familia Phacidiaceae (Orden Helotiales), presentan ascas de paredes gruesas y con un poro apical pre-formado que se tiñe de azul con iodo (Di Cosmo et al. 1983).

La segregación de especies dentro de la familia se ha basado en gran medida en la forma de la ascospora. Darker (1967) en su revisión de la familia, erigió siete nuevos géneros considerando características del ascocarpo y de manera proponderante, se basó en la forma de la ascospora. Debido a que sus descripciones fueron muy precisas y comprensibles, su trabajo aún se considera fundamental en la actual clasificación de la familia. Pasa a que actualmente se reconoce que algunos aspectos de la clasificación de Darker la hacen artificial, aún no se ha planteado una nueva alternativa. Debido a su gran importancia se presenta a continuación un recuento de la separación de grupos postulados por Darker (1967).

Se reconocen siete grupos o complejos de géneros relacionados que se han designado como sigue:

- A) Complejo de *Lirula*: Este grupo de especies incluye hongos asociados con *Abies* y *Piceae* que tienen ascocarpos uniloculados lineares, color café oscuro a negro y con tejido estromático poco desarrollado. Las especies en este complejo se segregan en tres géneros: *Virgella* con ascosporas de forma cilíndrica, *Lirula*, con ascosporas clavadas o cilíndrico-clavadas e *Isthmiella* con ascosporas bifusiformes.
- B) Complejo de *Hypodermella*: Este complejo se caracteriza por presentar ascocarpos conspicuos subepidérmicos o subcuticulares, usualmente elípticos, y ascas clavadas o sacadas. La segregación de géneros es como sigue: *Hypodermella* con ascocarpos subcuticulares y ascosporas clavadas, *Davisomycella* con ascocarpos subepidérmicos y ascosporas clavadas, *Ploioderma* con ascocarpos subepidérmicos y ascosporas cilíndricas, *Elytroderma* con ascocarpos también subepidérmicos y ascosporas fusiformes uni-septadas y *Lophodermella* con ascocarpos subhipodérmicos y ascosporas clavadas.

- C) Complejo de *Bifusella*: Este complejo se segrega con base en la presencia de ascosporas bifusiformes. *Bifusella* y *Duplicaria* presentan ascocarpos subcuticulares y *Soleela* ascocarpos subepidérmicos.
- D) Complejo de *Lophodermium*: La segregación de los géneros dentro de este complejo nuevamente se basa en la forma de las ascosporas. *Hypoderma* con ascas clavadas o cilíndricas y ascosporas cilíndricas, *Meloderma* con ascas cilíndricas y ascosporas cilíndricas, *Lophodermium* con ascosporas filiformes continuas y *Lophomerum* con ascosporas filiformes septadas.
- E) Género *Coccomyces*: con afinidades con el género *Lophodermium* se distingue de éste por presentar ascocarpos de forma sub-circular a poligonal, que se abren de manera radial.
- F) Complejo de *Colpoma*: que incluye especies con tejido estromático muy desarrollado y nuevamente la segregación de géneros se basa en la forma de las ascosporas. *Colpoma* con ascosporas clavadas a filiformes continuas, *Bifusepta* con ascosporas bifusiformes septadas, y *Xyloschizon* con ascosporas clavadas también septadas.
- G) Complejo de *Rhytisma*: abarca especies que presentan complejos poli-estromáticos. *Rhytisma* con ascocarpos numerosos en el estroma y ascosporas clavadas a filiformes, *Placuntium*, con ascocarpos poco numerosos en el estroma y ascosporas marcadamente clavadas y *Nymanomyces* con ascosporas café y ovoides.

De los 22 géneros ampliamente descritos en el trabajo de Darker (1967), y brevemente caracterizados arriba, asombrosamente aún se reconocen 20. Únicamente dos se han rechazado: *Lophomerum* como sinonimia de *Lophodermium* y *Placuntium* de *Rhytisma*. Además se han agregado 23 géneros a la familia. Sin embargo no existe ningún análisis filogenético que presente una hipótesis sobre las relaciones de parentesco de este importante grupo de hongos.

El género *Lophodermium*.

Dentro del género *Lophodermium* se han descrito alrededor de 103 especies (Hawksworth et al. 1995, Cannon y Minter 1986, Johnston 1989). Se reportan en un amplio grupo de plantas hospedadoras, pero son particularmente numerosas en pastos (Gramineae), Ericales, tanto Ericaceae como Epacridaceae

y en coníferas. Esta distribución posiblemente se relaciona con el tipo de substrato que ofrecen estos hospederos, hojas duras que mantienen su forma durante periodos relativamente largos una vez en el suelo.

Johnston (1989) reconoce la naturaleza artificial del grupo de especies que componen al género, reflejada en la gran variación morfológica y anatómica de los ascocarpos de especies de *Lophodermium*. En su trabajo donde reporta 21 especies de este género en plantas nativas de Nueva Zelanda, utiliza características relacionadas con el desarrollo del ascocarpo y la manera como éste se abre para definir límites de grupos naturales. Las características que consideró para llevar a cabo sus agrupaciones son:

1) la posición en la que el ascocarpo se desarrolla en los tejidos del hospedero; 2) el ancho y estructura de la pared superior del ascocarpo; 3) la presencia o ausencia de células diferenciadas a lo largo de la futura línea de apertura del ascocarpo cerrado y la posición y morfología de estas células diferenciadas; 4) la morfología de los tejidos entre la pared del ascocarpo y el himenio; 5) la presencia o ausencia de células diferenciadas a lo largo del margen de la apertura del ascocarpo, y la posición en la que estas células se desarrollan; y 6) la presencia o ausencia de paráfisis marginales.

Los seis grupos que Johnston (1989) distingue a partir de la observación de las características mencionadas anteriormente, son los siguientes:

Grupo 1.- Se caracteriza por ascocarpos que inicialmente son subepidérmicos, pero el tejido fúngico llena las células epidérmicas del hospedero conforme el ascocarpo continúa su desarrollo. En ascocarpos cerrados hay una línea de células pálidas con paredes delgadas en la porción de la mitad externa de la pared superior, a lo largo de la futura línea de apertura. La pared superior es más ancha hacia el margen de la apertura del ascocarpo. Esta parte mas ancha tiene un manchón de tejido muy oscuro en el lado interno, y la parte expuesta de la pared superior partida se encuentra delineada por células cilíndricas en palizada de paredes delgadas y cilíndricas. Este grupo incluye a *L. gramineum*, *L. rubrum* y posiblemente a *L. agathidis*. La mayoría de las especies de *Lophodermium*



descritas en pastos de Europa y Norte América comparten las características de este grupo.

Grupo 2.- Se caracteriza primordialmente por la estructura del primordio del ascocarpo, y por los tejidos entre el himenio y la pared del ascocarpo. Ambos comprenden líneas de células orientadas verticalmente cilíndricas, hialinas y de paredes delgadas. Este grupo se discute en Johnston (1988), e incluye *L. asteliae*, *L. breve*, *L. kaikawakae* y *L. multimatricum*.

Grupo 3.- Se caracteriza por ascocarpo subcuticulares, con una pared del ascocarpo superior comprendiendo en su mayoría células angulares café y café oscuro y de paredes gruesas, pero con una línea de células pálidas y de paredes delgadas en la mitad interior de la pared superior, a lo largo de la futura línea de apertura. La pared superior es mas ancha hacia el margen de la apertura del ascocarpo, y la parte expuesta de la pared superior dividida se encuentra delineada por una palizada de células cilíndricas, pálidas, de paredes delgadas. Los miembros de este grupo incluyen *L. atrum*, *L. croesium*, *L. richeae* y posiblemente *L. mahuianum* y *L. rectangulare*. La mayoría de las especies de *Hypoderma* incluyendo la especie tipo (*H. rubi*) son indistinguibles de este grupo.

Grupo 4.- se caracteriza por ascocarpos intra-epidérmicos o subepidérmicos, una pared superior mas o menos uniforme en ancho, y después que el ascocarpo se abre, una capa de células cilíndricas y hialinas de paredes delgadas se desarrolla desde la parte interna de la pared superior cerca de la apertura. Este grupo incluye *L. bruneolum*, *L. nigrofactum*, *L. tindalii* y *L. unciniae*.

Grupo 5.- se caracteriza por ascocarpos intraepidérmicos, una pared superior mas o menos uniforme en ancho y paráfisis marginales diferenciadas que en ascocarpos maduros y abiertos forman una capa distintiva entre el himenio y la pared del ascocarpo. Los miembros de este grupo incluyen a *L. medium* y posiblemente a *L. inclusum* y *L. huaturuanum*. El mismo conjunto de caracteres del desarrollo está presente en las especies de *Coccomyces* del grupo 3 de Johnston (1986).

Grupo 6 .- Se caracteriza por ascocarpos subcuticulares, una pared superior compuesta en su mayoría por células angulares café oscuro de paredes gruesas

pero con algunas células hialinas ampliamente cilíndricas de paredes delgadas orientadas verticalmente entremezcladas con células angulares a lo largo de la futura línea de apertura. Los ascocarpos son irregulares en forma, elípticos, angulares o redondeados en su línea externa con la forma de la hendidura de la apertura del ascocarpo ya sea alargada o radiada, reflejando la forma del ascocarpo. Este grupo incluye a *L. irregulare* y *L. mangatepopense*.

Se han descrito 19 especies de *Lophodermium* en hospederos pinos. Los caracteres morfológicos en los que se basa la delimitación de especies de *Lophodermium* en pinos corresponden en su mayoría a la forma y la posición que ocupa el ascocarpo en los tejidos del hospedero. Otros caracteres se relacionan con la presencia de líneas de zona, líneas periféricas así como tamaños de las ascosporas y paráfisis y la presencia de conidiomata entre otros.

Minter (1981) y Cannon y Minter (1986) han descrito 18 especies de *Lophodermium* en pinos, a continuación se presenta la descripción de los caracteres morfológicos utilizados por estos autores. Líneas de zona se refieren a líneas que rodean las colonias y que generalmente forman un anillo que rodea las acículas o al substrato donde se desarrollan los hongos. Aparentemente marcan el límite de la colonización del hongo en el tejido vegetal. En general se reconocen dos tipos de líneas de zona, negras o cafés y no se han observado especies que produzcan ambos tipos. Las líneas negras comúnmente son delgadas y bien delineadas y consisten en una sola capa de tejido fúngico. Las líneas cafés son más anchas y en general no muy bien definidas, en algunos casos se trata de pigmentos cafés producto del substrato en descomposición con algunas células fúngicas presentes.

La profundidad a la que se encuentra embebido el ascocarpo en los tejidos del hospedero, es un carácter de gran importancia taxonómica dentro del grupo. Los ascocarpos embebidos por debajo de la cutícula pero por encima de los otros tejidos del pino se conocen como subcuticulares. En estos ascocarpos las células de la epidermis se separan de la cutícula y yacen en una línea cerca de la pared basal del ascocarpo. Los ascocarpos parcialmente subepidérmicos presentan las células de la epidermis que se encuentran al centro del ascocarpo, próximas a la

zona de apertura, desplazadas y por lo tanto este es centralmente subcuticular, y lateralmente subepidérmico ya que la zona periférica del ascocarpo se encuentra por debajo de las células de la epidermis. El tipo de ascocarpo totalmente subepidérmico se encuentra en su totalidad por debajo de la epidermis del hospedero y por encima de la hipodermis. Los ascocarpos parcialmente sub-hipodérmicos se encuentran embebidos por debajo de este tejido generalmente en la zona periférica. Por último, en una especie (*L. durilabrum*), se observan ascocarpos completamente subepidérmicos pero en la parte central superior de estos se presentan algunas células hipodérmicas. A este tipo de ascocarpo se le conoce como centralmente sub-hipodérmico.

El número y la manera como se encuentran desplazadas las células epidérmicas sobre la pared basal del ascocarpo, es un carácter importante para distinguir especies con ascocarpos parcialmente subepidérmicos. En algunos ascocarpos las células epidérmicas desplazadas se encuentran agregadas formando un grupo en la zona que se encuentra directamente por debajo de la cutícula de donde fueron separadas. En otros, estas células se encuentran esparcidas en diferentes puntos de la pared basal.

El género *Lophodermium* se distingue de otros miembros de la familia Rhytismataceae por presentar un ascocarpo elíptico con una sola apertura longitudinal. En una vista superficial, sin embargo, algunos ascocarpos pueden presentar variación en su forma externa debido a la profundidad a la que se encuentran embebidos en el substrato. La forma superficial puede variar de linear para ascocarpos totalmente subepidérmicos donde solo se observa una línea oscura a lo largo de la apertura, mientras que en los ascocarpos elípticos son subcuticulares. El tamaño del ascocarpo maduro, también es característico para cada especie.

El clípeo corresponde al tejido fúngico ennegrecido junto con el tejido del hospedero que queda por encima del himenio. Las células que comprenden el componente fúngico del clípeo varían en su forma. Los tipos celulares más comunes son: de textura angularis, globosa y epidermoidea o aliforme. El clípeo presenta variación considerable en su grado de desarrollo entre las diferentes

especies de *Lophodermium* en pinos, en muchos casos en correspondencia con la posición que ocupa el ascocarpo en los tejidos del hospedero. Este tejido además puede presentar un variación en le engrosamiento de sus paredes. En algunas especies muestra un engrosamiento constante en toda la superficie superior del ascocarpo, sin embargo en otras especies el clípeo es mucho más grueso en la parte central que rodea la apertura del ascocarpo y casi ausente en la periferia. La zona de apertura del ascocarpo a su vez proporciona un número de caracteres importantes para la diferenciación de especies. La zona de la apertura presenta células papiladas, gelatinizadas y de paredes gruesas que colectivamente se conocen como labios del ascocarpo. Estas células comúnmente son hialinas pero en algunas especies presentan colores característicos y en otros pueden estar ausentes. La probable función de estas células es actuar como un sello para prevenir la deshidratación del ascoma cuando está cerrado. También pueden funcionar en la formación de la apertura conforme el ascocarpo madura.

La pared basal del ascocarpo está formada de tejido fúngico enegresido usualmente de naturaleza similar al tejido que compone el clípeo, sin embargo el grosor de la pared basal es considerablemente menor que el de la pared superior y además variable en su desarrollo entre las diferentes especies. En algunos casos la pared basal se encuentra unida al clípeo en el perímetro del ascoma por lo tanto el himenio se encuentra completamente rodeado por este tejido. Pero en otras especies existe una separación entre el tejido fúngico del clípeo y la pared basal . En los casos en que la pared basal se extiende hasta la superficie del substrato, en la superficie de la acícula se observa una línea negra que marca el borde del ascocarpo, esta se conoce como línea periférica.

El himenio corresponde al tejido que lleva las estructuras reproductivas de un cuerpo fructífero y en todas las especies de *Lophodermium* se compone de paráfasis y ascas que es donde se desarrollan las ascosporas. Las paráfasis son hifas con crecimiento hacia arriba y sujetas en su base. En la familia son filiformes, hialinas y algunas veces presentan septos. La parte apical de las paráfasis puede presentar engrosamientos característicos o bien puede estar curvada en forma de gancho o más raramente ramificadas. Las ascosporas de

*Lophodermium* siempre son hialinas y filiformes, cubiertas por una cápsula gelatinosa, y en número de ocho en cada asca. La gran mayoría de las especies presentan ascosporas aseptadas.

*Leptostroma* corresponde al anamorfo o estado asexual de *Lophodermium*. El conidioma que produce los conidios se encuentra siempre embebido en el substrato y la profundidad a la que se encuentra varía en distintas especies, la forma puede ser elíptica o circular y la manera de abrir puede ser mediante uno o varios ostiolos, con una sola hendidura longitudinal a un costado del conidioma o bien con varias hendidura en el centro. La apariencia externa de los conidiomata es comúnmente negra o café oscuro debido a la presencia de una pared superior, usualmente de una sola célula de grosor, que se encuentra por debajo del tejido del hospedero. Los conidios son hialinos, de paredes delgadas y lisas y con forma cilíndrica alargada. Debido a que nunca se han visto germinar se cree que tienen una función sexual como espermacios (Sinclair et al. 1996).

Una de las especies descritas en diferentes pinos, *L. seditiosum*, actúa como un patógeno importante (Minter y Millar 1980), que afecta sobre todo a plántulas en plantaciones de árboles de navidad (Sinclair et al. 1996). El resto de las especies del género asociadas a pinos son consideradas endófitas ya que se pueden aislar de acículas sanas (Hata y Futai 1996); y en su mayoría se reproducen en acículas muertas, generalmente una vez que éstas se han separado del árbol. Existe además evidencia de especificidad de hospedero para algunas especies de *Lophodermium* (Minter 1981, Cannon y Minter 1986). Por ejemplo: *L. himalayense* se ha observado únicamente en *Pinus wallichiana*, *L. pini-pumilae* solo en *P. pumila*, *L. durilabrum* se presenta en un grupo reducido de hospederos del subgenero *Strobus*: *P. monticola*, *P. aristata* y *P. strobus* mientras que *L. kumaunicum* se asocia solo a *P. kesiya* y *P. roxburgii*. Aunque México presenta gran diversidad de pinos, solo existe un estudio del género *Lophodermium* en pinos mexicanos (Salas 1998) llevado a cabo en conjunto con el presente trabajo. En él se reportan posibles nuevas especies.

Un estudio sobre la ecología de tres especies de *Lophodermium* en *P. sylvestris* mostró evidencia de exclusión de la especie patógena (*L. seditiosum*) cuando las acículas estaban infectadas por una especie considerada endófito (*L. conigenum*)

(Minter y Millar 1980). Esto sugiere un posible papel mutualista entre el hospedero y el hongo endófito que presenta un antagonismo con el patógeno. La especificidad de hospederos así como una posible interacción mutualista o bien la existencia de mecanismos de reconocimiento dentro de la interacción patógeno - hospedero, indica que la asociación de *Lophodermium* y sus hospederos pinos puede ser producto de una larga historia evolutiva en donde la interacción se ha sincronizado de manera refinada.

En el presente trabajo se reportan los resultados del análisis filogenético para varias especies del género *Lophodermium* (Capítulo III) y especies relacionadas de la familia *Rhytismataceae*. Por último se exploran los patrones de asociación de diversos aislados del género *Lophodermium* y sus pinos hospederos (Capítulo IV).

## 1.6 Referencias bibliográficas

- Alvin, K.L. 1960. Further conifers of the Pinaceae from the Wealden Formation of Belgium. *Mem. Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belgique* **146**: 1-39.
- Axelrod, D. I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **73**: 565-641
- Barret, J. A. 1986. Host parasite interactions and systematics. Pp. 1-17. *En Coevolution and Systematics*. Eds. Stone A. R. & D. L. Hawksworth. Clarendon Press. Oxford. USA.
- Bergmann, F. & E. M. Gillet 1997. Phylogenetic relationships among *Pinus* species (Pinaceae) inferred from different numbers of 6PGDH loci. *Pl. Syst. Evol.* **208**: 25-34.
- Bremer, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* **42**: 795-803.
- Brooks, D. R. & D. A. McLennan, 1991. *Phylogeny, Ecology and Behavior. A Research Program in Comparative Biology*. The University of Chicago Press. 434 p.
- Buchholz, J.T. 1951. A flat-leaved pine from Annam, Indo-China. *Am. J. Bot.* **38**: 245-252.
- Carvajal, S. 1986. Notas sobre la flora fanerogámica de Nueva Galicia. *Phytologia*, **59**: 127-147.
- Cannon, P. F. & D. W. Minter. 1986. The Rhytismataceae of the Indian subcontinent. *Mycological Papers* **155**: 1-25.
- Cannon, P. D. & D. L. Hawksworth. 1995. The diversity of fungi associated with vascular plants: the know, the unknown and the need to bridge the knowledge gap. Pp. 277-302. *En Advances in Plant Pathology Vol. 11*. Academic Press.
- Carroll, C. G. & F. E. Carroll 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* **56**: 303-3043.
- Chapela, I. & Boddy L. 1988. Fungal colonization of attached beech branches. *New Phytol.* **110**: 47-57.
- Clay, K. 1988a. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10-16.

- Clay, K. 1988b. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. Pp. 79-105. *En* Coevolution of Fungi with Plants and Animals. Academic Press. USA.
- Darker, G. D. 1967. A revision of the genera of the Hypodermataceae. *Can. J. Bot.* **45**: 1399-1444.
- DiCosmo, F., T. R. Nag-Rag & B. Kendrick. 1983. Prodromus for a revision of the Phacidiaceae and related anamorphs. *Can. J. Bot.* **61**: 31-44.
- Eguiluz-Piedra, T. 1985. Origen y evolución del género *Pinus*. *Dasonomia Mexicana* **3**: 5-31.
- Enkerlin, E. C. & A. Madero-Enkerlin. 1999. Cotorras serranas. *Escala*. Noviembre: 75-80.
- Espinosa-García, F. J., & J. H. Langenheim. 1990. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population. Diversity and spatial patterns. *New Phytol.* **116**: 89-98.
- Farjon, A. 1984. Pines: Drawings and Descriptions of the Genus *Pinus*. Leiden: E.J. Brill & W. Backhuys
- Farjon, A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Bot. Journal. Linn. Soc.* **121**: 365-384
- Farjon, A. & T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica Monograph 75. New York Botanical Garden. 293 p.
- Farris, J. S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* **5**: 417-419.
- Felsenstein, J. 1978. The number of evolutionary trees. *Syst. Zool.* **27**: 27-33.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferrusquía, V. I. 1993. Geology of Mexico: a Synopsis, Pp. 3-107. *En* Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. Eds T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot & J. Fa. New York: Oxford University Press.
- Fisher, P. J., F. Graft, L. E. Petrini, B. C. Sutton, & P. A. Wooley. 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia* **87**: 319-323.



- Florin, R. 1963. The distribution of Conifer and Taxad genera in time and space. *Acta Horti Bergiani* 20: 240-285.
- Futuyma, D. J. & M. Slatkin 1983. *Coevolution*. Pp. 1-13. Sinauer Associates Inc. USA.
- Gaussen, H. 1960. *Pinus*. En Les Gymnosperms Actuelles et Fossiles. Travaux du Laboratoire Forestier de Toulouse, Tôme II Section I, Volume I Chapter Xi, Fascicle VI. 1-272.
- Govindaraju, D., P. Lewis & C. Cullis. 1992. Phylogenetic analysis of pines using ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. *Pl. Syst. Evol.* 179:141-153.
- Hata, K. & Futai K. 1995. Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Can. J. Bot.* 74: 103-114.
- Hawkins, J. A., C. E. Huges & R. W. Scotland. 1997. Primary homology assesment, characters and character states. *Cladistics* 13: 275-283.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, & D. N. Pegler. 1995. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi (Ed. 8). International Mycological Institute.
- Johnston, P. R. 1986. Rhytismataceae in New Zealand. Some follicolous species of *Coccomyces* de Notaris and *Propolis* (Fries) Corda. *New Zealand Journal of Botany.* 24: 89-124.
- Johnston, P. R. 1988. A new species of *Meloderma* (Rhytismateceae), with notes on *Meloderma* and related genera. *Mycotaxon.* 33: 423-436.
- Johnston, P. R. 1989. Rhytismataceae in New Zealand. The genus *Lophodermium* on indigenous plants. *New Zealand Journal of Botany.* 27: 243-274.
- Johnston, P. 1997. Tropical Rhytismatales. Pp. 241-254. En Biodiversity of Tropical Microfungi. Ed. K. D. Hyde. Hong Kong University Press.
- Keeley, J. E. & .P. H. Zedler 1998. Evolution of life history in *Pinus*. Pp219-250. En Ecology and Biogeography of *Pinus*. Ed D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Kelley, S. T., B. D. Farrell. 1999. Phylogeny of bark beetle/pine interactions. XVI International Botanical Congress. Abstracts. 15.

- Kitching, I. J. 1994. Tree-building techniques. Pp. 44-71. *En Cladistics. A Practical Course in Systematics*. Eds. Forey P. L., C. J. Humpries, I. J. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert y D. M. Williams. Clarenton Press. Oxford.
- Klaus, W. 1989. Mediterranean pines and their history. *Pl. Syst. Evol.* **162**: 133-163.
- Kluge, A. G. & J. S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- Kowalski, T. & R. D. Kehr. 1995. Fungal endophytes of living branch bases in several european tree species. Pp 67-86. *En Endophytic Fungy in Grasses and Woody Plants*. Eds: Redlin S. C. & L. M. Carris. APS Press.
- Krupkin, A. B., A. Liston & S.H. Strauss. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*) from chloroplast DNA restriction site analysis. *Am. J. Bot.* **83**: 489-498.
- Liston, A., W.A. Robinson, D. Piñero & E. R. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **11**: 95-109
- Little, E. L. Jr., & W. B. Critchfield. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus*. USDA Forest Service Miscellaneous Publication 1144. Washington D. C.
- Lussenhop, J. & R. Fogel. 1999. Seasonal change in phosphorus content of *Pinus strobus*- *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizae. *Mycologia* **91**: 742-746.
- Madrigal, S. X. & D. M. Caballero. 1969. Una nueva especie mexicana de *Pinus*. *Bol. Tecn. Inst. Nac. Invest. Forest. México* **26**: 1-11.
- Mai, D. H. 1989. On the history of pines (*Pinus* L.) in Europe. Pp. 299-309. *En Proceedings of the Symposium Paleofloristics and Paleoclimatic Changes in the Cretaceous and Tertiary*. Prague.
- Malusa, J. 1992. Phylogeny and biogeography of the pinyon pines (*Pinus* susect. *Cembroides*). *Syst. Bot.* **17**: 42-66.
- Margulis, L. & K. V. Schwartz, 1981. Cinco reinos: Guía Ilustrada de los Phyla de la Vida en la Tierra. Ed. Ciencias por una educación Popular. 304 p.
- Martínez, M. 1948. Los Pinos Mexicanos. 2ª ed. Ediciones Botas. México. 368 p.
- McCune, B. 1988. Ecological diversity in North American pines. *Am. J. Bot.* **75**: 353-368.

- Millar, C. I. & B. B. Kinloch. 1991. Taxonomy, phylogeny, and coevolution of pines and their stem rusts. Pp 1-38 in *Rust on Pine. Proceedings of the IUFRO Rust of Pine Working Party Conference, September 18-22 1989, Banff, Alberta; Canada*, eds Y. Hiratsuka, J.K. Samoil, P.V. Blenic, P.E. Crane, & B.L. Laishley. Canada, Edmond, Alberta.
- Millar, C.I. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus* L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **80**: 471-498
- Millar, C.I. 1998. Early evolution in pines. Pp. 69-91. *En Ecology and Biogeography of Pinus*. Ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Miller, C. N. 1976. Early evolution in Pinaceae. *Rev. Paleobot. Palynol.* **21**: 101-117.
- Miller, C. N. & J. M. Malinky. 1986. Seed cones of *Pinus* from the late Cretaceous of New Jersey, U. S. A. *Rev. Paleobot. Palynol.* **46**:257-272
- Minelli, A. 1993. Biological Systematics. The state of the Art. Chapman and Hall. 387 p.
- Minter, D. W. 1981. *Lophodermium* on pines. *Mycological Papers* **147**: 1-71. CAB.
- Minter, D. W. & C. Millar. 1980. Ecology and biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *P. sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology.* **10**: 169-181.
- Minter, D. W. & P. F. Cannon 1984. Ascospore discharge in some members of the *Rhytismataceae*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **83**: 65-92.
- Mirov, N. T. 1967. The Genus *Pinus*. The Ronald Press Company. New York. 602p.
- Morgan, D. R. 1997. Decay analysis of large sets of phylogenetic data. *Taxon* **46**: 509-517.
- Moritz, C. & D. M. Hillis, 1996. Molecular systematics: context and controversies. Pp. 1-13. *En Molecular Systematics. 2<sup>a</sup> Ed.* Eds. Hillis, D. M., C. Moritz & B- Mable. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Page, R. D. M. 1994. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*, **10**: 155-173.
- Penny, J. S. 1947. Studies on the conifers of the Magothy flora. *Am. J. Bot.* **34**: 281-296.
- Perez de La Rosa, J., S.A. Harris, & A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor Appl. Genet.* **91**: 1101-1106.

- Perry, J. P. Jr. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Portland, Oregon: Timber Press. 231p.
- Petrini, O. & G. Carroll. 1981. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Can. J. Bot.* **59**: 629-636.
- Petrini, L. & O. Petrini. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia*, **38**: 216-234.
- Price, R. A., A. Liston, & S.H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. *En Ecology and Biogeography of Pinus*. Pp. 49-68. Ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Quicke, D. L. J. 1993. *Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy*. Blackie Academic and Professional an imprint of Chapman and Hall. 311p.
- Rushforth, K. 1987. *Conifers*. London: Helm.
- Rodrigues, K. F. & G. J. Samuels. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* **94**: 827-830.
- Saikkonen, K. , S. H. Faeth, M. Helander, & T. J. Sullivan. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **29**: 319-343.
- Salas, L. R. 1998. La inferencia filogenética como una aproximación a la historia natural del género de hongos endófitos *Lophodermium* Chev. (Ascomycota) en dos especies mexicanas de pinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Samuels, G. J. & K. A. Seifert. 1995. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Ann. Rev. Phytopathology* **33**: 37-67.
- Seitz V., S. Ortíz-García, A. Liston (en prensa). Alternative coding strategies and the inapplicable character problem. *Taxon* (en prensa).
- Shaw, G. R. 1914 *The Genus Pinus*. Publications of the Arnold Arboretum 5. Forage Village, Massachusetts: The Murray Printing Co.
- Simon, L., J. Busquets, R. C. Lévesque & M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Sinclair, W. A., Lyon, H. H., & Johnson, W. T. 1996. *Diseases of Trees and Shrubs*. Pp. 32-37. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press.
- Smith, A.G., D. G. Smith & B.M. Funnell. 1994. *Atlas of Mesozoic and Cenozoic Coast Lines*.

- Snyder, M. A. 1999. Geographic differentiation of squirrel-pine interactions. XVI International Botanical Congress. Abstracts. 271.
- Stone, K. J., & J. F. White, Jr. 1999. Biodiversity of endophytic fungi. *En Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Fungi*. Biological Diversity Handbook Series. Eds. G. Mueller, G. Bills, A. Rossman & H. Burdsall. Smithsonian Institution Press. (en prensa).
- Strauss, S. H., & A.H. Doerksen.1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* 44: 1081-1096.
- Stubblefield, S. P., & T. N. Taylor.1983. Studies of Paleozoic fungi. I The structure and organization of *Traquairia* (Ascomycota). *Am. J. Bot.* 70: 387-399.
- Styles, B. T. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican purview. Pp. 397-420. *En Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Eds T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot &, J. Fa. New York: Oxford University Press.
- Taylor, T. N. 1990. Fungal associations in the terrestrial paleoecosystem. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 21-25.
- Taylor, T. N. 1994.The fossil history of ascomycestes. Pp 167-164. *En Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. Ed. D. L. Hawksworth. Plenum Press, New York.
- Thompson, J. N. 1989. Concepts of coevolution. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 179-183.
- Tomback, D. F. & Y. B. Linhart. 1990. The evolution of bird-dispersed pines. *Evolutionary Ecol.* 4: 185-209.
- Van der Burgh, J. 1973. Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia" zu Herzogenrath, "Zukunft West" zu Eschweiler und "Victor" (Zülpich Mitte) zu Zülpich. Nebster einer systematish-anatomischen Bearbeitung der Gattung *Pinus* L. *Rev. Paleobot. Palynol.* 15: 73-275.
- Van der Heijden M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwif-Engel, T. Boller, A. Wiemkem & I. R. Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 365: 69-72.

- Wang, X.-R., & A. E. Szmídt. 1993. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian species (*Pinaceae*). *Pl. Syst. Evol.* **188**: 197-221.
- Wang, X.-R., Y. Tsumura, H. Yoshimaru, K. Nagasaka & A. E. Szmídt. (en prensa). Phylogenetics relationships of Eurasian pines (*Pinus*, *Pinaceae*) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer and *trnV* intron sequences. *Am J. Bot.* (en prensa).
- Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. John Wiley and Sons. 439 p.
- Williams, D. M. 1994. DNA analysis: theory. Pp. 89-101. *En Cladistics. A Practical Course in Systematics*. Eds. Forey, P. L., C. J. Humpries, I. J. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert & D. M. Williams. Clarenton Press. Oxford.
- Willis, K. J., K. D. Bennet & H. J. B. Birks. 1998. The late Quaternary dynamics of pines in Europe. Pp. 107-121. *En Ecology and Biogeography of Pinus*. Ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press.

## CHAPTER II

### INTEGRATING MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DATA FOR PHYLOGENETIC RECONSTRUCTIONS IN *Pinus* (PINACEAE)

SOL ORTIZ-GARCÍA

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM Apartado  
Postal70-275, México DF. C. P. 04510 México.

VOLKHARD SEITZ

Universitäts Klinikum Benjamin Franklin, Institut für Pathologie, Hindenburgdamm  
30, 12 200 Berlin, Germany.

AARON LISTON

Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, OR  
97331 USA.

DANIEL PIÑERO and ELENA R. ALVAREZ-BUYLLA

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM Apartado  
Postal70-275, México DF. C. P. 04510 México.

## 2.1 Abstract

The genus *Pinus* is in respect of species number and ecological prominence the most important genus of conifers. *Pinus* taxonomy and evolution was intensely debated in the last decades based on either morphological or molecular data. We used the genus *Pinus* as a model system to evaluate independent and combined morphological and molecular phylogenies based on two data sets. Seventy morphological characters and previously published partial sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA, for 46 pine species with *Cathaya* and *Picea* as representative outgroups. For the morphological data set distinct character state ordering and weighting analyses were conducted. Different data sets were tested for taxonomic congruence, furthermore the levels of concordance between phylogenetic hypotheses inferred from separate data sets were explored. Topological conflicts obtained from separate data sets may be due to parallel evolution, notably in subsection *Cembrae*. A combined analysis was performed and the topology obtained was more resolved than the trees from separate analysis and it was congruent with accepted taxonomic classifications of the genus. Fossil evidence was reanalyzed in the framework of this phylogenetic hypothesis.



## 2.2 Introduction

The genus *Pinus* L. provides a model system for evaluating independent and combined molecular and morphological phylogenies. A significant amount of morphological and molecular evidence has been gathered for many pine species, but no study has included different sources of data in a phylogenetic analysis. Pines may have received more intense study than any other group of trees in the Northern hemisphere. However, many unresolved questions about the systematics and paleogeography of the genus await new data and new analytical approaches.

### Previous Hypotheses Of Pine Relationships

The genus *Pinus* is distinguished from other members of the Coniferales and the family Pinaceae by its needle-like leaves borne in fascicles on short shoots, with a sheath of bud scales at the base. Another unique distinctive character in the genus is the presence of woody cone scales with specialized apical regions, the umbo and the apophysis, which represent the areas left exposed in the first-year conelet and the mature cone, respectively (Styles 1993; Farjon 1984).

Many classification schemes have been proposed for the genus based on morphology, cytology, crossability, secondary product chemistry, protein electrophoresis, and most recently DNA analyses from restriction site and sequence comparisons of chloroplast and nuclear ribosomal DNA (nrDNA) (reviewed in Price et al., 1998; see also Liston et al., 1999; Wang et al., in press). Incongruence in classification within the genus *Pinus* is not uncommon among different authors. Classifications based on morphology and crossability have differed in the grouping of species in different subsections (Shaw, 1914; Martinez, 1948; Gaussen, 1960; Klaus, 1980; Critchfield, 1986; Malusa, 1992) and molecular studies using different markers have also differed in some relationships (Govindaraju et al., 1992; Shurkhal et al., 1992; Krutovskii et al., 1994; Krupkin et al., 1996; Bergmann and Gillet, 1997). The infrageneric classification proposed by Little and Critchfield (1969) is still one of the

most widely used treatments for the group. It is based on both morphology and crossing studies and has been used as a starting point for recent classifications of the genus. Alternative classifications based on morphology have been published particularly for the Mexican and Central American hard pines (Perry, 1991; Carvajal and McVaugh, 1992; Styles, 1993; Farjon and Styles, 1997). One of the latest treatments of *Pinus* is given by Price et al. (1998). Their classification scheme will be followed in this work (Table 2.1).

### Analytical Approach

Traditionally two different approaches have been proposed for the integration and analysis of data from different sources. Taxonomic congruence or the consensus approach (de Queiroz 1993; de Queiroz et al., 1995), examines the extent to which independent topologies for the same set of taxa support the same groupings (Swofford, 1991). The character congruence approach, also known as "total evidence" or the combined approach (Kluge, 1989; 1998), seeks a single, best-fitting hypothesis, derived by combined analysis of all the data. Taxonomic congruence and character congruence have been considered competing approaches to phylogenetic inference (Kluge, 1989; 1998; Jones et al., 1993). Bull et al. (1993), advocate an intermediate approach, known as the prior agreement approach where combining data sets is recommended only when independently derived phylogenies from separate analyses are not in conflict (reviewed by Chippendale and Wiens, 1994). When taxonomic congruence and character congruence approaches are both used, separation of phylogenetically useful information from misleading patterns of character variation can be achieved (Larson, 1994). Establishing the degree of incongruence between groups of characters helps identify possible sources of conflict, but it represents an arbitrary criterion of non-combinability. As Siddall (1997) recognized, incongruence and combinability are different. Combined analyses for the same group of taxa may maximize the descriptive efficiency and explanatory power of character data by direct resolution of character conflicts according to total information (Kluge 1989, 1998; Jones et al., 1993). We

**Table 2.1.** Sampled *Pinus* species and Outgroups. Numbers in parentheses corresponds to the number of species sampled in this study and the total number of species assigned to each subsection. Classification according to Price et al. (1998).

Classification and Species	Geographic Origin
<b>Subgenus <i>Pinus</i></b>	
Section <i>Pinus</i>	
Subsect. <i>Pinus</i> (7/19) b	
<i>P. kesiya</i> Gordon	SE Asia
<i>P. merkusii</i> Junghuhn & de Vriese	SE Asia
<i>P. pinaster</i> Aiton	Mediterranean
<i>P. resinosa</i> Aiton	NE N America
<i>P. sylvestris</i> L.	N Eurasia
<i>P. thunbergii</i> Parlatore	E Asia
<i>P. tropicalis</i> Morelet	Cuba
Subsect. <i>Canarienses</i> (2/2)	
<i>P. canariensis</i> C. Smith	Canary Islands
<i>P. roxburghii</i> Sargent	Himalayas
Subsect. <i>Halepensis</i> Van der Burgh (1/2)	
<i>P. halepensis</i> Miller	Mediterranean
Subsect. <i>Pineae</i> Little & Critchfield (1/1)	
<i>P. pinea</i> L.	Mediterranean
"North American diploxylon pines"	
Subsect. <i>Contortae</i> Little & Critchfield (2/4)	
<i>P. contorta</i> Loudon	W N America
<i>P. virginiana</i> Miller	SE N America
Subsect. <i>Australes</i> Loudon (1/11)	
<i>P. echinata</i> Miller	SE N America

Table 2.1 (continued)

Classification and Species	Geographic Origin
Subsect. <i>Ponderosae</i> Loudon d (6/17)	
<i>P. coulteri</i> D. Don	W N America
<i>P. douglasiana</i> Martínez	W México
<i>P. durangensis</i> Martínez	W México
<i>P. hartwegii</i> Lindley	C México
<i>P. montezumae</i> Lambert	C México
<i>P. ponderosa</i> P. & C. Lawson	W N America
Subsect. <i>Attenuatae</i> Van der Burgh (1/3)	
<i>P. attenuata</i> Lemmon	W N America
Subsect. <i>Oocarpae</i> Little & Critchfield emended Price, Liston, and Strauss (2/10)	
<i>P. patula</i> Schtdl. & Cham.	E México
<i>P. teocote</i> Schtdl. & Cham.	México
Subsect. <i>Leiophyllae</i> Loudon (2/2)	
<i>P. leiophylla</i> Schiede & Deppe	México
<i>P. lumholtzii</i> Robinson & Fernald	W México
<b>Subgenus <i>Strobus</i> Lemmon</b>	
Section <i>Parrya</i> Mayr	
Subsect. <i>Balfourianae</i> Engelm. (1/3)	
<i>P. aristata</i> Engelm.	W N America
Subsect. <i>Cembroides</i> Engelm. (6/11)	
<i>P. cembroides</i> Zuccarini	N México
<i>P. culminicola</i> Andresen & Beaman	NE México
<i>P. johannis</i> Robert	NE México
<i>P. maximartinezii</i> Rzedowski	NW México

Table 2.1 (continued)

Classification and Species	Geographic Origin
<i>P. nelsonii</i> Shaw	E México
<i>P. pinceana</i> Gordon	E México
Subsect. <i>Rzedowskianae</i> Carvajal (1/1)	
<i>P. rzedowskii</i> Madrigal & Caballero	W México
Subsect. <i>Gerardianae</i> Loudon (2/3)	
<i>P. bungeana</i> Endl.	E Asia
<i>P. gerardiana</i> D. Don	S Asia
Section <i>Strobus</i>	
Subsect. <i>Strobi</i> Loudon (8/21)	
<i>P. ayacahuite</i> Schtdl.	México
<i>P. chiapensis</i> (Martínez) Andresen	S México
<i>P. kwangtungensis</i> Chen	E Asia
<i>P. lambertiana</i> Douglas	W N America
<i>P. parviflora</i> Siebold & Zucc.	E Asia
<i>P. peuce</i> Grisebach	S Europe
<i>P. strobus</i> L.	E N America
<i>P. wallichiana</i> Jackson	Himalayas
Subsect. <i>Cembrae</i> Loudon (3/5)	
<i>P. albicaulis</i> Engelm.	W N America
<i>P. cembra</i> L.	C Europe
<i>P. pumila</i> (Pallas) Regel	NE Asia
<b>OUTGROUPS</b>	
<i>Cathaya argyrophylla</i> Chung & Kuang	S China
<i>Picea mexicana</i> Martínez	México

considered both analytical approaches as complementary, since despite conflicting separate datasets, conducting a combined analysis may indicate new associations, the nature of the conflict, and / or robust clades could be uncovered as recognized by Dubuisson et al. (1998).

Within the genus the genus *Pinus*, that has been to shown to be monophyletic (Hart, 1987; Frankis, 1988; Chaw et al., 1995; Tsumura et al., 1995; Wu and Hu, 1997; Liston et al. 1999; Wang et al., in press), current classifications recognize two major lineages, originally proposed by Koehne (1893) based on the number of fibrovascular bundles in the needle cross section: Subgenus *Strobis* (haploxyton or soft pines) with a single fibrovascular bundle in the needle cross section, and subgenus *Pinus* (diploxyton or hard pines) with two. Results from DNA restriction site and sequence data comparisons from the chloroplast genome, as well as comparative morphological and biochemical data support this distinction (Strauss and Doerksen, 1990; Schirone et al., 1991; Moran et al., 1992; Wang and Szmidt, 1993; Tsumura et al., 1995; Farjon, 1996; Wang et al., in press). Other studies have provided results questioning the monophyly of one or both of these two subgenera (Govindaraju et al., 1992; Shurkhal et al., 1992; Pérez de la Rosa et al. 1995; Chaw et al., 1995, 1997; Bergmann and Gillet, 1997) although all of these studies were characterized by limited taxon sampling. Various phylogenetic analyses of partial ITS region sequences (Liston et al., 1999) consistently resolved the two subgenera as monophyletic. However in a culled analysis, excluding ambiguously aligned sites, support for the monophyly of subgenus *Strobis* was weak (61% bootstrap), while in an elision analysis, sensu Wheeler et al., (1995), subgenus *Pinus* was poorly supported (41% average bootstrap from 13 different alignments). Thus the monophyly of the two subgenera remains equivocal.

In this study we included morphological and molecular data for phylogenetic reconstruction in pines, and explored levels of phylogenetic congruence. Taxonomic congruence and character congruence were considered as complementary approaches for dealing with different data partitions. A combined analysis suggested that some of the differences among individual topologies from different data sets are related to sample error, while other conflicts reflect differences among evolutionary processes

acting upon groups of selected characters. The combined topologies were well resolved and in general congruent with current taxonomy of the group.

### 2.3 Materials and Methods

This study included most of the pine species used in the ITS phylogenetic analysis of Liston et al. (1999), and the same outgroups, *Cathaya* and *Picea* (Table 2.1). The sequence identified as *P. krempfii* was *P. armandii* (Gernandt, unpublished data), and it was not included in the analyses. A morphological data matrix was constructed based on a literature survey, examination of herbarium specimens (Appendix 2), and observation of living plants. Most morphological data from literature were taken from Hudson (1960), Van der Burgh (1973), Farjon (1984), and Farjon and Styles (1997). However the following literature has also been consulted: Martínez (1948), Buchholz (1951), Greguss (1955), Gaussen (1960), Jährig (1962), Saylor, (1964, 1972, 1984), Ferrè (1965), Lanyon (1966), Bailey (1970), Yoshie and Sakai (1985), Klaus (1989), Farjon (1990), Perry (1991), Carvajal and McVaugh 1992, and Malusa (1992). After an evaluation of characters and different coding approaches, a total of 70 morphological characters were included in the final matrix (Appendix 1). The ITS sequences included the complete ITS2 and 5.8S and partial ITS1 sequences from Liston et al. (1999). Four sequences corresponding to *P. culminicola*, *P. aristata*, *P. johannis* and *P. nelsonii* (Gernandt et al., 1999), were re-sequenced and replaced in the original alignment. A matrix of the morphological data set and the aligned ITS sequences was combined. Information on the size of each data set and informative characters are presented in Table 2.2.

**Table 2.2.** Statistical information for *Pinus* phylogenetic reconstructions obtained from the different data sets (Figs 1-3). CI = consistency index excluding uninformative characters, RI = retention index .

Data Set	Characters	Informative characters	No. trees	tree length	CI	RI
ITS	654	220	144	798	0.580	0.884
Morphology	65	63	24	445	0.375	0.722
Combined	719	283	2	1230	0.436	0.818



## Phylogenetic Reconstructions

Phylogenetic analyses and character reconstructions were conducted under the criterion of maximum parsimony using PAUP\* (Swofford, 1998). The morphological data matrix included 12 characters that were ordered following the criterion of similarity (sensu Hauser and Presch, 1991). Differential a priori weighting was used when non independence of characters was suspected. In the molecular data set all characters were treated as discrete and equivalent units of phylogenetic information and no differential a priori weighting was used, all molecular characters were unordered. For the combined analysis the same weighting and ordering strategy was used for the morphological characters. Heuristic search parameters included TBR branch swapping, and 100 replicates of random addition sequences. For each data set, all equally most parsimonious trees (MPTs) were retained.

The non-parametric bootstrap (Felsenstein, 1985; Sanderson, 1989) was used to assess the reliability of individual branches. For each of 100 bootstrap replicates, random addition sequences with 1 replicate heuristic search were performed with a maxtree limit of 100 trees. Decay analysis was used to assess reliability of monophyletic groups (Bremer, 1988; Donoghue and Sanderson, 1992). This analysis was performed using the consensus constraint strategy (Johnson and Soltis, 1994) for trees one to five steps longer, and following the clade constraint method (Morgan, 1997) for clades that collapse in longer trees.

Establishing levels of incongruence between data sets is an important step when dealing with different data partitions. Different measures of incongruence have been developed for this purpose (reviewed in Swofford, 1991).

### Taxonomic Congruence.

This was calculated by computing the strict consensus tree from all MPTs of each data set. Swofford (1991) suggested that when several trees are being compared, a

majority rule consensus may be preferable to a strict consensus. The 50% majority rule consensus tree was also calculated.

**Constrained Topologies.** To compare the results between the morphological and the ITS analyses, alternative arrangements were entered as constrained trees and examined separately using constraint parsimony. The same search parameters mentioned above were used for each constraint tested. The constraints included conflicting branches present in the counterpart data sets as well as selected hypotheses derived from pine classification. From these constrained analyses we obtained the tree length from the most parsimonious constrained trees and compared the length against the original MPTs. The increase in tree length resulting from enforcing a topological constraint can be used as an indicator of the plausibility of recovering that particular group by adding more data. Enforced relationships that extensively increase the number of steps of the shortest trees are less likely to be the result of misleading homoplasies.

### Character Congruence

Once a combined analysis of both data sets was accomplished, three methods were used to compare the phylogenetic reconstructions obtained from separate analyses and the combined analysis following procedures of Larson (1994) and Mason-Gamer and Kellogg (1996).

**The Incongruence Length Difference (ILD).** This test was used to establish the difference between the number of steps required by each individual and combined analyses. This test randomly repartitions the combined data set into two subsets equal in size to the original data sets. The sum of the lengths derived from analyses of the original data sets was compared to a null distribution of length differences generated by one hundred series of random partitions of the combined data set (Mickeych and Farris, 1981; Farris et al., 1995). This test addresses whether two data sets are merely arbitrary subdivisions of one large data set (Mason-Gamer and Kellogg, 1996). To avoid disparity in the number of variable characters of the different data partitions, invariant

characters were removed before applying the ILD test. This test was performed using the homogeneity partitioning test in program PAUP\* (Swofford, 1998).

**Inspection And Assessment Of Support.** Conflict among data sets should not be inferred from comparisons involving weak nodes, because weakly supported nodes only ambiguously represent patterns within individual data sets and any tree that lacks support for conflicting clades could be regarded as consistent with the data (Mason-Gamer and Kellogg, 1996; Page, 1996). Clades with bootstrap values over 70% were identified in each of the three pairwise combinations of data sets. Bootstrap support for corresponding nodes on the rival tree was obtained using the table of partitions from the PAUP bootstrap output. Comparisons showed whether there was any signal for a particular clade that did not appear in its own most parsimonious trees.

**Templeton Test.** This non-parametric method determines whether alternative topologies differ significantly in how well they fit a data set (Templeton, 1983). Paired trees are evaluated to compare number of changes required in each character of a given data set to attain a given topology (Larson, 1994). This test was performed in PAUP\* (version 4 Swofford, 1998). Comparisons included the full set of MPTs obtained from each analysis, against all the most parsimonious rival trees.

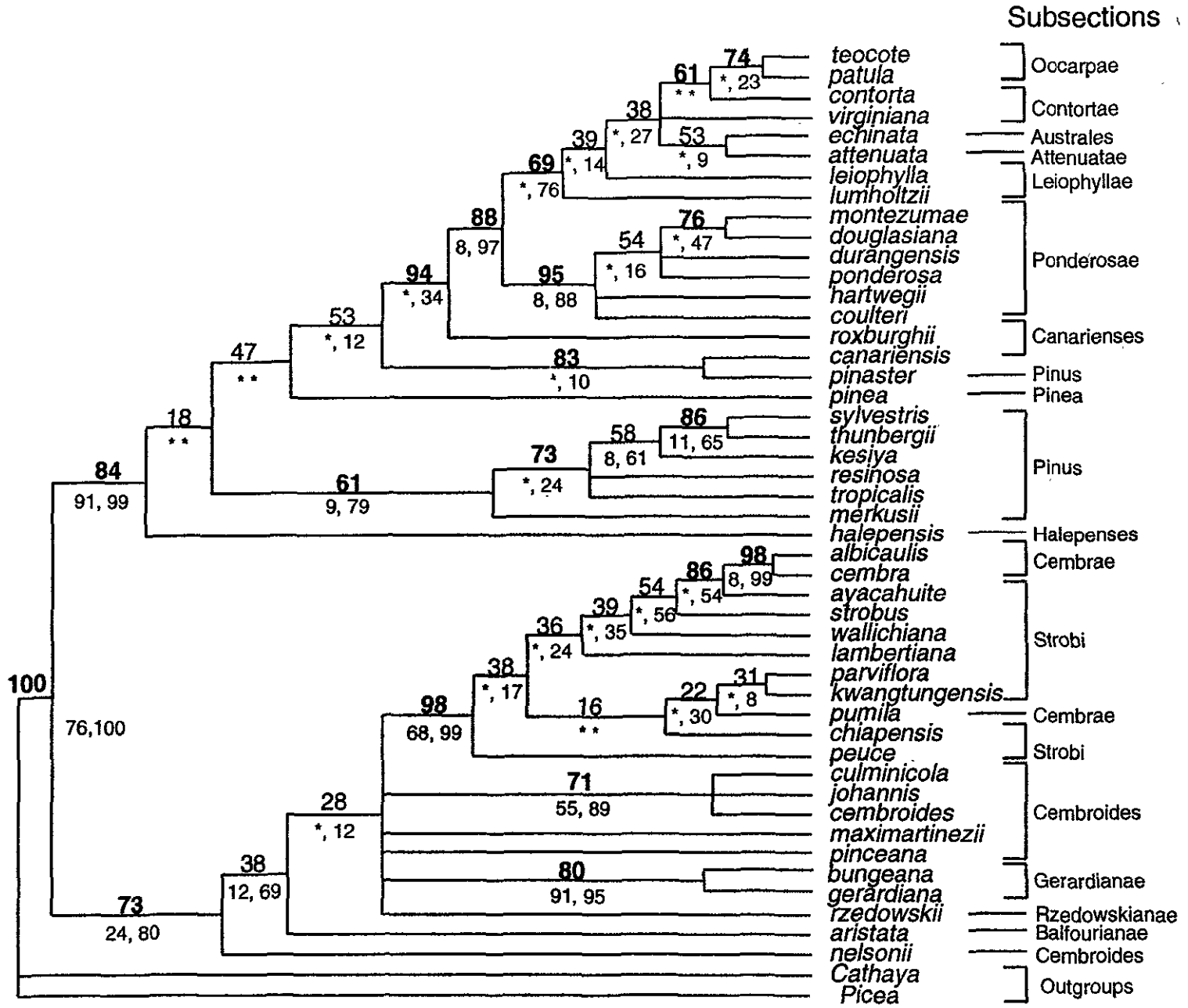
## **2.4 Results**

### **Phylogenetic Reconstructions**

Tree statistics for the ITS, morphological, and combined analysis are shown in Table 2.2. The strict consensus tree from the ITS region is shown in Fig. 2.1. This tree represents the strict consensus of 144 equally MPTs inferred from sequence alignment of all sites. Both subgenera resulted monophyletic and many branches have moderately to high bootstrap support.

Analyses of the morphological data set using different character state ordering and weighting strategies yield different topologies. When all characters were analyzed unordered and equally weighted, 144 equally MPTs were obtained. The same topologies were recovered when differential weighting was applied. All of these

**Figure 2.1.** Strict consensus of 144 equally parsimonious trees obtained from the ITS data set for 46 pine species plus *Cathaya argyrophylla* and *Piceae mexicana* as outgroups. Numbers above the branches are bootstrap values from 100 replicates, numbers below the branches are bootstrap values from the morphology and the combined analyses separated by a “,”. Asterisks were used for bootstrap support lower than 5%. Corresponding subsections following Price et al. (1998) treatment of the genus are depicted grouping the species.

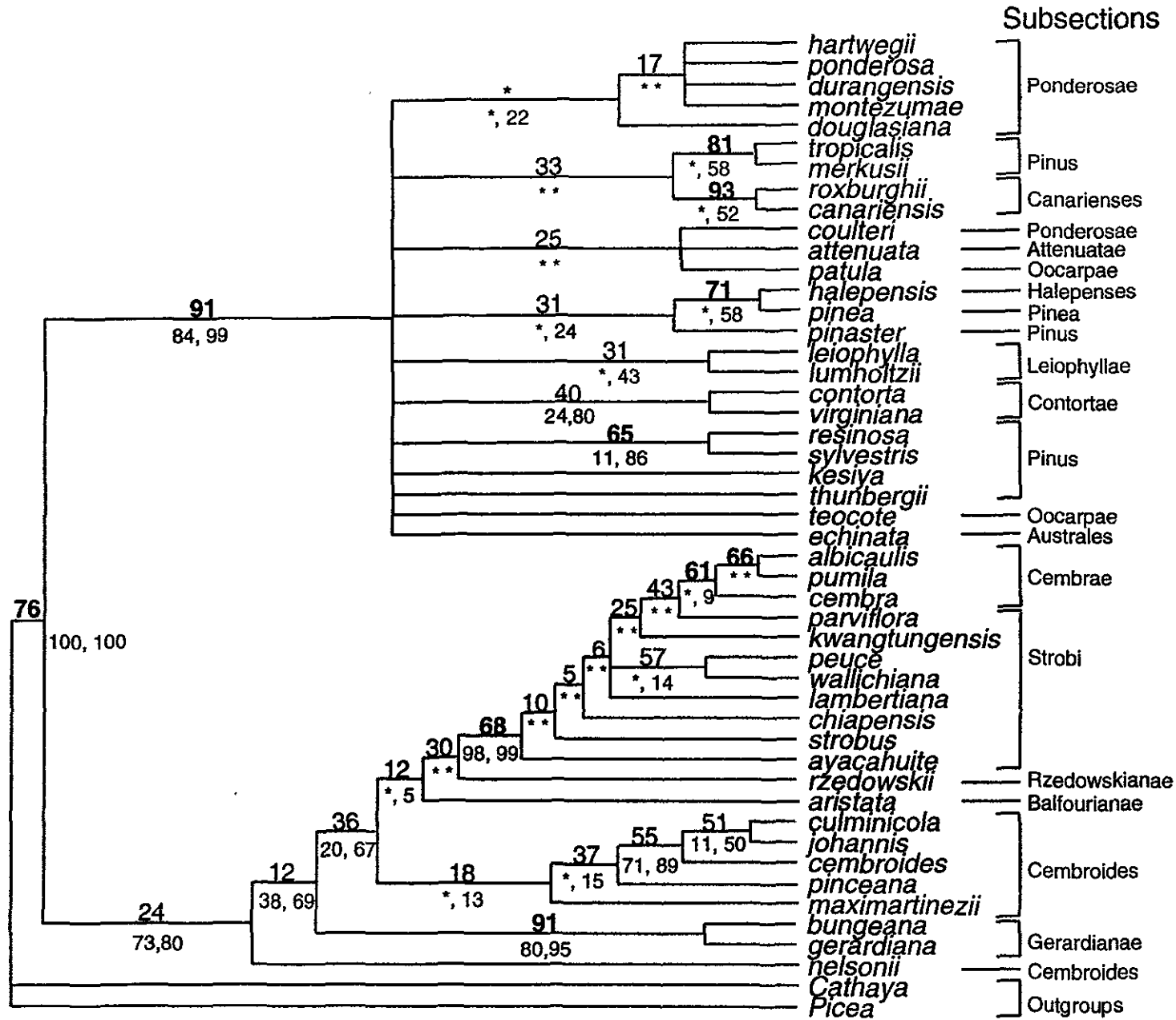


topologies yielded a paraphyletic subgenus *Strobus*. When 12 characters were ordered the phylogenetic analysis yielded 24 equally most parsimonious trees, with all topologies presenting both subgenera monophyletic. The effect of applying differential weighting and character order on phylogenetic analysis was to increase the number of MPTs from 24 to 72. The 24 trees from the analysis where 12 characters were ordered and all characters were equally weighted, were a subset of the trees obtained from the differential weighting analysis. An additional analysis excluding all dependent characters resulted in the same 24 topologies, and this is the analysis strategy reported here. In Fig. 2.2 the strict consensus tree of 24 trees showed relative low resolution especially within subgenus *Pinus*, as well as low bootstrap support. Only nine clades have bootstrap support over 60%. Section *Strobus*, characterized by the presence of cone scales with a terminal umbo, constitutes a monophyletic clade weakly supported (68%). Within section *Strobus*, subsect. *Cembrae* forms a well resolved monophyletic clade within a poorly resolved paraphyletic subsect. *Strobi*. Species representing section *Parrya*, *P. gerardiana* and *P. bungeana*, form a well supported (95%) monophyletic subsect. *Gerardianae*. Relationships of other members in section *Parrya*, in subsection *Cembroides* and *P. aristata* and *P. rzedowskii* from subsections *Balfourianae* and *Rzedowskianae*, although resolved are poorly supported. Within subgenus *Pinus*, monophyly of *P. canarienses* and *P. roxburghii* (subsect. *Canarienses*) is strongly supported (93%). Subsection *Pinus* is not monophyletic but some nodes are well supported. *Pinus halepensis* and *P. pinea* presented a sister relationship. The remaining resolved clades are not supported.

### Taxonomic Congruence

The strict consensus of all 168 trees obtained from both ITS and morphological data is resolved at only seven branches. One branch separates *Pinus* from *Cathaya* and *Picea*, two branches corresponded to the monophyly of each subgenera, a fourth corresponded to subsect. *Strobus* a fifth to subsect. *Gerardianae*, a sixth separated

**Figure 2. 2.** Strict consensus tree of 24 equally parsimonious trees obtained from the morphological data set for 46 pine species plus *Cathaya argyrophylla* and *Piceae mexicana* as outgroups. Numbers above the branches are bootstrap values from 100 replicates numbers below the branches are bootstrap values from the ITS and the combined analyses. Asterisks were used for bootstrap support lower than 5%. Corresponding subsections following Price et al. (1999) treatment of the genus are depicted grouping the species.





three pine species in subsect. *Cembroides* (*P. cembroides*, *P. culminicola* and *P. johannis*) and finally another branch segregated *P. nelsonii* in a basal position to all soft pines. The lack of resolution in the strict consensus tree reflects the lack of agreement between both sets of MPTs and the lack of resolution within each data set.

**Constrained Topologies.** The results of constraint analyses are summarized in Table 2.3. Four conflicting clades with bootstrap support over 60% were detected: 1) the *P. albicaulis* and *P. cembra* clade with 98% bootstrap support in the ITS region phylogeny, is in conflict with the sister relationship of *P. albicaulis* and *P. pumila* (with 66% bootstrap support) in the morphological topology. 2) a clade with 65% bootstrap support in the morphological phylogeny, for the sister relationship of *P. sylvestris* and *P. resinosa* is in conflict with a well supported clade in the ITS topology (86%) that includes *P. sylvestris* and *P. thunbergii*, 3) the monophyly between *P. roxburghii* and *P. canariensis*, highly supported in the morphological analysis (93%), is in conflict with the sister relationship of *P. roxburghii* with the North America hard pines clade (94%) and the sister relationship between *P. canariensis* and *P. pinaster* (83%), 4) the position of *P. tropicalis* as the sister species of *P. merkusii* obtained in the morphological analysis (81%) was on conflict with the position of the later species on the ITS data set. Constrains tested from traditional pine classifications were: the monophyly of subsect. *Canarienses* and subsect. *Cembrae* on the ITS data set and the monophyly of subsection *Ponderosae* on the morphological data set. The hypothesized position of subsection *Contortae* as sister group to the remaining North American members of Subgenus *Pinus*, found in a phylogenetic analysis of cpDNA RFLPs (Krupkin et al. 1996), and the monophyly of subsect. *Cembroides* These last two constraints were tested on both data sets separately.

Five of the sixteen tested constraints resulted in significant differences from the corresponding MPT with the Templeton test (Table 2.3.). Constraining the sister relationship of *P. albicaulis* and *P. pumila*, increased the length of the ITS data MPTs by 16 steps ( $p < 0.05$ ), while constraining the sister relationship of *P. albicaulis* and *P. cembra* in the morphological data set increased the tree length by only two steps (n.s.). Constraining *P. canariensis* and *P. pinaster* in the morphological data set generated a

Table 2.3.- Results of constraint analyses. Phylogentic relations obtained from one data set analysis (ITS sequences = Molecular analysis, Morphology= Morphological analysis) constrained to monophyly on the alternative data set. Hypothesis of pine taxonomy were enforced as constraints. Tree length of the obtained most parsimonious constraint trees and number of extra steps to the original most parsimonious trees. Asterisked values indicate significant differences, from Templeton tests, between the most parsimonious and at least one constraint tree obtained.

Source of constraint	Taxonomic group constraint to monophyly	Enforced on Data Set	Length of tree	No. of extra steps
ITS sequences	<i>P. albicaulis</i> + <i>P. cembra</i>	Morphology	447	2
56 ITS sequences	<i>P. albicaulis</i> + <i>P. cembra</i> + <i>P. ayacahuite</i>	Morphology	454	9
ITS sequences	<i>P. sylvestris</i> + <i>P. thunbergii</i>	Morphology	448	3
ITS sequences	<i>P. canariensis</i> + <i>P. pinaster</i>	Morphology	460	15*
ITS sequences	<i>P. roxburghii</i> + North America Hard pines	Morphology	456	11
ITS sequences	<i>P. kesiya</i> + <i>P. merkusii</i> + <i>P. resinosa</i> + <i>P. sylvestris</i> + <i>P. thunbergii</i> + <i>P. tropicalis</i>	Morphology	446	1
ITS sequences	Subsect. <i>Ponderosae</i>	Morphology	446	1
Krupkin <i>et al</i>	Subsect. <i>Contortae</i> sister group of all North American hard pines	Morphology	446	1

Table 2.3 (continued)

Source of constraint	Taxonomic group constraint to monophyly	Enforced on Data Set	Length of tree	No. of extra steps
Taxonomy	Subsect. <i>Cembroides</i>	Morphology	450	5
Morphology	<i>P. albicaulis</i> + <i>P. pumila</i>	ITS sequences	814	16**
Morphology	<i>P. sylvestris</i> + <i>P. resinosa</i>	ITS sequences	806	8
Morphology	<i>P. canariensis</i> + <i>P. roxburghii</i>	ITS sequences	809	11*
Morphology	<i>P. tropicalis</i> + <i>P. merkusii</i>	ITS sequences	800	2
Krupkin <i>et al</i>	Subsect. Contortae sister group of all North America hard pines	ITS sequences	802	4
Taxonomy	Subsect. <i>Cembroides</i>	ITS sequences	811	13*
Taxonomy	Subsect. <i>Cembrae</i>	ITS sequences	809	11*

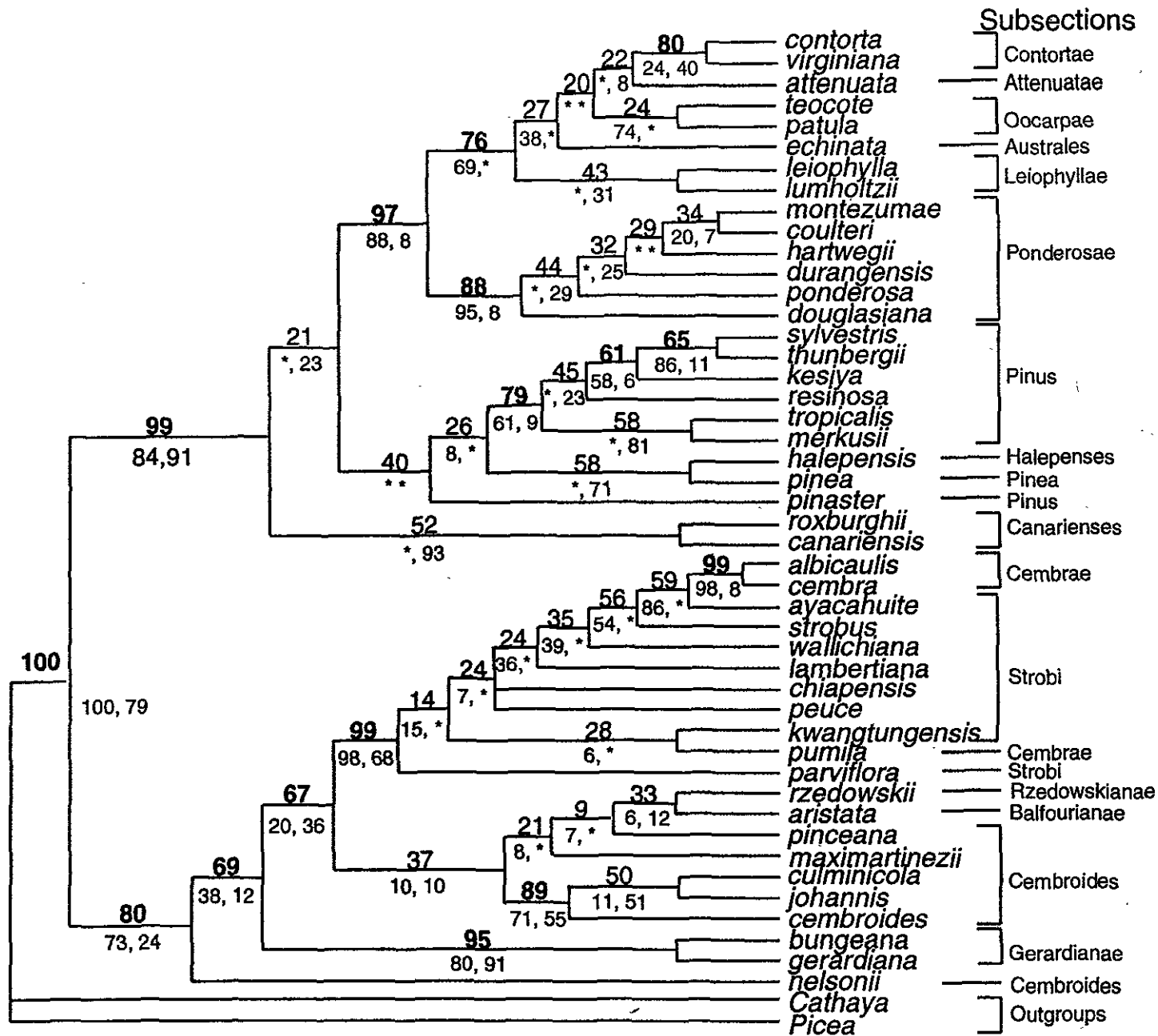
difference of 15 steps on the MPTs ( $p < 0.05$ ), and constraining *P. roxburghii* with the North American hard pines increased the trees length by 11 steps (n.s). *Pinus canariensis* and *P. roxburghii* as sister species in the ITS data set increased the number of steps by eleven ( $p < 0.05$ ). Significant differences ( $p < 0.05$ ) resulted also from constraining subsect. *Cembrae* in the ITS increasing 11 steps, and from constraining subsect. *Cembroides* in the ITS data set, increasing the tree length in 13 steps.

### Character Congruence

**Incongruence Length Difference.** The ILD test showed a *P* value of 0.01 indicating strong incongruence between data sets. Cunningham (1997) concluded from a comparison of three different methods for assessing incongruence between data sets, that the ILD test performed the best in detecting incongruence levels that would reduce phylogenetic accuracy on the combined analysis with *P* values less than 0.01. He suggested not to combine different data sets if ILD values exceed 0.01, because a combined analysis of strongly incongruent data partitions can reduce phylogenetic accuracy. Thus the ILD test results alone suggest that the ITS region and the morphological data sets should not be combined. Other incongruence tests showed different results (see below). Despite the incongruence indicated by the ILD test we proceeded to combine partitions, anticipating that new associations, the nature of the conflict, and / or robust clades would be uncovered.

**Combined Phylogeny.**— The combined analysis included 283 parsimony-informative characters and yielded two equally MPTs differing only in the position of *P. chiapensis* and *P. peuce*. Figure 3 shows the strict consensus with corresponding subsection assignment. Subgenus *Pinus* was strongly supported (99% bootstrap) as a monophyletic clade as well as subgenus *Strobis* (80%). Section *Pinus* and *Strobis* are also monophyletic but section *Parrya* is paraphyletic. The combined phylogenetic hypothesis presented more monophyletic subsections than either separate data set topologies (Table 2.4).

**Figure 2.3.** Strict consensus tree of 2 equally most parsimonious trees obtained from the combined data set for 46 pine species plus *Cathaya argyrophylla* and *Piceae mexicana* as outgroups. Numbers above the branches are bootstrap values from 100 replicates, numbers below the branches are bootstrap values from the ITS and the morphological analyses separated by a “,”. Asterisks were used for bootstrap support lower than 5%. Corresponding subsections following Price et al. (1998) treatment of the genus are depicted grouping the species.



**Table 2.4.** Summary of Subsection relationships in strict consensus cladogram topologies. Only Subsections with two or more representative species are shown. Abbreviations: mono= monophyletic, para= paraphyletic, poly = polyphyletic.

Subsection	Data set		
	ITS	Morphology	Combined
Pinus	poly	poly	poly
Canarienses	poly	mono	mono
Contortae	poly	mono	mono
Ponderosae	mono	poly	mono
Oocarpae	mono	poly	mono
Leiophyllae	para	mono	mono
Cembroides	poly	poly	para
Gerardianae	mono	mono	mono
Strobi	poly	para	poly
Cembrae	poly	mono	poly

**Inspection And Assessment Of Support.**— Differences in significant details were found in the most parsimonious topologies from morphological data, ITS, and combined analyses. All the conflicting nodes from separate analyses that had bootstrap support, tested as constraints in the rival data set, were resolved in the combined topology sometimes favoring the relationship observed in the ITS and others the one in the morphological analysis. All these had a reduction in their bootstrap support as expected from conflicting nodes. The ITS phylogeny had a total of 23 nodes supported with bootstrap values  $\geq 50\%$ . From these, ten increased their bootstrap support in the combined analysis, four had a decrease and nine lost their support. One node present in the ITS reconstructions with no support gained it in the combined tree. From 13 supported nodes ( $\geq 50\%$  bootstrap) in the morphological phylogenetic reconstructions, six increased their bootstrap support in the combined topology, four decreased and three lost their support. Four nodes from the morphological trees, shared with the combined topology that had not support gain it. Despite the conflicting nodes from the separate analyses, the combined topology is well resolved with several moderately to well supported nodes. It shares features of both groups of individual trees and has some unique structure. All of the nodes shared by both topologies increased their bootstrap values in the combined analysis and there was a gain of support in three nodes that did not have support in separate analyses. This is the case of the position on *P. nelsonii* as the sister group of the rest of the soft pines, and the monophyly of subsect. *Contortae*. Still, some conflicting relationships were not resolved in the combined analysis.

**Templeton Test.** — Results of the Templeton test are summarized in Table 2.5. The ITS data set significantly favored its MPTs over the trees derived from other data sets. Conversely, the morphological data set favored its MPTs over the ITS MPTs, but no significant differences were found for the combined MPTs. Therefore the morphological data set does not conflict with the MPTs of the combined analysis. To establish whether one of the data sets had a stronger influence on the combined phylogenetic analysis,



**Table 2.5.** Results from the Templeton test. The set of most parsimonious trees (=MPT) from each data set, tested against the most parsimonious trees from alternative data sets. Gain= number of steps increased, Loss= Number of steps decremented, Net = difference between steps gain and loss, N= total number of changes. Asterisked values indicate significant differences.

Data set	Rival tree	Number of steps				
		Gain	Loss	Net	N	p
<b>ITS</b>	MPT Morphology	81	5	76	86	<0.0001*
	MPT Combined	37	14	23	51	0.0021*
<b>Morphology</b>	MPT ITS	37	7	30	44	<0.0001*
	MPT Combined	23	13	10	36	NS
<b>Combined</b>	MPT ITS	48	41	7	89	NS
	MPT Morphology	80	26	54	106	<0.0001*

the Templeton test was also performed with the combined data set. The comparison against the morphological MPTs showed highly statistically significant ( $P \leq 0.0001$ ) differences. The comparisons against the ITS MPTs showed congruence.

## 2.5 Discussion

### Phylogenetic Reconstructions And Levels Of Incongruence

The inference of *Pinus* phylogenetic relationships using a taxonomic congruence approach resulted in a poorly resolved consensus tree and in a great information loss. As recognized by Swofford (1991), consensus trees are simple statements about areas of agreement among trees; they should not be interpreted as phylogenies. Consequently, few statements about pine phylogenetic relationships should be made based on the consensus tree resulting from the taxonomic congruence approach. It has been postulated that congruence among independent data sets might provide the strongest evidence that a proposed phylogeny is accurate (Penny and Hendy, 1986; Hillis, 1987; Swofford, 1991; Miyamoto and Fitch, 1995; Huelsenbeck et al., 1996; but see Kluge, 1998). Considering the consensus tree obtained from the taxonomic congruence approach only six groups within the genus would qualify as reliable. However, if we only consider the strong and moderately supported branches as acceptable evidence for phylogenetic reconstruction, we could argue that trees obtained from both separate analyses are in general mutually consistent. From a total of 20 clades showing bootstrap values  $>70\%$  from both separate phylogenetic reconstructions (five in the morphological analysis and 15 in the molecular analysis), five are in conflict. Therefore, disagreement between shortest trees from independent data sets is due mainly to conflicting clades that are not highly supported. This partially explains why combining the two data sets produces a better resolved phylogeny than the strict consensus tree from independent reconstructions.

Different measures of incongruence yielded different results in this study. Moreover, within the same analysis of congruency (Templeton test), different outcomes

were obtained depending on the data set tested. Since no single index can adequately characterize character congruence (Swofford, 1991; Omland, 1994), different methods for detecting incongruence must be used. This emphasizes the problem of objectively deciding whether or not to combine in borderline cases, and illustrates the arbitrariness of a decision conditioned on measurement of incongruence levels.

Incongruence between data sets can have several causes. De Queiroz et al. (1995) recognized three general and not mutually exclusive reasons why trees estimated from two or more data sets might differ: 1) sampling error (limited number of characters and/or taxa sampled); 2) different stochastic processes acting on the characters; and 3) different histories. Sampling error was apparently the cause of some conflicting clades. The monophyly of subsection *Pinus*, (excluding *P. pinaster*), the sister relationship between *P. contorta* and *P. virginiana*, and the sister relationship between *P. albicaulis* and *P. cembra*: Those were poorly to moderately supported by a single data set and emerged in the combined analysis with a notable increase of support. This suggests that the resulting increase in sample size of the data set for each taxon, when data sets are combined tends to reduce the error associated with homoplasious character variation.

Related to different stochastic processes influencing character evolution, parallel evolution was detected as a possible source of incongruence in the morphological analysis, particularly among the members of subsect. *Cembrae*. The combined analysis suggests that shared morphological features between *P. pumila* and the other members of *Cembrae* particularly with *P. albicaulis*, represent homoplasies due to parallel evolution, while the same group of features in *P. cembra* and *P. albicaulis* represent synapomorphies reinforced in the combined analysis. There is no evidence for other potential causes of incongruence such as different branching histories or for horizontal transfer in the sampled species.

A criticism of the total evidence approach is that molecular data will dominate the results because morphological characters are usually fewer (Hillis, 1987; Patterson et al., 1993; but see Baker et. al., 1998). It has also been suggested that weighting underrepresented characters may avoid this problem, although assigning weights has

always been a controversial issue (Donoghue and Sanderson, 1992; Allard and Carpenter, 1996; Haszprunar, 1998). In the combined analysis, all characters were assigned equal weights and the resulting phylogenetic hypotheses showed no dominance of either data set. From a total of 43 resolved nodes present in the strict consensus topology of the combined analysis, seven were present in the strict consensus of the morphological analysis (from a total of 28), 13 were in the strict consensus of the ITS analysis (from a total of 35), seven were shared by both strict consensus and 15 represented novel associations. The fact that the molecular phylogeny has not overwhelmed the morphological data set despite their size differences, is explained by arguing that some nodes in the molecular analysis were supported by only a few character changes; such that the addition of a few morphological characters may change the balance in favor of a new tree. This effect would be even more pronounced if the molecular characters in question were homoplasious. To modify one or both of the data sets by character weighting, or by excluding sets of characters or groups of taxa to better fit the data to a reconstructed model, would require clear identification of particular characters causing incongruence in each data partition. Because we can only partially assess the source of incongruence, and since overall homoplasies might be helpful to resolve pines phylogeny in certain subclades, we prefer to present all available information in separate and combined analyses and from these detect well supported groupings and better resolved topologies.

#### Classification and pine evolution

The phylogenetic reconstruction obtained from the combined analysis supports more monophyletic subsections (six) recognized in traditional pine classification than do either morphological or ITS region reconstructions alone (Figs. 1 - 3). Monophyly of subsections *Gerardianae*, *Contortae* and *Ponderosae* are well supported in the combined analysis (95%, 80% and 88%, respectively). Section *Strobus* is monophyletic (99%) and subsection *Pinus* (if we exclude *P. pinaster*) as well as subsection *Canarienses* (79 % and

52%). Subsections *Oocarpae* and *Leiophyllae* are also monophyletic in the combined analysis although with no support (24% and 43% respectively). The combined analysis does not support the exclusion of *P. merkusii* from subsect. *Pinus* as suggested by Wang and Szmidt (1993), Price et al. (1998) and Liston et al. (1999). The exclusion of *P. nelsonii* from subsect. *Cembroides* has been proposed by several authors (Farjon 1984, 1996; Malusa, 1992; Pérez de la Rosa et al., 1995; Farjon and Styles, 1997) and it is supported by our results.

Of the conflicting positions between separate data sets, one of the most interesting is that of *P. roxburghii*, *P. canarienses* and *P. pinaster*. Many morphological characters including adnate seed wing and wood anatomy, are shared by *P. roxburghii* and *P. canarienses*, that constituted a well supported monophyletic clade in the morphological analysis. The ITS MPTs associates *P. canariensis* with *P. pinaster* and *P. roxburghii* basal to all North American hard pines in highly supported relationships. The conflict is still reflected in the combined topology showing a poorly supported intermediate position in the hard pines.

The position of species in subsect. *Cembrae* corroborates results obtained by Liston et al. (1999). A derivation of the stone pine species from subsect. *Strobi* is consistent with the absence of fossil cones ascribed to subsect. *Cembrae* from the Tertiary in North America (Axeirod, 1986), and from Eurasia, where the oldest fossil evidence is from the Paleogene (Gaussen, 1960). The mountain stone pine *P. pumila* did not group with the other stone pines in the combined analysis, supporting the hypothesis that its similar cone and seed morphology resulted from parallel evolution associated with bird dispersal. Relatively big wingless seeds and cones that retain seeds at maturity, morphological adaptations for bird dispersal (Tomback and Linhart, 1990), are features that have evolved several times in the genus. Twice from a white pine ancestor with a terminal umbo cone scale: once leading to *P. pumila* and the other to *P. albicaulis* and *P. cembrae*. In pines possessing dorsal umbo cone scales, bird dispersal adaptations were derived once in subsect. *Cembroides* and again in *P. pinea*. Liston et al. (1999) hypothesized a North American origin of *Cembrae* from North American white pines, this scenario is sustained by the combined phylogeny, however

ancient fossils of a North American stone pine have not been discovered (Axelrod, 1986). The inclusion of *P. sibirica* and *P. koraiensis*, the two unsampled species of subsect. *Cembrae* would help to identify possible migration routes.

This work presents evidence that the two widely recognized subgenera in *Pinus* are monophyletic. The presence of a single vascular bundle is a symplesiomorphic condition shared with both *Picea* and *Cathaya* presumed sister groups of pines. The derived condition of the hard pines (two vascular bundles) has evolved only once within the genus. Given the monophyly of the genus and the basal position of pines in section *Parrya* in the combined topology, as well as the fossil evidence (Alvin, 1960; Axelrod, 1986), the ancestral cone form of the genus would have had dorsal umbo cone scales. This character may have contributed extensively to pine radiation after its appearance. Presumably, a dorsal umbo allowed the evolution of a more complex apophyses morphology, permitting these pines to survive in a broader range of climate conditions including frequent fires. Complex apophyses also constitute structures resistant to seed predation (Coffey et al., in press). Ancestral species with intermediate characters, such as the relictual *P. nelsonii* may have been abundant when the two main subgenera of *Pinus* were not distinct, and subsequently, a diversification occurred leading to the two well differentiated pine groups: pines in subgenus *Pinus* maintaining the dorsal umbo and having two vascular bundles, and pines in subgenus *Strobus* with species in section *Parrya* also conserving the dorsal umbo and the pines in section *Strobi* with terminal umbo. A monophyletic section *Strobus* grouping pines with a terminal umbo cone scale, presenting a derived position within subgenus *Strobus* is consistent with the fossil record. The Cretaceous fossil record of section *Strobus* is relatively poor. *Pinus magothesis* (Penny, 1947) from the late Cretaceous is one of the few specimens representing these pines. However given the early evolution pines with dorsal umbo from both subgenera, it may not be needed to assign the oldest fossils to a particular subgenus either to subsections.

In Subgenus *Pinus*, the basal position of Subsection *Pinus* and the relationships among the Mediterranean pines (*P. pinaster*, *P. pinea*, *P. halepensis*, *P. canariensis* and *P. roxburghii*), provides corroboration for an early differentiation of the subgenus

along the Tethys seaway during the Cretaceous proposed by Klaus (1989) and Millar (1998). Putative parallel evolution between North American hard pines and some pines in subsect. *Pinus*, is explained by shared plesiomorphic characters mainly related to cone morphology. These characters may have contributed to a later diversification of pines during the middle Eocene in an environment subject to recurrent fires when an extension of dry climate in southwest North America occurred. The derived position of most North American hard pines suggest that this group may have a more recent evolutionary history than previously thought. Fossil cones ascribed to this subsection should be re examined as they may be related to *P. pinaster*. The position of subsect. *Oocarpae* supports the hypothesis that this is a derived group that originated in North American Eocene refugia (Axelrod, 1986; Millar, 1993;1998), probably from an ancestral species common also to the Ponderosa group. This idea is not in agreement with Mai (1989), who suggested that the *Oocarpa* group had its origin in subsect. *Pinus*, based on the fossil species *P.\_ooconica* (Klaus, 1980) from Austria. However, this association illustrates that ancestral Eurasian hard pines presented morphological features now observed only in the North American hard pines. Subsection *Contortae* has been hypothesized to have a more ancient history than the one inferred from its relative derived position in the combined phylogeny (Krupkin et al., 1996). However the discrepancy in the position of subsection *Contortae* in the different analyses requires further study.

Our results support the view that pine evolution has been marked by extensive parallelism due to selection pressures probably related to the evolution of novel characters that allowed pine diversification. Extinction of species may still obscure some relationships, the integration of fossils in phylogenetic reconstruction of the group is still lacking and may provide evidence on adaptive episodic evolution. The phylogenetic reconstruction obtained in the study suggests an important effect of natural selection in pine evolution, this interpretation will be tested further as additional data are collected. Evidence from experimental studies may also corroborate the adaptive value of the dorsal umbo cone scale postulated in this work.

## 2.6 Literature cited

- Allard, M. W. and J. M. Carpenter, 1996. On weighting and congruence. *Cladistics* **12**:183-198.
- Alvin, K.L. 1960. Further conifers of the Pinaceae from the Wealden Formation of Belgium. *Bull. Inst. Roy. Sci. Nature. Belgique* **146**:1-39.
- Axelrod, D. I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **73**: 565-641.
- Bailey, D. K. 1970. Phytogeography and taxonomy of *Pinus* subsection *Balfourianae*. *Ann Mo. Bot. Gard.* **57**: 210-249.
- Baker, R. H., X. Yu, and R. Desalle. 1998. Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**: 427-436.
- Bergmann, F. and E. M. Gillet. 1997. Phylogenetic relationships among *Pinus* species (*Pinaceae*) inferred from different numbers of 6PGDH loci. *Pl. Syst. Evol.* **208**: 25-34.
- Bremer, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* **42**: 795-803.
- Buchholz, J.T. 1951. A flat-leaved pine from Annam, Indo-China. *Amer. J. Bot.* **38**:245-252.
- Bull, J.J., J. P. Huelsenbeck, C. W. Cunningham, D. L. Swofford And P. J. Waddell. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 384-397.
- Carvajal, S. and R. Mc Vaugh. 1992. *Pinus*. In *Flora Novo Galiciana: A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico*. Vol. 17 ed. W.R. Anderson, Ann. Arbor. Mi. The University of Michigan Herbarium. Pp 32-100.
- Chaw, S.M., H.M. Sung, H. Long, A. Zharkikh, and W.H. Li. 1995. The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus* and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* **37**: 224-230.
- Chaw, S. M., A. Zharkikh, H.S. Sung, T.C. Lau and W.H. Li. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 56-68.



- Chippindale, P. T. and J. J. Wiens. 1994. Weighting, partitioning and combining characters in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **43**: 278-287.
- Coffey, K., C.W. Benkman and B. G. Milligan (in press). The adaptative significance of spines on pine cones. *Ecology*.
- Critchfield, W. B. 1986. Hybridization and classification of the white pines (*Pinus* section *Strobus*). *Taxon* **35**: 647-656.
- Cunningham, C. W. 1997. Can three incongruence test predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* **14**: 733-740.
- De Queiroz, A. 1993. For consensus (sometimes). *Syst. Biol.* **42**: 368-72.
- De Queiroz, A., M. J. Donoghue and J. Kim. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **26**: 657-681.
- Donoghue M. J. And M. J. Sanderson. 1992. The suitability of molecular and morphological evidence in reconstructing plant phylogeny. Pags. 340-368 In *Molecular Systematics of Plants*. Soltis P. S. Soltis D. E. and J.J. Doyle Eds. Chapman & Hall.
- Dubuisson J.-Y., R. Héban-Mauri, and J. Galtier. 1998. Molecules and morphology: conflicts and congruence within the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae). *Mol. Phy. Evol.* **9**: 390-397.
- Farjon, A. 1984. *Pines: Drawings and Descriptions of the Genus Pinus*. Leiden: E.J. Brill & W. Backhuys.
- Farjon, A. 1990. Pinaceae: Drawings and descriptions of the genera. *Regnum Vegetabile* **121**: 1-330.
- Farjon, A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Bot. J. Linn. Soc.* **121**: 365-384.
- Farjon, A. and T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica Monograph* 75. New York Botanical Garden. 293 p.
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge and C. Bult 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

- Ferre, Y de. 1965. Structure des plantules et systematique de genre *Pinus*. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*. **100**: 230-280.
- Frankis, M. P. 1988. Generic interrelationships in Pinaceae. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* **45**: 527-548.
- Gausson H. 1960. *Pinus*. Pp 1-272 in Les gymnosperms actuelles et fossiles, vol Tome II, Section I Volume I Chapter Xi, Fascicle VI. Toulouse, France: Travaux du Laboratoire Forestier de Toulouse.
- Gernandt, D. S., A. Liston and D. Piñero. 1999. Systematics and evolution of the pinyon pines (*Pinus* subsection *Cembroides* s. l.): insights from the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. XVI International Botanical Congress. Abstracts.
- Govindaraju, D., P. Lewis and C. Cullis . 1992. Phylogenetic analysis of pines using ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. *Pl. Syst. Evol.* **179**:141-153.
- Greguss, P. 1955. Identification of living gymnosperms on the basis of xylotomy. Budapest: Akademia Kiado.
- Hart, J. 1987. A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *J. Arnold Arbor.* **68**: 269-30.
- Haszprunar, G. 1998. Parsimony analysis as a specific kind of homology estimation and the implications for character weighting. *Mol. Phyl. Evol.* **9**: 333-339.
- Hauser, D. L. and W. Presch. 1991. The effect of ordering characters on phylogenetic reconstruction. *Cladistics* **7**:243-265.
- Hillis, D. M.1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 23-42.
- Hillis, D.M. and J.J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogentic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 182-192.
- Hudson, R. H. 1960. The anatomy of the genus *Pinus* in relation to its classification. *J. Inst: Wood Sci.* **6**: 26-46.
- Huelsenbeck, J. P. , J. J. Bull and C.W. Cunningham. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol. Evol.* **11**:152-158.
- Jährig, M. 1962. Beiträge zur Nadelanatomie und Taxonomie der Gattung *Pinus* L. *Willdenowia* **3**: 329-366.

- Johnson, L. A., and D. E. Soltis. 1994. *matK* DNA sequencing and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae *sensu stricto*. *Syst. Bot.* **19**:13-156
- Jones, T. R., A.G. Kluge and A.J. Wolf. 1993. When theories and methodologies clash: a phylogenetic reanalysis of the North American ambystomatid salamanders (Caudata: Ambystomata). *Syst. Biol.* **42**: 92-102.
- Klaus, W. 1980. Neue Beobachtungen zur Morphologie des Zapfens von *Pinus* und ihre Bedeutung für die Systematik, fossil bestimmung, Arealgestaltung and Evolution der Gattung. *Pl. Syst. Evol.* **134**:137-171.
- Klaus, W. 1989. Mediterranean pines and their history. *Plant Syst. Evol.* **162**: 133-163
- Kluge, G. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, serpentes). *Syst. Zool.* **38**:7-25.
- Kluge, G. 1998. Total evidence or taxonomic congruence: cladistic or consensus classification. *Cladistics* **14**: 151-158.
- Koehne, 1893. Deutsche Dendrologie. Stuttgart: Ferdinand Enke.
- Krupkin, A. B., A. Liston and S.H. Strauss. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*) from chloroplast DNA restriction site analysis. *Amer. J. Bot.* **83**: 489-498.
- Krutovskii, K. V., D. V. Politov and Y. P. Altuhnov. 1994. Genetic differentiation and phylogeny of stone pine species based on isozyme locy. Pp 19-30. In Proceedings International Workshop on subalpine stone pines and their environment: the status of our knowledge. September 5-11, 1992. Compilers: Schmidt, W. C. and F.-K. Holtmeier. St. Moritz, Switzerland.
- Larson, A. 1994. The comparison of morphological and molecular data in phylogentic systematics. Pp. 371-390. In *Molecular Ecology and Evolution Approches and Applications*. Eds Schierwater, B. Streit, B. Wagner G.P. & DeSalle R. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Lanyon, J. W. 1966. A card key to *Pinus* based on needle anatomy. New South Wales-Australia: The Hon. J. G. Beale, M.E. M.I.E. Aust. M.L.A., Minister of Consevation.
- Liston, A., W.A. Robinson, D. Piñero and E. R. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **11**: 95-109.

- Little, E. L. Jr. and Critchfield W. B. 1969. *Subdivisions of the genus Pinus*. USDA Forest Service Miscellaneous Publication 1144. Washington D:C.
- Mai, D. H. 1989. On the history of pines (*Pinus* L.) in Europe. Pp. 299-309. *In the Proceedings of the symposium "Paleofloritics and Paleoclimatic changes in the Cretaceous and Tertiary*.
- Malusa, J. 1992. Phylogeny and biogeography of the pinyon pines (*Pinus* susect. *Cembroides*). *Syst. Bot.* **17**:42-66.
- Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos, ed 2. Mexico City .Ediciones Botas. 368 p.
- Mason-Gamer, R. J. and E. A. Kellogg. 1996. Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae). *Syst. Biol.* **45**: 524-545.
- Mickevich, M. F. and J. S Farris. 1981. The implications of congruence in *Menidia*. *Syst. Zool.* **30**: 351-370.
- Millar, C.I. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus* L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **80**: 471-498.
- Millar, C.I. 1998. *Early evolution in pines*. Pp. 69-91. *In Ecology and Biogeography of Pinus*. Ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Miyamoto, M. M. and W. M. Fitch. 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Syst. Biol.* **44**: 64-76.
- Moran, G. F., D. Smith, J. C. Bell and R. Appels. 1992. The 5SRNA genes in *Pinus radiata* and the spacer region as a probe for relationships between *Pinus* species. *Pl. Syst. Evol.* **183**: 209-221.
- Morgan, D. R. 1997. Decay analysis of large sets of phylogenetic data. *Taxon* **46**: 509-517.
- Omland, K. E.1994. Character congruence between molecular and morphological phylogeny for *Dabbling ducks (Anas)*. *Syst. Biol.* **43**:369-386.
- Page, R. D. 1996. On consensus, confidence and "total evidence". *Cladistics* **12**: 83-92.
- Patterson, C., D. M. Williams and C. J. Humphries. 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 153-188
- Penny, J. S. 1947. Studies on the Magothy flora. *Am. Jour. Bot.* **34**: 281-296.
- Penny, D. and M. D. Hendy 1986. Estimating the reliability of evolutionary trees. *Mol. Biol. Evol.* **3**: 403-417.

- Perez de la Rosa, J., S. A. Harris and A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor Appl. Genet.* **91**:1101-1106.
- Perry, J. P. Jr. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Portland, Oregon: Timber Press. 231 p.
- Price, R. A., A. Liston and S.H. Strauss. 1998. Phylogeny and Systematics of *Pinus*. Pp 49-68. *In Ecology and biogeography of Pinus*. Ed. D.M. Richardson. Cambridge University Press.
- Piovesan, G., C. Pelosi, A. Schirone and B. Schirone. 1993. Taxonomic evaluations of the genus *Pinus* (Pinaceae) based on electrophoretic data of salt soluble and insoluble seed storage proteins. *Pl. Syst. Evol.* **186**: 57-68.
- Sanderson, M. J. 1989. Confidence limits on phylogenies: the bootstrap revisited. *Cladistics.* **5**:113-129.
- Saylor, L. C. 1964. Karyotype analysis of *Pinus*-- group Lariciones. *Silvae Genet.***13**:165-170.
- Saylor, L. C. 1972. Karyotype analysis of *Pinus*--Subgenus *Pinus*. *Silvae Genet.* **21**:155-163.
- Saylor, L. C. 1983. Karyotype analysis of *Pinus*-- subgenus *Strobus*. *Silvae Genet.* **32**: 119-124.
- Shaw, G. R. 1914 *The Genus Pinus*. Publications of the Arnold Arboretum 5. Forage Village, Massachusetts: The Murray Printing Co.
- Schirone, B. G. Piovesan, R. Bellarosa and C. Pelosi. 1991. A taxonomic analysis of seed proteins in *Pinus* spp. (Pinaceae). *Pl. Syst. Evol.* **178**: 43-53.
- Shurkhai, A., A. Podogas and L. Zhivotovsky. 1992. Allozyme differentiation in the genus *Pinus*. *Silvae Genet.* **41**: 105-109.
- Siddall, M. 1997. Prior agreement: arbitration or arbitrary?. *Syst. Biol.* **46**: 765-769.
- Strauss, S. H. And Doerksen, A.H. 1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* **44**: 1081-1096.
- Styles, B. T. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican purview. Pp 397-420. *In Biological Diversity of Mexico:Origins and Distribution*. Eds. T. P. Ramamoorthy et al. New York: Oxford University Press.
- Swofford, D. L. 1991. When are Phylogeny Estimates From Molecular and Morphological Data Incongruent? Pp. 295-333. *In Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Eds. M.M. Miyamoto and J. Cracraft. Oxford University Press, New York.

- Swofford, D.L. 1998. PAUP\*, Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 . Sunderland, MA: Sinauer.
- Templeton, A.R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. *Evolution* **37**: 221-244.
- Tomback, D. F. and Y. B. Linhart. 1990. The evolution of bird-dispersed pines. *Evol. Ecol.* **4**: 185-209.
- Tsumura, Y., K. Yoshimura, N. Tomaru and K Ohba. 1995. Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR amplified specific chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.* **91**:1222-1236.
- Van Der Burgh, J. 1973. Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia" zu Herzogenrath, "Zukunft West" zu Eschweiler und "Victor" (Zülpich Mitte) zu Zülpich. Nebster einer systematish-anatomischen Bearbeitung der Gattung *Pinus* L. *Rev. Paleobot. Palynol.* **15**: 73-275.
- Wang, X.-R. and A. E. Szmidt. 1993. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian species (Pinaceae). *Pl. Syst. Evol.* **188**: 197-221.
- Wang X.-R., Y. Tsumura, H. Yoshimaru, K. Nagasaka & A. E. Szmidt. (in press). Phylogenetics relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer and *trnV* intron sequences. *Am J. Bot.* (in press).
- Wheeler, W. C., J. Gatesy and R. DeSalle. 1995. Ellison: a method for accomodating multiple molecular sequence alignements with alignment-ambiguous sites. *Mol Phylogenet. Evol.* **4**: 1-9.
- Wu, H. and Z. Hu. 1997. Comparative antomy of resin ducts in Pinaceae. *Trees* **11**: 135-143.
- Yoshie, F. and Sakai A. 1985. Types of Florin rings, distributional patterns of epicuticular wax, and their relationships in the genus *Pinus*. *Can. J. Bot.* **63**: 2150-2159.

## 2.7 Appendix

### Morphological characters

All characters were analyzed as equally weighted and unordered in the first analysis, after that 12 characters were ordered, indicated in the descriptions, also 4 characters not independent were down-weighted, or excluded. A “?” was used when no data were collected (either because that structure was not available on a particular specimen, or a character could not be evaluated for a species). The data for the outgroup were taken from Farjon (1990) and Buchholz (1951). Main references for characters are as follows: characters 1, 3 to 7, 9, 16 to 18, 22 to 29, 31 to 34, 36, 37, 39, 40, 43 to 50, 62, 63, 66 and 67 from: Farjon (1984); Farjon and Styles (1997); Gaussen (1960); Martínez (1948); and Perry, (1991). Character 8 from Bailey (1970). Stomata characters 10 to 15 represent new observations although some specimens were obtained from Yoshie and Sakai (1985). Characters 19 to 27 from Jählig (1962); and Lanyon (1966). Character 30 from Shaw (1914); and Van der Burgh (1973). Character 33 from Malusa, (1992). Characters 36, 41, 42, 49, 65, 68 and 69 from Klaus (1989). Characters 52 and 53 from Greguss (1955). Characters 52 to 61 from Hudson (1960); and Van der Burgh (1973). Character 64 from de Ferrè (1965). Character 70 from Saylor, (1964, 1972, 1984). Conflicting character descriptions were reviewed and missing characters were compiled by personal observations.

### FASCICLES AND NEEDLES

1. Fascicle bract-base. (0) Non decurrent: The bract bases gradually become submerged into and form a part of the smooth bark on the young branchlet; (1) Decurrent: bases of the leaf bracts become dry and scaly and eventually fall from the branchlet, leaving the surface very rough.

2. **Prophylls.** Each dwarf shoot has initially two opposite scales, termed prophylls, followed by 5-13 spiral arranged, scaly cataphylls, forming the sheath. (0) Absent: only in *Pinus* are observed; (1) Weakly keeled: the keel is very inconspicuous only visible in a stereoscopic microscope; (2) Strongly keeled: very conspicuous keels are formed by the prophylls, they can be seen with the naked eye.
3. **Bracts (cataphylls).** (0) Straight: the tip of the fascicle bract is mainly rectilinear or erect; (1) Re-curved: the tip of the bract curls backwards.
4. **Sheath (ordered).** (0) Deciduous: the scale leaves that forms the needle sheath falls early; (1) Persistent: the sheath stays with the needle fascicle until it falls; (2) Forming a rosette: the scales curl back and persist forming a rosette.
5. **Reduction of sheath length.** (0) The length of the needle sheath remains constant. (1) Present: when the sheath is a few months old it shrinks. (Carvajal and Mc Vaugh, 1992). It was distinguished as state 2 if at maturity they were at least 30 % shorter in length than in youth.
6. **Number of needles per fascicle.** (0) More than 10; (1) five; (2) three; (3) two; For the character state (0), the number of leaves per shoot, was considered an homologous character state to the number of needles per fascicle, since the needle fascicle of pines represent a dwarf shoot. This character was codified considering the prevalent needle number for each species.
7. **Heteromerous fascicles.** The number of needles in the fascicle is virtually constant in many species, whereas in others they are variable (Shaw, 1914) (0) homomerous; (1) heteromerous.
8. **Resin droplets in needle surface:** (0) absent; (1) present.



9. Stomata position. (0) Epistomatic; (1) Amphistomatic.
10. Epicuticular wax distribution (ordered). (0) Waxes are deposited in the epistomatal chamber and on stomata rows; (1) Waxes are deposited in epistomatal chambers and around it; (2) Waxes are deposit in epistomatal chambers and sparsely on stomata rows; (3) Waxes are deposited only rarely in epistomatal chamber.
11. Florin ring (ordered). The Florin ring is a term applied to a raised ring produced by the cells encircling the stomata in the leaves of conifers. (0) None or very gently raised; (1) Low raising (2) A continuum raising ring producing volcanic shape; (3) Ring raising steeply preventing the visualization of the proximal portion of the ring.
12. Shape of opening Florin ring. (0) Circular or slightly oval; (1) Rectangular.
13. Surface of Florin ring (ordered). (0) Even: the needle surface surrounding the Florin ring is uniform; (1) Lightly sunken: the needle surface surrounding the Florin ring is slightly depressed in relation to the rest needle surface; (2) Sunken: the needle surface surrounding the Florin ring is clearly depressed in relation to the rest needle surface; (3) Very sunken: the needle surface surrounding the Florin ring is substantially depressed in relation to the rest needle surface, in this cases the Florin ring is hard to see.
14. Cuticular bridges between Florin rings. (0) Present: elevated structures formed with cuticle are observed on the stomata rows, between the rings. Most of them are irregular; (1) Absent: the general surface on the stomata lines between Florin rings is flat.
15. Furrows between stomatal rows (ordered). (0) Absent: the general needle surface between stomata rows is flat;. (1) Slightly developed: grooves or ridges raised in

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

parallel to the stomata rows; (2) Well developed; grooves or ridges are clearly developed in parallel to the stomata rows.

16. Needle margin. (0) Entire; edge smooth; (1) Serrulate: small dentations present.
17. Needle. (0) Straight; (1) Curved.
18. Needle cross section shape(excluded). (0) Flat; (1) Triangular; (2) Semicircular: cross section shape. This characters is related to needle number, more than two needles correlates with a triangular cross section.
19. Epidermis cells elongation (ordered). (0) Isodiametric: most epidermal cells are square having the same diameter in all faces; (1) periclinal: epidermal cells are rectangular, more long than tall, transversally oblong; (2) anticlinal: epidermal cells are more tall than long. oblong either rectangular or elliptic.
20. Hypodermis layers (ordered). (0) Mostly one cell; (1) Mostly two cells; (2) More than two cells.
21. Hypodermis type. (0) Uniform: the walls of all the cells are of uniform thickness; (1) Biform: there is a layer of comparatively thin walled calls adjacent to the epidermis, followed by one or more rows of comparatively thick cells; (2) Multiform: the thickness of the walls of succeeding rows of cells from the outside progressively increases.
22. Hypodermal intrusion in mesophyll. (0) Absent; (1) Present: the hypodermal cells reaches the endodermis across the mesophyll in some points.
23. Resin ducts position (primarily). (0) External: against the outer cells (the hypoderm); (1) medial: not touching the hypoderm nor the endoderm; (2) internal: touching the cells surrounding the fibrovascular bundle (the endoderm); (3) septal: touching both, the endoderm and the hypoderm cells.

24. Endodermis shape in a cross section. (0) Circular; (1) Triangular and or triangular with an elongated base; (2) Half elliptical to elliptical; (3) Slightly kidney shaped.
25. Endodermis outer walls cells. (0) Thin; the outer wall is the same width than the inner wall ; (1) Thick: the outer wall is at least twice wider than the inner wall.
26. Sclerenchyma. (0) Absent: very few single cells forming the parenchyma have thick walls. (1) Adjacent row of sclerenchyma cells with thick walls are present under the vascular bundle (s); (2) Rows on both sides of the vascular bundle(s); (3) In-between and on both sides of the vascular bundles, this is found only in diploxylon pines.
27. Vascular bundles. (0) Haploxyton: a single vascular bundle in each needle; (1) Diploxyton: two vascular bundles in each needle.
28. Vascular bundles. (0) Single to avoid independence this was coded as "?"; (1) Connate: two vascular bundles are touching each other; (2) Distinctly separate.
29. Connate needles. (0) needles from a single fascicle are separated; (1) The needles in a single fascicle are attached giving the appearance of a single needle .

#### CONE AND SEEDS

30. Conelet scale. (0) Entire: the terminal margins of the megastrobilous scale are rounded; (1) Tuberculate: a long appendix suddenly emerges; (2) Short mucronate: a very short prickle; (3) Long mucronate, a long and strong prickle; (4) Spinescent ; the elongation of the conelet scale is gradual .
31. Cone shape. (0) Straight: the general shape of the cone, product of the form of its axis is straight or very slightly curved; (1) Curved: cones are commonly clearly bent.
32. Cone dehiscence (ordered). (0) Dehiscent soon: for species where most of their cones open within a year after maturation; (1) Late dehiscent: when cones takes longer than a

year to open.; (2) Serotinous: for cones that persist firmly attached to the branches for several years, remain closed and open after exposure to high temperature; (3) Disintegrating: cones do not open, they fall apart. All these characters are considered homologous states since they are the result of the degree of attachment of the scales and the cone axis.

33. Cone's resin (ordered). (0) Not resinous or rarely resinous; (1) Intermediately resinous; (2) Very resinous.
34. Cone scales. (0) Not woody: cones scales without sclerification; (1) Woody: sclerified cones scales.
35. Cone scales. (0) Thin: like in *P. monticola*; (1) Thick; Like in *P. albicaulis*.
36. Umbo (down weighted). (0) Terminal: when the scale grows predominantly to the length and pushes the umbo (exposed part of the conelet scale that represents the first year growth of the cone (Klaus 1980) to the front; (1) Dorsal: when the cone scales grow to all sides of the umbo leaving concentric rings around the umbo.
37. Apophysis margin. (0) Free: the edge of the apophysis is not in contact with other apophyses in the closed mature cone; (1) Joined: the edge of the apophysis is in contact with other apophyses.
38. Apophysis shape. (0) Monomorph: all the apophyses in the cone had the same general shape; (1) Strongly heteromorph: the shape of the apophyses commonly varies in relation to its position within the cone.
39. Spine (ordered). (0) Absent: umbo unarmed; (1) Small: this spine may be persistent or soon deciduous; (2) Stout: a very robust persistent spine is present in the umbo.

40. Apophysis. (0) Strongly keeled: prominent horizontal keel; (1) weakly keeled or not keeled. Note: all species with a terminal umbo although are considered to be strongly keeled they were scores as “?”.
41. Prickle on dorsal umbo. (0) Plain: the umbo presents no spine; (1) Centro-mucronate: the spine is localized mainly in the center of the umbo; (2) Excentromucronate; the spine is consistently above or below the center of the umbo.
42. Apophysis shape in Terminal Umbo (down weighted). (0) Absent: the umbo is dorsal; (1) uncinata: the apophysis are bent downward; (2) tectoid: the upper field is separated by a longitudinal keel in the middle reaching from the upper rim to the cross keel; (3) obtuse: the umbo is plane and obtuse; (4) pyramidal: the umbo is raised in the middle, besides the cross keel no other structure is present.
43. Apophysis shape on dorsal umbo (down weighted). (0) Absent: the umbo is terminal; (1) Elongated: the apophysis is clearly protruding at least twice as its length; (2) Half elongated: the apophysis protruding is less than its wide; (3) Flat. no projection of the apophysis is observed.
44. Dorsal Umbo shape (down weighted). (0) Absent: the umbo is terminal; (1) elongated; (2) half elongated; (3) Flat.
45. Peduncle. (0) Slender, it bends easily when green; (1) Stout: strong peduncle hard to bend.
46. Peduncle in ripe cone: (0) Falling with the cone; (1) Persisting with basal scales.
47. Long peduncle curved. (0) Absent: the peduncle is short so no curvature is perceived, (1) long peduncle is straight; (2) The peduncle is long (> than 2 cm) and curved.
48. Developed seeds on cone scale. (0) Two; (1) One.

49. Cone seeds. (0) Fertile seeds throughout the cone; (1) Only mid-cone seeds fertile.
50. Seed wings. (0) Adnate: the wing is firmly attachment to the seed and cannot be separated from it except by actually breaking the membranous wing; (1) Articulate: the wing is attached to the seed by two hooks that contain hygrosopic tissue; (2) Not attached: the wings are reduced in size or not attached at all to the seed. Some authors terme it "vestigial".
51. Seed wings function. (0) Effective: When the wing attached to the seed slightly retards its falling; (1) Ineffective: the wing seed does not retards the speed of the falling seed. Seeds with not attached wings where scored as "?".

#### WOOD AND BARK.

The criterion for assigning states in wood characters followed descriptions by Hudson and Van der Burgh.

52. Cross field pitting. (0) Pinoid: the holes in the secondary walls of ray parenchyma cells observed in a radial section are small and oval and number of three to six; (1) fenestriform: one or two big pits with a rectangular or square shape fill out the entire field.
53. Biseriate bordered pits on the walls of the axial tracheids (radial longitudinal section) (ordered). (0) Uniseriate: no biseriate bordered pits occur; (1) occasional: some; (2) numerous: many.
54. Horizontal walls of ray parenchyma, thickness (radial section). (0) Thin: thinner than the adjacent axial tracheid walls (1) Thick.

55. Occurrence of bordered pits on tangential walls of ray tracheids on the last formed wood and the first formed early wood (ordered). (0) Absent; (1) Occasional few; (2) Numerous.
56. Dentation degree of ray tracheids (radial section): (0) One: Slight thickening of the wall adjacent to the bordered pits of the ray tracheids; (1) Two: Very slight dentations most pronounced near the bordered pits of the ray tracheids; (2) Three: Moderately dentate ray tracheids; (3) Four: Gradual development from dentate to heavily dentate ray tracheids; (4) Five: heavily dentate, with some reticulate ray tracheids; (5) Six: partially reticulate to completely reticulate ray tracheids. Numbers corresponds to classes described in Hudson.
57. Pits on tangential walls of tracheids. (0) Few; (1) Many.
58. Sclerification of the walls of ray parenchyma cells. (0) Woody: high level of sclerification (1) Not woody. no sclerification present.
59. Thickness and sclerification of epithel- parenchyma cells around resin channels. (0) Woody thick; (1) Not woody thick; (2) Not woody thin.
60. Thickness and sclerification of walls in the uniseriate rays. (0) Woody thick; (1) Not woody thin.
61. Thickness of walls of the multiseriate rays. (0) Woody thick; (1) Not woody thin.
62. Bark. (0) Smooth: remains more or less flat ; (1) Rough: scaly with deep grooves; (2) Peels off: shallow grooves form thin scales that falls; (3) Exfoliating smooth: and thin bark as *P. bungeana*.
63. Bark plates (excluded). (0) Absent: more a less continuous surface; (1) Large: separated furrows; (2) Small: adjacent furrows.

## OTHER

64. Cotyledon type. (0) B; (1) A ; (2) C. From de Ferre (1965) cotyledon descriptions.
65. Seedling producing "grass stage". (0) Absent; (1) Present: exhibit arrested apical growth of the apical meristem in the seedling stage.
66. Long shoots. (0) Uninodal: during the growing season a single system of apical and lateral primordia of stem, leaves and reproductive organs initiated in a previous season and forming a terminal and several subterminal "winter buds", elongates and develops at the ends of stem and branches; growth then ceases and a new set of primordia is initiated before the dormancy period (Farjon & Styles 1997); (1) Multinodal: the development of the vegetative organs, as well as of reproductive organs, from the "winter buds" occurs simultaneously on these internodes within a single growing season.
67. Bud. (0) Glabrous: the surface of the bud is devoid of hairs or other projections; (1) Pubescent: having fine short hairs.
68. Stem shoot producing primary leaves. (0) Absent: shoots are only produced on branches; (1) With primary leaves: shoots are produce on the main stem and those have primary leaves; (2) Without primary leaves: shoots are produce on the main stem but these just have secondary leaves only. The leaves of pines are of four types when accounting for all developmental stages in the plant: cotyledons, primary or juvenile leaves, cathaphylls or scale leaves, and secondary leaves called needles. Primary leaves are linear-acicular, serrulate and amphistomatic they developed without an associated sheath nor as cathaphylls. Secondary leaves develop on dwarf shoots axillary to cataphylls, in clusters or fascicles (Farjon, 1997)



69. Primary leaves for several years. (0) Absent: the production of primary leaves occurs only the first season and only on the main stem; (1) Present: the production of primary leaves continues for several seasons and it also occurs on lateral shoots.
70. Heterobranchial chromosomes. (0) Only one out of twelve chromosomes presents a sub-median centromere, with a ratio of 0.6 between the a and b arms. (1) Two chromosomes present sub-median centromere, the rest have median centromere.

## **2.8 Acknowledgments**

The authors thank Steffi Ickert-Bond and Aljos Farjon for kindly providing some morphological data, Barbara Gartner for introducing two of us (S. O.-G and V. S) to pine wood anatomy, and J. Schimitt for his helpful advice. Miguel Angel Soto, Roberto Keller and Adrian Quijada made useful observations on an earlier draft. Special thanks are due to David Gernandt for helpful comments and revision of various versions of this manuscript. David Baum and two anonymous reviewers for helpful comments that improved this work. We thank Dave Swofford for permission to use a test version of PAUP\*4.0. Funding was provided by CONACyT and DGIA scholarships to S. O.-G.

## CHAPTER III

### MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES AMONG PINE *Lophodermium* FUNGI AND RELATED GENERA

Sol Ortiz-García<sup>1\*</sup>, Jeffrey K. Stone<sup>2</sup>, David S. Gernandt<sup>1</sup>,  
Peter R. Johnston<sup>3</sup>, Rodolfo Salas<sup>1</sup>, and Elena R. Alvarez-Buylla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México.

<sup>2</sup> Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis,

<sup>3</sup> Landcare Research New Zealand, Ltd. Auckland, New Zealand,

\* To whom correspondence should be addressed:

Sol Ortiz-García

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología.

UNAM, Apartado Postal 70-275

México D.F. C.P. 04510, México

sortiz@miranda.ecologia.unam.mx

Running title: Phylogenetic relationships of *Lophodermium* on pines

**Key Words:** ITS, phylogeny, Rhytismataceae, endophyte, pathogen, evolution

### 3.1 Abstract

The genus *Lophodermium* comprises ascomycetous fungi that are both needle cast pathogens and asymptomatic endophytes on a diversity of plant hosts. This genus is distinguished from other genera in the family Rhytismataceae by the presence of filiform ascospores and ascocarps that open at a longitudinal slit. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA were used as characters in phylogenetic analysis of *Lophodermium* species. Sequences of 28 *Lophodermium* isolates were analyzed with five other representatives of Rhytismataceae: *Elytroderma deformans*, *Lirula macrospora*, *Meloderma desmazieresii*, *Tryblidiopsis pinastri* and *Colpoma quercinum*. We evaluated the congruence of particular morphological characters on the phylogenetic hypotheses obtained. Parsimony and distance analyses suggest that ascospore shape results in an artificial separation of the genera. We obtained a natural group of *Lophodermium* species with pine hosts that included *M. desmazieresii* and *E. deformans*, which also have pine hosts and share characters related to ascomata development. Four sampled isolates from pathogenic species occupy derived and medial positions in the ITS region phylogeny suggesting that pathogenicity has evolved independently at least twice within pine hosts. Basal lineages of the pine *Lophodermium* clade are occupied by isolates from endophytes.

### 3.2 Introduction

Fungal endophytes live for all, or at least a significant part of their life cycle internally and asymptotically in plant tissues (Stone & Petrini, 1997; Saikkonen et al., 1998). Endophytic fungi have been found in all woody plants that have been examined (Carroll and Carroll, 1978; Petrini et al., 1982; Chapela and Boddy, 1988; Espinosa-García and Langenheim, 1990; Hata and Futai, 1995; Stone and White, 1999). Endophytic fungi of woody hosts are a highly diverse assemblage, primarily ascomycetes, and represent a range of symbiotic interactions, from commensals and mutualists to latent pathogens, with their host plants. Most phylogenetic studies of above-ground endophytes have focussed on grass symbionts (i.e. Shardi et al., 1991; Glenn et al., 1996; Reddy et al, 1998; but see Gernandt et al., 1997). Although both have been termed “endophytes”, the endophytes of grasses are limited to a relatively small group of genera in the Clavicipitaceae, while the endophytic fungi of woody hosts are biologically and ecologically much more diverse (Stone and White, 1999). Phylogenetic studies of woody plant endophytes are needed to evaluate degrees of specialization to habitats and hosts, endophyte diversity and distribution patterns, and the evolutionary pathways leading to this widespread association.

The study of evolutionary relationships within the fungi has had major impediments due to their simple and frequently convergent morphology, lack of a useful fossil record, and high biodiversity levels (Bruns et al., 1991). The use of molecular characters allows researchers to circumvent these problems. In particular, internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal (nr) DNA have been used to resolve intraspecific and interspecific phylogenetic relationships, providing insights into the utility of conventional morphological characters and species delimitation (Lee and Taylor, 1992; Carbone and Kohn, 1993; Harrington and Potter, 1997; Johnston and Jones, 1997; Jacobs and Rehner, 1998). In this study we used ITS sequences of nrDNA to estimate phylogenetic relationships within *Lophodermium* Chevallier. This genus, conspicuous on senescent and abscised conifer needles and recognizable in culture by its anamorphic states, is among the most common endophytic isolates from *Pinus*, *Abies*, and *Picea* (Stone and White, 1999).

*Lophodermium* is a large and complex genus in the family Rhytismataceae (Rhytismatales, Ascomycota). This genus offers a great opportunity to study the evolutionary history of the important and widespread symbiotic relationships among endophytes and woody plants. Approximately 103 species have been described on different plant groups (Hawksworth et al., 1995). More than 20 species of this genus colonize needles of coniferous trees and shrubs, but only one of these, *L. seditiosum*, is a major pathogen that causes needle cast of pines in forest nurseries and plantations (Minter and Millar, 1980; Wayne et al., 1996). In most pine *Lophodermium* species, ascocarps are usually found developing in recently fallen needles. These fungi colonize healthy needles where they reside as endophytes within the symptomless host tissue; ascocarps typically mature after needle abscission. *Lophodermium* species have been described from several families apart from Pinaceae, and are especially diverse on Gramineae and Ericales, both Ericaceae and Epacridaceae (Cannon and Minter, 1983; Johnston 1989, 1992; Ellis and Ellis, 1997).

The genus *Lophodermium* traditionally includes species characterized by having ascomata with a single longitudinal opening slit, and hyaline, filiform non-septate ascospores. Delimitation of *Lophodermium* species in pines is based on characters observed in mid-point cross sections of mature ascocarps. These characters include: position of the ascocarp in relation to the epidermis, number and position of displaced epidermal cells, presence and pigmentation of distinctive "lip" cells along the slit zone, and degree of pigmentation of the subhymenial lower wall associated to the presence of a perimeter line. Characters related to the external appearance include presence of zone lines, perimeter lines, size and shape of the ascocarp and its position in relation to the stomatal rows (Minter, 1981, 1995).

Many authors have emphasized the artificial nature of the separation of many genera in Rhytismataceae, including *Lophodermium*, defined by a few key characters (Darker, 1967; Johnston, 1989, 1990; Spooner, 1991). Early classifications based generic delimitation primarily on ascospore shape. More recent classifications include characters of the ascocarp, asci and spores as well as the anamorphic state. For example, Johnston (1988, 1989) delineated six different groups with 21 *Lophodermium* species from New Zealand based on distinctive developmental features of the

ascocarps. The same set of developmental features that defined some of these groups were shared by species in different genera within the family, including *Hypoderma*, *Meloderma* and *Coccomyces*.

A comprehensive monograph of *Lophodermium* is a difficult task considering its putative artificial constitution, its complexity, and the number of species ascribed to the genus. In this study we present a phylogenetic analysis using nucleotide sequence data of *Lophodermium* species with different host preferences and biogeographic distributions. The hypothesis of monophyly in the genus *Lophodermium* is tested by the inclusion of five other genera in the family Rhytismataceae. The molecular phylogeny allows us to evaluate traditional morphological and developmental characters used for species delimitation and to establish levels of convergent evolution in this group of fungi. Molecular characters may also indicate whether certain morphological characteristic in a group can be attributed to common descent or rather to anatomical similarities in their hosts. The range of interactions between *Lophodermium* and its hosts provides an opportunity to study levels of specificity and to trace the transition between pathogenicity and endophytism.

### 3.3 Materials and Methods

#### Fungal isolates

A total of 28 *Lophodermium* isolates were sampled (Table 3.1), representing twelve described species of *Lophodermium*. Several species were represented by individuals from multiple hosts or populations. During the course of this study, five putative new species from Mexican pines were discovered based upon unique combinations of morphological characters (Ortiz- García, Salas and Alvarez-Buylla, in preparation); all of them were included in the analysis. Three presumed asexual states of *Lophodermium* isolates were obtained from surface sterilized asymptomatic needles maintained on potato dextrose agar (Difco) supplemented with 0.1% malt extract and 0.15% yeast extract, (PDMYA). Needles were surface sterilized by successive immersion in 70% ethanol for 1 min, 4% sodium hypochlorite for 10 min, 70% ethanol for 1 min, and rinsed twice in sterile water. Two of these cultures were designated as *Leptostroma decipiens* anamorph of *Lophodermium baculiferum*, whereas the third was

undetermined (*Leptostroma* sp). The remaining pine host specimens were obtained from cultures recovered from ascospores of apothecia on needle fragments. All isolates from pines were collected within the natural distribution ranges of their hosts, with the exception of both *Lophodermium conigenum* isolates from *Pinus radiata* introduced in New Zealand. Seven specimens were provided as cultures from other institutions (Table 3.1). Five species from other genera of Rhytismataceae were included in the analyses: *Elytroderma deformans*, *Lirula macrospora*, *Meloderma desmazieresii*, *Colpoma quercinum* and *Tryblidiopsis pinastri*. The first three species were used to test the potential monophyly of the ingroup (Nixon and Carpenter, 1993), because they share many morphological features with some species in the genus *Lophodermium*, along with host substrate, ascocarp structure and development, and anamorph morphology (Cannon and Minter, 1983; Johnston, 1988, 1989). *Tryblidiopsis pinastri* and *Colpoma quercinum*, were included in this study to root the cladograms because they presented a sister relationship with *Lophodermium australe* in a phylogenetic analysis that included members of the family Rhytismataceae (Gernandt et al., 1997). These species present contrasting characters with the ingroup, both occur on dead stems and branches and have distinctive erumpent ascomata.

#### DNA extraction and amplification.

DNA was extracted from fungal cultures using a modification of the procedure of Doyle and Doyle (1987). Samples were ground in eppendorf tubes (1.5 ml) with sand and 1 ml of 60° C 2X CTAB supplemented with 2% of sodium bisulfite, then incubated at 37° C for 1-2 hrs. Two chloroform: isoamyl alcohol (24:1) extractions were performed, DNA was precipitated in cold isopropanol and the pellet was washed with 70% ethanol and suspended in TE (10 mM Tris-HCL pH 7-8, 0.1 mM EDTA). PCR reactions were performed in 100 µl volumes with 1.5 U Replitherm™ DNA polymerase (Epicentre Technologies), 5 µl Replitherm™ buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 4% DMSO, 2% BSA, 10 pmol dNTP, 15 pmol each primer and approximately 100 ng sample DNA. The primers used were ITS1F: 5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3' (White et al., 1990) and, NL6A: 5' CAA GTG CTT CCC TTT CAA CA 3' (Egger, 1995). These primers amplified the ITS region of nuclear ribosomal DNA, including the 5.8S

Table 3.1. Taxa included in the analyses.

Taxon	Host	Culture number	Origin
<i>Leptostroma decipiens</i> 1 Petr.	<i>Pinus ponderosa</i> Doug.		Oregon USA
<i>Leptostroma decipiens</i> 2	<i>P. ponderosa</i> Dougl.		Oregon USA
<i>Leptostroma</i> sp.	<i>P. ayacahuite</i> Ehrenb		Durango Mexico
<i>Lophodermium actinothyrium</i>	Poaceae		Argentina
<i>Lophodermium agathidis</i> 1 Minter & Hettige	<i>Agathis australis</i> (D. Don) Steud	PDD43039	New Zealand
<i>Lophodermium agathidis</i> 2	<i>Metrosideros fulgens</i>		New Zealand
<i>Lophodermium australe</i> 1 Dearn	<i>P. palustris</i> Miller		Florida USA
<i>Lophodermium australe</i> 2	<i>P. pseudostrabus</i> Lind.		Oaxaca Mexico
<i>Lophodermium baculiferum</i> 1 Mayr	<i>P. ponderosa</i> Dougl.		Oregon USA
<i>Lophodermium baculiferum</i> 2	<i>P. contorta</i> Dougl.		Oregon USA
<i>Lophodermium baculiferum</i> 3	<i>P. montezumae</i> Lamb.		Nuevo Leon Mexico
<i>Lophodermium baculiferum</i> 4	<i>P. montezumae</i> Lamb.		Morelos Mexico
<i>Lophodermium conigenum</i> 1 (Brunaud) Hillitz	<i>P. radiata</i> D. Don	PDED59475	New Zealand
<i>Lophodermium conigenum</i> 2	<i>P. radiata</i> D. Don	PDED59508	New Zealand
<i>Lophodermium indianum</i> 1 Singh & Minter	<i>P. greggii</i> Engelm.		Nuevo León México
<i>Lophodermium indianum</i> 2	<i>P. hartwegii</i> .		Oaxaca Mexico
<i>Lophodermium minus</i> (Tehon) P. R. Johnst.	<i>Pseudopanax chathamicus</i>	PDD62621	New Zealand
<i>Lophodermium minus</i> 2	<i>Nothofagus menziesii</i> Oersted	PDD45035	New Zealand
<i>Lophodermium molitoris</i> Minter	<i>Pinus taeda</i> L.	CBS 597.84	North Carolina USA
<i>Lophodermium nitens</i> Darker	<i>Pinus ayacahuite</i> Ehrenb.		Morelos Mexico
<i>Lophodermium piceae</i> (Fckl.) Höhn	<i>Picea abies</i> (L.) Karsten	93011	Waadt Germany
<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad. ex Fr.) Chev.	<i>Pinus ponderosa</i> Dougl.		Oregon USA



Table 3.1. (continued)

Taxon	Host	Culture number	Origin
<i>Lophodermium seditiosum</i> Minter, Staley u. Millar	<i>P. sylvestris</i> L.	BBAL225	Lünenburg, Germany
<i>Lophodermium</i> sp 1	<i>P. ayacahuite</i> Ehrenb.		Morelos Mexico
<i>Lophodermium</i> sp 2	<i>P. douglasiana</i> Martínez		Oaxaca, Mexico
<i>Lophodermium</i> sp 3	<i>P. montezumae</i> Lamb.		Morelos Mexico
<i>Lophodermium</i> sp 4	<i>P. chiapensis</i> (Martínez) Andresen		Oaxaca, Mexico
<i>Lophodermium</i> sp 5	<i>P. montezumae</i> Lamb.		Chiapas Mexico
<i>Elytroderma deformans</i> (Weir) Darker	<i>P. ponderosa</i> Doug.	CBS181.68	Montana, USA
<i>Lirula macrospora</i> (Hartog) Darker	<i>Picea abies</i>	CBS592.84	As, Norway
<i>Meloderma desmazieri</i> (Duby) Darker	<i>P. ayacahuite</i> Ehrenb.	CBS612.84	Chapingo, Mexico
<i>Tryblidiopsis pinastri</i> (Pers.: Fr) Karst	<i>Pinus</i> sp L.	CBS234	Sweden
<i>Colpoma quercinum</i> (Pers. ex St.-Am.) Wallr.	<i>Quercus rubus</i> L.	BBAC313	Münden, Germany

ribosomal RNA gene and the flanking ITS1 and ITS2 spacers. PCR conditions were 40 cycles at 94° C denaturation for 45 s, 55°C annealing for 45 s, and 72°C extension for 90 seconds. Reactions were terminated following a final extension at 72° C for 9 min. Products were purified with the QIAquick gel extraction protocol (QIAGEN, Chatsworth, Ca). Cycle sequencing with dye terminator chemistry was performed using an ABI model 373A fluorescent sequencer. Products were sequenced in both 5' to 3' and 3' to 5' directions.

#### Sequence analyses.

Sequence alignments were performed using CLUSTALW (Thompson et al., 1994) with a gap weight=40, gap length weight =5, and then adjusted manually by visual inspection in GDE (Genetic Data Environment, Smith et al., 1994). Phylogenetic analyses were conducted with PAUP\* version 4 (Swofford, 1998) using both the parsimony criterion and the neighbor joining method. In the parsimony analysis, a heuristic search was performed with the following options: a 100 replicates of random taxon addition, tree bisection reconnection (TBR) branch swapping, and no maxtree limit. Gaps were treated as missing data to minimize homology assumptions. All characters were equally weighted and unordered. Support for the branching topologies was evaluated with 500 replicates of bootstrapping (Felsenstein, 1985). No maxtree limit and random addition sequence with one replicate each were used in the bootstrap analysis. To examine the number of additional steps required to collapse each clade, Bremer support/decay indices (Bremer, 1988, 1994) were calculated by using the command "keep trees" for trees one to four steps longer and by the constraint consensus analysis for each clade with longer steps (Morgan, 1997). In both methods, the above heuristic search parameters were used.

In the neighbor-joining analysis, the proportion of nucleotide difference was calculated as the ratio between the number of positions at which nucleotides differ between two sequences, and the total number of nucleotide positions compared (Nei, 1987). Numbers of substitutions were also estimated using the one parameter method of Jukes and Cantor (1969) and the two parameter method of Kimura (1980). The distance matrices generated by these methods were used to obtain distance trees

employing the neighbor-joining method. Trees were displayed with TREEVIEW (Page, 1996).

#### Morphological character analysis.

Nineteen morphological characters were gathered for most of the isolates (Table 3.2 and Table 3.3). Characters were chosen based on availability and on traditional use (Minter, 1981) for taxonomic assignment of *Lophodermium* species in pines. All morphological characters were coded as unordered and were optimized onto the trees obtained from the ITS region analysis, using unweighted parsimony.

Table 3.2. Selected characters and character states analyzed on the phylogenetic reconstructions. The Consistence Index obtained for each character is shown in parenthesis.

Characters	Character States
1.- Ascomata position (0.364)	0 = sub-cuticular, 1 = partly sub-epidermal and sub-cuticular, 2 = sub-epidermal, 3 = partly sub-cuticular, sub-epidermal, and sub-hypodermal, 4 = laterally subhypodermical
2.- Ascomata opening (1.00)	0 = no linear, 1 = linear
3.- Linear ascomata opening (0.333)	0 = along epidermal cells, 1 = along stomata
4.- Ascomata shape (0.375)	0 = elliptical oblong, 1 = elliptical with acute apex, 2 = linear, 3 = irregular (erumpent ascomata)
5.- Pigmentation of the sub-hymenial tissue (0.236)	0 = absent, 1 = slightly pigmented basal wall, 2 = strongly pigmented basal wall
6.- Modified cells along ascomata opening (0.236)	0 =absent, 1 = present
7.-Lip cells colors (0.667)	0= Colourless, 1= grey, 2= black , 3= green/blue, 4= yellow
8.- Perimeter line (0.145)	0= absent, 1= present
9.- Black zone lines (0.115)	0= absent, 1= present
10.- Spore shape (0.333)	0= filiform, 1= not filiform
11.- Spore septo (0.250)	0= absent, 1= present
12.- Paraphysis (0.250)	0 = simple, 1= swollen, 2= hooked, 3= branched

Table 3.2. (continued)

Characters	Character States
13.- Conidiomata (0.333)	0 = absent, 1 = present
14.- Conidiomata opening (mostly) (0.500)	0 = irregular tears, 1 = Ostiole, 2 = Ostioles (more than 1), 3 = single longitudinal slip on one side
15.- Host (0.500)	0 = no pine, 1 = pine
16.- Substrate for reproduction (0.667)	0 = needles or leaves, 1 = (needles, or leaves) and cones, 2 = bark
17.- Displacement of epidermal cells (0.211)	0 = no epidermal cells displaced, 1 = centrally and together on the basal wall, 1 = Scattered on the basal wall
18.- Asci apex (0.400)	0 = acute, 1 = papillate, 2 = cylindrical truncate
19.- Conidia shape (0.667)	0 = cylindrical 1 = elliptical 3 = falcate or lunate

Table 3.3 Morphological data matrix for 33 isolates.

Fungi	Characters (from 1-19)
<i>Leptostroma decipiens</i> 1	211020?010021210010
<i>Leptostroma decipiens</i> 2	211020?010021210010
<i>Leptostroma</i> sp.	??????????????10???
<i>Lophodermium actinothyrium</i>	2100110000020?0000?
<i>Lophodermium agathidis</i> 1	01001140101?1100201
<i>Lophodermium agathidis</i> 2	01001140101?1100201
<i>Lophodermium australe</i> 1	310201(01)000001(03)10200
<i>Lophodermium australe</i> 2	310201(01)000001(03)10200
<i>Lophodermium baculiferum</i> 1	211020?010021210010
<i>Lophodermium baculiferum</i> 2	211020?010021210010
<i>Lophodermium baculiferum</i> 3	211020?010021210010
<i>Lophodermium baculiferum</i> 4	211020?010021210010
<i>Lophodermium conigenum</i> 1	110121(12)110011(23)10200
<i>Lophodermium conigenum</i> 2	110121(12)110011(23)10200
<i>Lophodermium indianum</i> 1	3100211110010?1020?
<i>Lophodermium indianum</i> 2	3100211110010?1020?
<i>Lophodermium minus</i> 1	210010?000131?00000
<i>Lophodermium minus</i> 2	210010?000131?00000
<i>Lophodermium molitoris</i>	1100111110001010110
<i>Lophodermium nitens</i>	010010?110021010010
<i>Lophodermium piceae</i>	210010?110011?0000?
<i>Lophodermium pinastri</i>	1100112110001311100
<i>Lophodermium seditiosum</i>	2101112110001111000
<i>Lophodermium</i> sp 1	1101210100011110100
<i>Lophodermium</i> sp 2	410001100000??1000?
<i>Lophodermium</i> sp 3	2100113110021?10110
<i>Lophodermium</i> sp 4	11012101?00???101??
<i>Lophodermium</i> sp 5	210010?1000?1?101??

Table 3.3 (continued)

Fungi	Characters (from 1-19)
<i>Elytroderma deformans</i>	410200?001111?1020?
<i>Lirula macrospora</i>	011210?110001100001
<i>Meloderma desmazierei</i>	110021?101011?10200
<i>Tryblidiopsis pinastri</i>	?0?310?0011(10)1?12?22
<i>Colpoma quercicum</i>	?0?3?0?00002??02?0?

### 3.4 Results

#### Sequence analysis.

The PCR products resulting from using the fungal specific primers included an approximately 250 bp intron at the 3' end of the small subunit for most but not all species. Due to problems in its alignment and questionable homology, these insertions were not included in the analyses. The amplified fragments also included approximately 14 bp at the 3' end of the 18S rDNA gene and 20 bp of the 5' end of the 28S rDNA gene, but only the ITS region portion was included in the phylogenetic analyses. Boundaries of the ITS-1, 5.8S rDNA gene, and ITS-2 were determined by comparison with published sequences of the ITS region (Lee and Taylor, 1992; Morales et al., 1993; Jasalavich et al., 1995). The total length of the ITS region sequence alignment was 484 bp, of which 160 characters were phylogenetically informative. The ITS region sequences ranged in length from 425 to 456 bp among the 33 studied taxa (Table 3.2). Most of the length variation occurred in the ITS1 (range 121-150 bp, mean =  $129.45 \pm 8.5$ ). This was due mainly to the presence of an 18 bp insertion present in both isolates of *L. minus* and partially shared with the out group and *L. picea* in 13 positions. As expected, the 5.8S rDNA gene showed constant length (158 bp). The ITS2 region varied between 144 and 159 bp among taxa (mean =  $150.48 \pm 4.9$ ). A relatively broad range of G + C content was observed among the ITS1 and ITS2 sequences (Table 3.2). In contrast, G + C content of the 5.8 rDNA gene is fairly constant across all taxa. Intraspecific percentage of nucleotide difference was 2.5% between *L. agathidis* isolates, 1.3% between *L. minus* isolates and it ranged from 0% to 7.1 % between *L. baculiferum* isolates. Interspecific nucleotide difference ranged from 0.0% for *L. nitens* and *L. indianum* 2 to 20.9% for *L. minus* 1 and *L. conigenum* 1.



**Table 3.4.** Sequence characteristics of the ITS Region.

Parameter	ITS1	5.82	ITS2	Total sequence
Length range (bp)	121-150	158	144-159	425-456
Length mean and s.d. (bp)	129.45 ±8.5	158 ± 0	150.48 ± 4.9	437.94 ±8.7
Aligned length	159	158	167	484
G + C content range	0.430-0.534	0.443-0.475	0.531-0.662	0.477-0.554
G + C content mean & s.d.	0.472±0.030	0.463±0.010	0.592±0.039	0.510±0.024
Number of variable sites (%)	87(54.7)	15(9.5)	92(55.1)	194(40.1)
Number of informative sites (%)	73(45.9)	10(6.3)	77(46.1)	160(33.1)

### Phylogentic analysis.

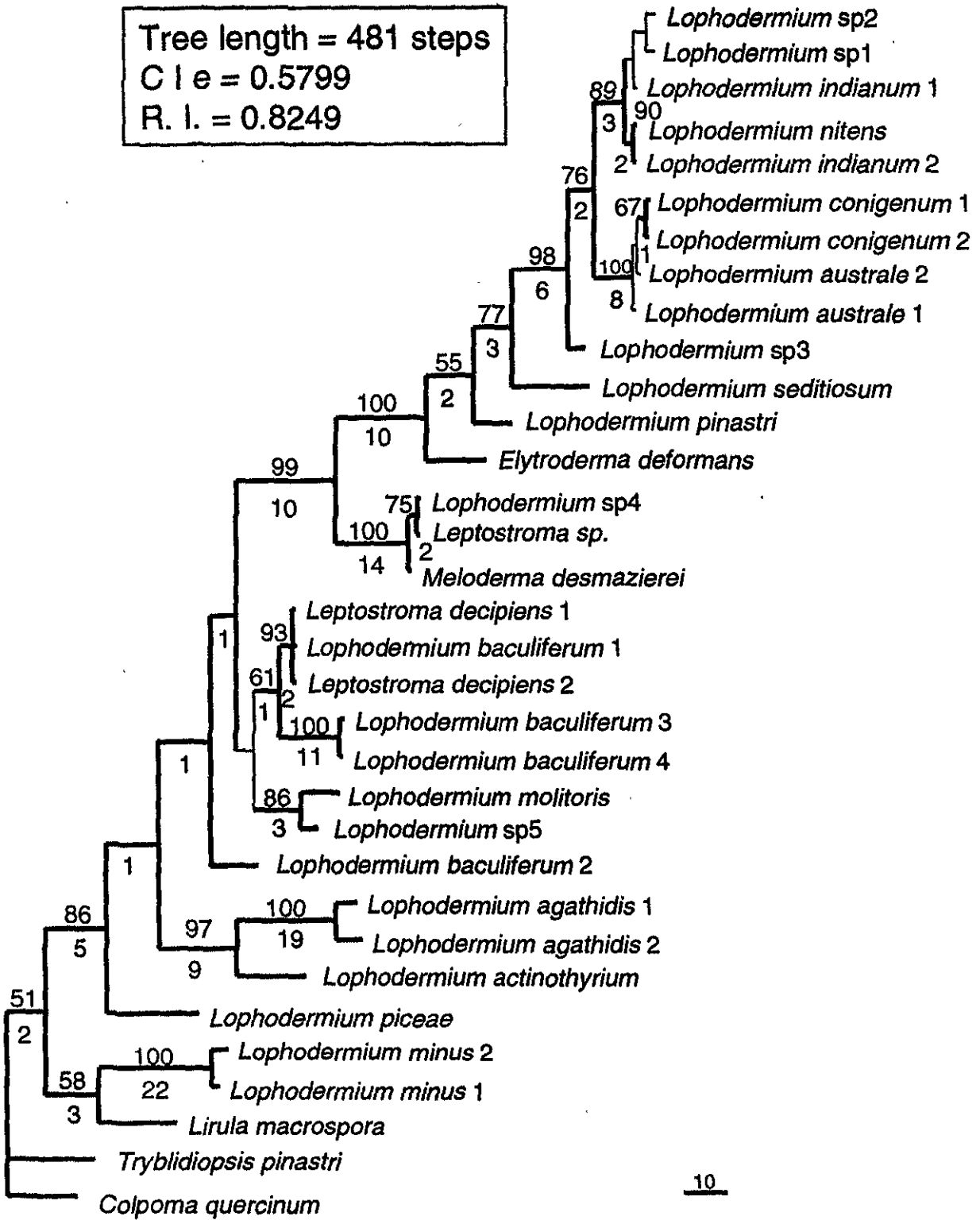
Eight equally most parsimonious trees were obtained from the heuristic search, Fig. 3.1 shows one of them (tree length = 481, CI = 0.605, RI = 0.825, RC = 0.499). The phylogeny has many clades with high bootstrap support values (>90%). From a total of 29 clades 21 have bootstrap support over 50%. Four clades with no bootstrap support (<50%) correspond to unresolved positions that collapse in the strict consensus tree. The strict consensus tree obtained from the same eight trees is well resolved (Fig. 3.2). The topologies obtained from the neighbor-joining analyses using Jukes and Cantor one- or Kimura two- parameter methods were identical but differed from the most parsimonious trees in two ways: *L. baculiferum 2* instead of being basal to a clade that includes all *Lophodermium* with pines hosts, is in an intermediate position within this clade, the other difference corresponds to the position of *L. piceae* being basal to the mentioned clade. The neighbor-joining tree obtained from a distance matrix using the total distance was slightly different to the other trees, grouping *L. piceae* with *L. molitoris* and *L. sp5*, within the *Lophodermium* clade associated to pines. Nevertheless, differences between topologies from different analyses occurred only on branches with no bootstrap support. Analysis of 500 bootstrap replicates using the command "keep all compatible groups", also resulted in the tree with the topology displayed by the former distance trees. Bootstrap values within the bootstrap tree ranged from 20% to 100% and decay indices ranged from 0 in the branches that collapsed in the consensus tree to 22 steps.

The eight most parsimonious trees (not shown) differed in some details.

*Lophodermium indianum 1* formed a monophyletic group with *Lophodermium sp 1* and *sp 2* in some trees whereas in others these groups were paraphyletic to *L. nitens* and *L. indianum 2*. Two isolates of *L. australe* were monophyletic or formed a paraphyletic group with two isolates of *L. conigenum*. *Lophodermium molitoris* and *L. sp5* either formed a monophyletic group with all *L. baculiferum* species with the exception of *L. baculiferum 2*, or occupied an intermediate position within the clade of *Lophodermium* species on pines.

**Figure. 3.1.** One of the eight most parsimonious trees obtained from parsimony analysis for *Lophodermium* isolates and related genera. The tree was presented as a phylogram to show the number of character state changes per branch. *Colpoma*, *Lirula*, *Tryblidiopsis* and two isolates of *Lophodermium minus* were designated as outgroups. Numbers above branches are bootstrap values over 50%, numbers below branches are decay indexes. Thin lines show branches that collapsed in the strict consensus tree (with a decay index of zero). The C. I. showed included also uninformative characters.

Tree length = 481 steps  
 C | e = 0.5799  
 R. I. = 0.8249



All *Lophodermium* species that inhabit pine needles formed a monophyletic group, hereafter referred to as the pine clade, distinct from the other *Lophodermium* species included in the analysis, that formed a heterogeneous group of species on a phylogenetically diverse assemblage of hosts. Within the pine clade, two groups can be distinguished, one of them with high support: 99% bootstrap value and a decay index of 10 (d), but the other one only weakly supported. The former includes most *Lophodermium* species in pines and also two species from other Rhytismataceae genera. *Elytroderma deformans* from *P. ponderosa*, in a basal position to *L. pinastri*. *Meloderma desmazieresii* from *P. ayacahuite* is in a sister relationship highly supported (100%; d=14), to a *Leptostroma* anamorph isolated also from *P. ayacahuite* and an undetermined *Lophodermium* (sp4) isolated from *P. chiapensis*. The other group within the pine clade showed very low support for the internal branches. This clade included all *L. baculiferum* isolates, *L. molitoris*, and a putative new species of *Lophodermium* (sp5). The terminal branches of all these species were well supported.

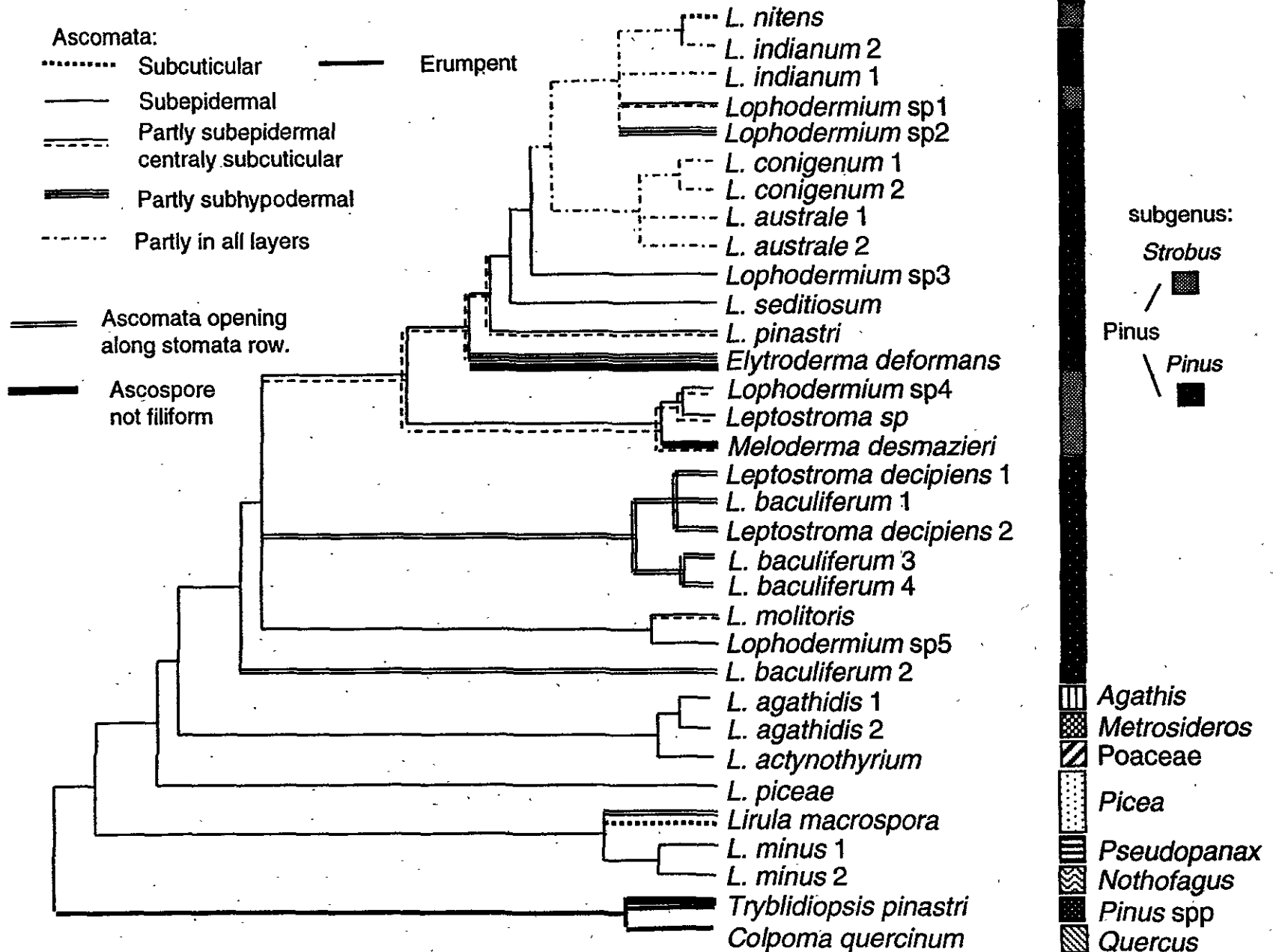
In the non-pine group, a monophyletic clade comprising by two *L. agathidis* isolates from New Zealand and *L. actinothyrium* from Argentina was highly supported (97% d= 9). Within this group, *L. actinothyrium* is basal to both *L. agathidis* species (100%; d=19). *Lophodermium piceae* is the sister species to all the mentioned species. *Colpoma quercinum* and *Tryblidiopsis pinastri* were used to root the phylogenetic reconstructions, and two isolates of *L. minus* closer to *Lirula macrospora* showed an intermediate position between these groups.

#### Morphological characters.

Parsimony based optimizations of morphological character states for 19 characters commonly used to separate *Lophodermium* species on pine hosts showed in general high levels of homoplasy on the molecular phylogenetic reconstructions obtained from the ITS region analysis (Table 3.2). This indicates that most morphological characters traditionally used for species delimitation have evolved more than once within the pine group. Thirteen characters showed the same consistency index in all most parsimonious reconstructions, but four characters showed variation in their consistency index depending on the tree that was used for the optimization. The

mean consistency index for all characters was 0.406 (range 0.115-1.000). The morphological characters with the highest CI values ( $\geq 0.500$ ) were: ascomata opening, lip cell colors, conidiomata opening, and conidium shape. Two ecological characters showed high C.I.: were pine host and substrate of fructification. Ascomata position presented a relatively low consistency index (C.I.=0.364), as well as ascospore shape (C.I.=0.333). Four representative characters were mapped on the consensus tree (Fig. 3.2).

**Figure 3.2.** Strict consensus tree of eight equally parsimonious trees for *Lophodermium* isolates and related genera. Correspondent hosts are shown for each isolate. Morphological character state optimizations are represented by different patterns in branches for four representative morphological characters.





### 3.5 Discussion

Generic segregation and morphological characters.

Results from parsimony and neighbor-joining analyses yielded strong evidence of the artificial nature of the genus *Lophodermium*. All phylogenetic reconstructions grouped *Meloderma desmazieresii* and *Elytroderma deformans*, which are also inhabitants of pine needles, with *Lophodermium* species from pine hosts. When these two species were constrained outside of the pine clade, 8 trees 43 steps longer than the most parsimonious trees resulted. The non parametric Templeton test implemented in PAUP\* yielded a highly significant difference between the most parsimonious trees and the trees obtained from this constrained analysis ( $p > 0.0001$ ). These results strongly suggest that the genus *Lophodermium*, as traditionally recognized, is not monophyletic.

When the genus *Meloderma* was erected, Darker (1967) pointed out similarities in ascus shape and in the position of the developing ascocarp in relation to the host tissue between *Meloderma desmazieresii* and *Lophodermium* on pines. *Meloderma* and *Elytroderma* have been segregated from *Lophodermium* species mainly based on ascospore morphology. Species in the genus *Meloderma* have short, cylindrical ascospores as opposed to the filiform ascospores in *Lophodermium*. The genus *Elytroderma* is distinguished by its large, clavate, 1-septate ascospores. The phylogenetic results reported here suggest that *Elytroderma deformans*, *Meloderma desmazieresii* and *Lophodermium* species from pines form a more natural group, despite differences in ascospore shape and degrees of pathogenicity. This is congruent also with similarities in ascocarp development related to the internal differentiation of the upper wall of unopened ascocarps between *M. desmazieresii* and studied species of *Lophodermium* from pines reported by Johnston (1988), as well as with similarities in anamorphic states (Minter, 1980) and ascospore discharge mechanisms (Minter and Cannon, 1984).

The fact that species with contrasting spore shapes (i.e. *Lophodermium*, *Elytroderma* and *Meloderma*) occurred together in the pine clade suggests that this character is not appropriate for delimiting natural groups within this family. Characters

related to the patterns of development of the sterile tissues of the ascocarps have proven to be more useful to define groups within the Rhytismataceae (Johnston, 1988, 1989). The evaluation of the taxonomic significance of these traits is deferred because ascocarp development is poorly understood in most species. *Lophodermium* species that share related hosts may have similar ascocarp developmental patterns, particularly if the anatomy and disposition of the available tissues in the hosts constrain ascocarp development. The positions of species in the pine clade assigned to different genera have similar ascocarp development patterns as well as similar host substrate. However, the possibility of ascocarp development being a reliable criterion for the delimitation of genera comprising natural groups within the Rhytismataceae should stimulate more studies on ascocarp ontogeny. Ascospore shape seems a reliable character for species delimitation. The genus *Elytroderma* includes only two species, both pine inhabitant and the genus *Meloderma* includes four species with a wider host range. To establish if all these species are part of *Lophodermium* will require wider sampling. Other studies have reported convergence in spore shape: Wingfield et al., (1994) found that ascospore morphology was not congruent in the molecular phylogeny among species in *Ceratocystis sensu stricto*. Gaudet et al. (1989) showed that highly divergent species of *Fusarium* showed convergence in macroconidium shape.

Morphological characters traditionally used for species delimitation showed different degrees of taxonomic value. Few characters appeared consistent with the molecular phylogenetic reconstruction. The depth of embedding of the ascocarp, a key character for distinguishing pine inhabiting *Lophodermium* species, showed an inconsistent distribution pattern on the phylogenetic reconstructions. There may be different sources for incongruence between the phylogenetic hypotheses and the morphological characters used for species delimitation. One possible explanation for the observed pattern is that closely related species or even the same species colonizing hosts with different needle anatomies, showed differences in the location of the ascocarp related to the number of pine cell layers in the needle. In particular this might be the case for the clade that comprises *L. nitens*, *L. indianum* and two undescribed species of *Lophodermium* (sp. 1 and sp. 2). *Pinus hartwegii* and *P. greggii* have two to three layers of hypodermal cells while *P. ayacahuite* has only one (Farjon and Styles,

1997), this anatomical difference reduces the sites available for ascocarp insertion in the soft pine, and thus constrains the potential morphological characters related to the embedding of the ascocarp in fungi colonizing this species.

Most *Lophodermium* taxa that showed unique combinations of morphological characters also showed unique molecular sequences. The five putative new Mexican species showed unique ITS region sequences. Only *Leptostroma* sp. from *P. ayacahuite*, showed identical nucleotide sequences to that of *Lophodermium* sp 4 from *P. chiapensis* suggesting that they might be the same species.

In this study we observed two interesting and contrasting patterns in relation to morphological and molecular variation. Some species characterized by different morphological attributes showed identical sequences, and also the same morpho-species showed molecular variation attributable to different species. This might be partially explained by the fact that some important morphological characters used for species delimitation may be dependent on the anatomy of the hosts. Different species in anatomically similar hosts may present the same morphology and conversely the same species in anatomically different hosts may show different morphology. Other groups of characters independent from host anatomy showed different patterns of variation. Minter and Millar (1980), studied the biology and ecology of a group of similar *Lophodermium* species inhabiting *Pinus sylvestris*: *L. seditiosum*, *L. pinastri* and *L. conigenum*. They reported impressive differences in their habitat use, fructification and sporulation periods as well as in their pathogenicity. The phylogenetic relationships inferred for these species and the genetic differentiation observed corroborated their species status and is congruent with the ecological variation reported. The relative high G + C content observed in the ITS2, is also characteristic of angiosperms, and some genera in the family Pinaceae as well as different groups of fungi (Baldwin et al., 1995; Liston et al., 1999; Kuhls et al., 1997; O'Donnell et al., 1998).

#### Host specificity.

Some species represented by more than one isolate had noticeably divergent ITS region sequences. This was the case for the "*Lophodermium baculiferum* species complex" that showed high levels of ITS variation. ITS intraspecific variability in this

complex correlates with the origin of the isolate in terms of the phylogenetic relationships of their hosts. Fungi isolated from the same host, *Pinus ponderosa* inside a small geographic range in Oregon, showed identical sequences. Isolates of the same morpho-species taken from *P. montezumae* across a relatively extensive geographic range in Mexico, showed low variation levels (0.23%). High sequence divergence was found among *L. baculiferum* isolates from different pine species, whether they were from species in the same subsection (mean 4.24%), or in different subsections (mean 6.09%). *Pinus ponderosa* and *P. montezumae*, both members of subsection *Ponderosae* (Liston et al., 1999), share a recent common ancestor, and this is also the pattern for their *L. baculiferum* isolates, despite these pines being geographically isolated. In contrast, *L. baculiferum* isolated from *P. contortae* in subsection *Contortae* (Liston et al., 1999) displayed higher molecular divergence to the former isolates despite the overlapping geographic distributions of *P. ponderosa* and *P. contorta* along the west coast.

Levels of intraspecific variation between *L. baculiferum* isolates are comparatively high. As in previous studies (Carbone and Kohn, 1993; Morales et al., 1993; Ko et al., 1997), divergence among isolates from different hosts may be high enough to justify splitting them into separate species. This is congruent with the idea that speciation has occurred in the fungi in parallel with host speciation. Mating studies and reciprocal inoculations may be appropriate to investigate whether molecular divergence and host specificity justify the segregation of additional species in this group. Further isolates of *L. baculiferum* need to be studied both genetically and morphologically to decide whether or not the current taxonomy is appropriate.

There is evidence that specific host-fungus relationships occur between *Leptostroma* anamorphs and their hosts (Sieber-Canavesi et al., 1991), and this is reflected by the fact that host preference and substrate often provide a guide for identifying *Lophodermium* species. Observed variation patterns indicate that some *Lophodermium* species maybe undergoing host-mediated speciation. However host switching between closely related and sympatric pine hosts occurs since there is not an overall congruence between the phylogeny of *Lophodermium* and the phylogenetic relationships among its pine hosts. Species that are generalists, able to switch and

colonize many different hosts, are illustrated by *L. agathidis* isolates collected exclusively from New Zealand but obtained from different hosts. Divergence levels among individuals of *L. agathidis* are comparable to divergent levels within the same species.

That many species of *Lophodermium* have a wide host range, probably reflects a potential to host switching. It is possible, however, that cryptic speciation is occurring in similar taxa on different hosts, and therefore differences in habitat and behavior may indicate genetic discontinuities. Groups of chemical and morphological traits on the pines hosts, such as needle anatomy and secondary compound distribution influence on fungal colonization. Similar needle anatomy and similar secondary compounds might favor host switching and colonization especially between closely related pines in sympatry (Espinosa-García, et al., 1993). Horizontal transfer in *Lophodermium* by broadcasting of ascospores may preclude specialization in some species, but host tracking seems to be occurring in others.

#### Evolution of Pathogenicity.

The phylogenetic results provide evidence that pathogenicity has evolved from endophytism more than once within the studied pine-inhabiting fungi. The transition from endophyte to pathogen does not appear to be frequent in this group of fungi. There is evidence that some *Lophodermium* species included in this study are endophytes (Suske and Acker, 1989; Minter et al., 1978; Minter and Millar, 1980; Wilson et al., 1994). Indirect evidence supports the view that most *Lophodermium* species also share this lifestyle. Their fruiting bodies are frequently associated with recently senescent or dead tissue and viable infections are commonly found in living tissues of symptomless hosts (Carroll and Carroll, 1978; Hata and Futai, 1993, 1995; Stone and White, 1999). All *Lophodermium* species from New Zealand, basal to the pine clade, were sampled from fallen leaves, evidence of an endophytic life style. Other representatives of Rhytismateceae including *Colpoma quercinum* and *Tryblidiopsis pinastri* are also considered endophytes. They colonize living branches and play an important role in natural decay and shedding of dead branches (Livsey, 1993; Livsey and Minter, 1994; Kowalski and Kehr, 1996). In contrast, *L. seditiosum*, *Elytroderma*

*deformans* and *Meloderma desmazieresii* are serious pine pathogens. *Lophodermium seditiosum* attacks two and three-needle pines causing needle death during their first growing season, sometimes killing seedlings (Hansen and Lewis, 1997). It represents the species with the widest host range within the genus *Pinus*, reported in more than 40 different hosts species. *Elytroderma deformans* causes “witches brooms” and severe defoliation damage (Weir, 1916; Childs et al., 1971). This fungus invades its host via needles and then grows into and persists in shoots and twigs, causing a characteristic growth abnormality, severe infections can also kill the trees (Sinclair et al., 1996). *Meloderma desmazieresii* causes a needle blight. Yellow spots appear on needles during the spring following infection, with ascospores maturing the early summer (Hansen and Lewis, 1997). These three pathogenic species have been recorded in several different pine species. The relative position of the pathogenic taxa within the obtained phylogenetic reconstruction, suggests that that pathogenicity has evolved independently more than once in this group, the endophytic ecological mode showed by basal groups suggests that this is the ancestral condition. Other studies have also shown evidence of multiple origins of pathogenic fungi from non pathogenic relatives (Bowman and Taylor, 1993; Bowman et al., 1996).

The feature that defines an endophyte is the presence of a period of interrupted growth and this may be genetically self regulated or imposed by the host . Delaying reproduction until needle senescence might represent a less adaptive strategy compared to pathogenic fungi that aggressively colonize host tissue following infection, allowing them to reproduce within a year after infection. Severe needle pathogens deplete substrate availability for subsequent infections since commonly only current season needles are available for colonization (Wayne et al., 1987). In contrast, different age needles are available for continuous endophyte colonization. When environmental conditions are unfavorable for ascospore dispersion and colonization, fitness of pathogenic fungi may be very limited in comparison to that of endophytic species that remained in younger needles, especially if ascospore life span is limited. The ability to occupy many different host substrates may be an alternative for pathogenic fungi to escape such environmental risks. This may explain why some pathogens are found in

other tissues besides needles. *Lophodermium seditiosum* can be found fruiting on pine cones, and *E. deformans* also invades shoots and twigs.

The molecular approach used in this study helped to interpret relationships between the genus *Lophodermium* and selected species in the family Rhytismataceae, but these results can only be considered as preliminary. A better understanding of the biological and evolutionary relationships among *Lophodermium* and related genera might be guided by considering host associations. Inclusion of other members of *Lophodermium* and species of allied genera, and a better understanding of systematic relationships in Rhytismataceae will be required before a decision can be made on the most appropriate way to classify the diversity covered within the genus.

### 3.6 Literature Cited

- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Cambell, C. S., and Donoghue M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **82**: 247-277.
- Bowman B. H., and Taylor, J. W. (1993). Molecular phylogeny of pathogenic and nonpathogenic Onygenales. In "The fungal holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics" (D R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.). pp 169-178, CAB International, Wallingford, Oxon.
- Bowman B. H., White, T. J., and Taylor, J. W. (1996). Human pathogenic fungi and their close nonpathogenic relatives. *Mol. Phylogenet. Evol.* **6**: 89-96.
- Bremer, K. (1988). The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* **42**: 795-803.
- Bremer, K. (1994). Branch support and tree stability. *Cladistics* **10**: 295-304
- Bruns, T. D., White, T. J., and Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*: **22**: 525-564.
- Cannon, P. F., and Minter, D. W. (1983). The nomenclatural history and typification of *Hypoderma* and *Lophodermium*. *Taxon.* **32**: 572-583.
- Carbone, I., and Kohn, L. M. (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* **85**: 415-427.
- Carroll, G. C., and Carroll, F. E. (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* **56**: 3034-3043.
- Chapela I., and Boddy, L. (1988). Fungal colonization of attached beech branches. *New Phytol.* **110**:47-57.
- Childs, T. W., Shea, K. R., and Stewart, J. L. (1971). *Elytroderma* disease of ponderosa pine. *Forest Pest Leaflet.* **42**: 1-6.
- Darker, G. D. (1967). A revision on the genera of Hypodermataceae. *Can. J. Bot.* **45**: 1399-1444.
- Doyle, J. J., and Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin.* **19**: 11-15.



- Egger, K. N. (1995). Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* **73**: S1415-S1422.
- Ellis, M. B., and Ellis, J. P. ed. (1997). "Microfungi on land plants. An identification handbook". The Richmond Publishing Co. Ltd. England. 868 pp.
- Espinosa-García, F. J., and Langenheim, J. H. (1990). The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population. Diversity and spatial patterns. *New Phytol.* **116**: 89-98.
- Espinosa-García, F. J., Saldivar-García P. and Langenheim J. H. (1993). Dose-dependent effects In Vitro of essential oils on the growth of two endophytic fungi in coastal redwood leaves. *Biochem. Syst. Ecol.* **21**: 185-194.
- Farjon, A., and T. Styles. (1997). *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica Monograph **75**:1-193.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Gaudet J., Julien, J. Lafay, J. F. and Brygoo, Y. (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 227-242.
- Gernandt, S. D., Camacho, F. J., and Stone, K. J. (1997). *Meria laricis* an anamorph of *Rabdocline*. *Mycologia* **89**: 735-744.
- Glenn A. E., Bacon, C. W., Price, R., and Hanlin, R. T. (1996). Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* **88**: 384-394.
- Hansen, E. M. and Lewis, K. J. (1997). "Compendium of Conifer Diseases". Pp. 51-55. APS Press.
- Harrington, F. A., and Potter, D. (1997). Phylogenetic relationships within *Sarcoscypha* based upon nucleotide sequences of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* **89**: 258-267.
- Hata, K., and Futai, K. (1993). Effect of Needle aging on the total colonization rates of endophytic fungi on *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora* needles. *J. Jpn. For. Soc.* **75**: 338-341.
- Hata, K., and Futai, K. (1995). Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Can. J. Bot.* **74**: 103-114.

- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., and Pegler, D. N. (1995). *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi* (Ed. 8). International Mycological Institute.
- Jacobs K. A., and Rehner, S. A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* **90**: 601-610.
- Jasalavich, C. A., Morales, V. M., Pelcher, L. E. and Séguin-Swartz, G. (1995). Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* **99**: 604-614.
- Johnston, P. R. (1988). A new species of *Meloderma* (Rhytismataceae), with notes on *Meloderma* and related genera. *Mycotaxon.* **33**: 423-436.
- Johnston, P. R. (1989). Rhytismataceae in New Zealand. The genus *Lophodermium* on indigenous plants. *New Zealand Journal of Botany.* **27**:243-274.
- Johnston, P. R. (1990). Rhytismataceae in New Zealand. The genus *Hypoderma*. *New Zealand Journal of Botany.* **28**: 159-183.
- Johnston, P. R. (1992). Rhytismataceae in New Zealand. 6. Checklist of species and hosts, with keys to species in each hosts genus. *New Zealand Journal of Botany.* **30**: 329-351.
- Johnston P. R. (1997). Tropical Rhytismatales. In "Biodiversity of Tropical Microfungi" (K. D. Hyde Ed.). Pp. 241-254. Hong Kong University Press.
- Johnston P. R., and Jones, D. (1997). Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-roots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* **89**: 420-430.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In "Mammalian Protein Metabolism". (H. N. Munro, Ed.) pp. 21-132 , Academic Press, New York.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions trough comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:11-120.
- Ko, K. S., Hong, S. G., and Jung, H. S. (1997). Phylogenetic analysis of *Trichaptum* based on nuclear 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **89**: 727-734.
- Kowalski, T., and Kehr, R. D. (1996). Fungal endophytes of living branches in several European tree species. In: "Endophytic fungi in grasses and woody plants:

- systematics, ecology and evolution". (Redlin, S. C. and Carris, L. M. Eds.). Pp. 67-86. APS Press.
- Kuhls, K., E. Lieckfeldt, G. J. Samuels, W. Meyer, C. P. Kubricek, and T. Börner. (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* **80**: 442-462.
- Lee, S. B., and Taylor, J. W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 636-653.
- Liston A., Robinson, W. A., Piñero, D., and Alvarez-Buylla, E. R. (1999). Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **11**: 95-109.
- Livsey, S. (1993). *Tryblidiopsis pinastri*- Distribution, host, pathogenicity- a literature review. In "Shoot diseases of Conifers". Pp. 167-173. Procc. IUFRO.
- Livsey, S., and Minter, D. W. (1994). The taxonomy and biology of *Tryblidiopsis pinastri*. *Can. J. Bot.* **72**: 549-547.
- Minter, D.W. (1980). *Leptostroma* on pine needles. *Can. J. Bot.* **58**: 906-917.
- Minter, D. W. (1981). *Lophodermium* on Pines. *Mycological Papers* **147**: 1-71. CAB.
- Minter, D. W. (1995). The Rhytismataceae in conifers from Europe. CAB. International Mycological Institute.
- Minter, D. W., Staley, J., and Millar, C. (1978). Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. *Transactions of the British Mycological Society.* **71**: 295-301.
- Minter D. W. and Millar, C. (1980). Ecology and biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *P. sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology.* **10**:169-181.
- Minter D. W. and P. F. Cannon. (1984). Ascospore discharge in some members of the Rhytismataceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* **83**: 65-92.
- Morales, V. M., Pelcher, E. L., and Taylor, J. L. (1993). Comparison of the 5.8 rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Curr. Genet.* **23**: 490-495.

- Morgan D. R. (1997). Decay analysis of large sets of phylogenetic data. *Taxon* **46**: 509-517.
- Moritz, C. & D. M. Hillis, 1996. Molecular systematics: context and controversies. Pp. 1-13. In *Molecular Systematics*. 2<sup>a</sup> Ed. Eds. Hillis, D. M., C. Moritz & B- Mable. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University press. New York.
- Nixon, C. K., and Carpenter, J. M. (1993). On outgroups. *Cladistics*. **9**: 413-426.
- O'Donnell, K. O., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fugikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493.
- Omland, K. E. 1994. Character congruence between molecular and morphological phylogeny for Dabbling ducks (*Anas*). *Syst. Biol.* **43**:369-386.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to view phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS* **12**: 357-358.
- Petrini, O., Stone, K. J., and Carroll, F. E. (1982). Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can. J. Bot.* **60**: 789-796.
- Reddy, P. V., Marshall S. B., Patel R., and J. F. White Jr. (1998). An examination of molecular phylogeny and morphology of the grass endophyte *Balansia claviceps* and similar species. *Mycologia*. **91**: 108-117.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., and Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **29**:319-343.
- Shardl, C. L., Liu, J.-S., White, J. F., Finkel, R. A., An, Z., and Siegel, M. R. (1991). Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. *Plant Syst. Evol.* **178**:27-41.
- Sieber-Canavesi, F., Petrini, O., and Sieber, T. N. (1991). Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. *Mycologia*. **83**: 89-96.
- Sinclair W. A., Lyon, H. H., and Johnson, W. T. (1996). "Diseases of trees and shrubs". Pp. 32-37. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press.

- Smith, S. W., Overbeek, R. Woose, C. R., Gilbert, W., and Gillevet, P. M. (1994). The genetic data environment: An expandable GUI for multiple sequence analysis. *CABIOS* 10: 670-671.
- Spooner, B. M. (1991). *Lophodermium* and *Hypoderma* (Rhytismatales) from Mt Kinabalu, Sabah. *Kew Bulletin*. 46: 73-100.
- Stone J., and O. Petrini. (1997). Endophytes of forest trees: a model for fungus-plant interactions. In "The Mycota, Plant relationships". Pp. 129-140. (Carroll G. and Tudzynski Eds.). Springer- Verlag. Berlin.
- Stone K. J., and J. F. White, Jr. (1999). Biodiversity of endophytic fungi. In: "Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standar Methods for Fungi. Biological Diversity Handbook Series" (G. Mueller, G. Bills, A. Rossman and H. Burdsall eds). Smithsonian Institution Press. (in press).
- Suske, J. and Acker, G. (1989). Identification of endophytic hyphae of *Lophodermium picea* in tissues of green, symptomless Norway spruce needles by immunoelectron microscopy. *Can. J. Bo.* 67: 1768-1774.
- Swofford, D. L. (1999). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. D, D. G Higgins, and T. J. Gibson. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Wayne A. S., Lyon, H. H., and Johnson, W. T. (1996). *Lophodermium* needle cast. In "Diseases of trees and shrubs". Pp 32-33. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press.
- Weir, J. R. (1916). *Hypoderma deformans*, an undescribed needle fungus of the western yellow pine. *Journal of Agricultural Research*. 6: 277-289
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In "PCR protocols: a guide to methods and applications". (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Snisky, J. J., and White, T. J. Eds.). Pp. 315-322. San Diego: Academic Press. San Diego.

- Wilson, R., Wheatcroft, R., Miller, J. D., and Whitney, N. J. (1994). Genetic diversity among natural populations of endophytic *Lophodermium pinastri* from *Pinus resinosa*. *Mycol. Res.* **98**: 740-744.
- Wingfield B. D., Grant, S. D., Wolfaardt, J. F., and Wingfield M. J. (1994). Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis sensu stricto*. *Mol. Biol. Evol.* **11**:376-383.

### **3.7 Acknowledgments**

We thank Dr. Daniel Piñero, Dr. Aaron Liston, Dr. Ignacio Chapela, and Dr. Francisco Espinosa-García for kindly reviewing the manuscript, Alejandra Vazquez Lobo and Angeles Cortes for field and lab assistance. To the Mycological Society of America for a travel grant to S. O.-G. This research was supported by grants from PAPIIT to E. A. B. and by a fellowship from CONACYT and DGIA to S. O.-G.

## CAPÍTULO IV

COMPARACIÓN DE FILOGENIAS ENTRE *Lophodermium* Y *Pinus*. EL PAPEL RELATIVO DE LA COESPECIACIÓN, EL CAMBIO DE HOSPEDERO Y LOS EVENTOS DE DISOCIACIÓN EN LA EVOLUCIÓN DE *Lophodermium* EN PINOS.



## 4.1 Resumen

En este capítulo se presenta la comparación formal entre hipótesis filogenéticas de *Lophodermium* y especies afines de la familia Rhytismataceae con sus hospederos pinos. Se llevaron a cabo dos grupos de comparaciones que correspondieron a diferentes muestreos de especies asociadas. Para la reconstrucción filogenética de los pinos en el primer muestreo se utilizaron caracteres morfológicos y moleculares (secuencias parciales de ITS) en una matriz combinada para 14 taxa de hospederos. La reconstrucción filogenética de los endófitos se generó con secuencias de la región del ITS para un total de 26 taxa. Para el segundo análisis se generaron reconstrucciones filogenéticas con datos de secuencias de ITS, tanto para nueve especies de hospederos como para 20 aislados de hongos asociados. Se utilizó el programa TreeMap para forzar la coespeciación de *Lophodermium* y sus hospederos correspondientes. Para el primer análisis se obtuvieron 10 eventos de coespeciación y para el segundo muestreo seis. Sin embargo, el número de eventos de especiación conjunta para ambas comparaciones no difiere significativamente de una distribución de eventos de coespeciación aleatoria. Se postula que entre las fuentes de incongruencia más relevantes en este sistema se encuentran la especiación independiente de hongos endófitos, probablemente en respuesta a variación intraespecífica en la producción de compuestos secundarios en los hospederos, y eventos de cambio de hospedero, que se facilitan tanto por la distribución simpátrica de varias especies de pinos, así como por el mecanismo de transmisión de los endófitos asociados.

## 4.2 Introducción

Darwin (1859), reconoció que la evolución de la diversidad biológica se constituye de dos aspectos muy importantes, la adaptación y la especiación. Estos dos componentes de la biología evolutiva están ligados a la diversidad de especies y la diversidad de interacciones a través de los procesos de especialización y coevolución (Thompson, 1994). La evolución es el resultado de la interacción dinámica que involucra tres procesos principales: la adaptación, la especiación y la extinción. Dada la gran cantidad de interacciones que ocurren entre las especies que componen un ecosistema, podemos suponer que algunas de estas interacciones influyen en los procesos evolutivos mencionados, dando lugar a la coevolución. El concepto de coevolución, originalmente propuesto por Erlich y Raven (1964), involucra cambio evolutivo recíproco entre especies interactuantes.

El estudio de asociaciones biológicas se puede dar desde dos perspectivas complementarias. A nivel de poblaciones en donde se hace énfasis en la posibilidad de interacciones adaptativas a corto plazo, y el estudio de los procesos evolutivos desde una perspectiva histórica que involucra establecer el grado de asociación filogenética entre grupos de especies (coespeciación) interactuantes así como el grado de modificación mutua que la interacción conlleva (coadaptación). Los estudios de coadaptación deben iniciar con un análisis de coespeciación ya que éste proporciona el fundamento filogenético sobre el cual se pueden resaltar los episodios de modificación mutua. Sin un análisis de este tipo es imposible diferenciar objetivamente escenarios donde se supone que las asociaciones reflejan asociaciones históricas, de escenarios que presuponen poca o ninguna interacción histórica (Brooks y McLennan, 1991).

En general cuando dos o más especies muestran una asociación ecológica en el presente, ésta puede ser el resultado de una asociación ancestral o de una asociación reciente. Cuando los linajes ancestrales de ambos grupos de especies asociadas también presentaron una asociación en el pasado, ésta puede ser "heredada" por los linajes descendientes; a esta interacción se le considera una

asociación por descendencia. Cuando los linajes ancestrales no se encontraban en asociación mutua en el pasado y posteriormente se asocian, a la interacción actual se le considera asociación por colonización o por cambio de hospedero (Brooks, 1988). Los linajes que muestran asociaciones históricas con otros linajes exhiben patrones de coespeciación, esto es especiación paralela. En asociaciones en donde se observa un cambio recíproco, la especiación conjunta representa evidencia de coevolución. Sin embargo en interacciones donde el cambio evolutivo ocurre en un solo sentido, del hospedero al huésped, los patrones de coespeciación conjunta no necesariamente implican coevolución.

Hasta hace relativamente poco tiempo, el estudio de las interacciones desde una perspectiva histórica estaba limitado a la información que pudiera proporcionar el registro fósil sobre estos fenómenos. En ausencia de éste, en general la única alternativa era interpretar información actual de interacciones en un contexto retrospectivo (Dirzo, 1983). El desarrollo de los métodos de reconstrucción filogenética así como de la sistemática molecular, constituyen herramientas poderosas para generar evidencia histórica de interacciones entre especies. Existen varias formas para utilizar las reconstrucciones filogenéticas en el estudio de la evolución de las asociaciones biológicas, la mayoría involucran establecer la congruencia entre las hipótesis filogenéticas de los grupos asociados ecológicamente. Algunos de los métodos sistemáticos desarrollados para el estudio de asociaciones permiten distinguir a los componentes de la asociación que se deben a la historia (asociación por descendencia) de aquellos que se deben a un cambio de hospedero (asociación por colonización).

Dos de los métodos más utilizados en el estudio de las interacciones simbióticas son el método de parsimonia de Brooks (Brooks, 1981; Brooks, 1988; Brooks & McLennan, 1991), y el método de reconciliación de árboles desarrollado por Page (1994a) con base en trabajos previos de Goodman et al. (1979) y Nelson y Platnick (1981). El método de parsimonia de Brooks (1988), considera a la coespeciación equivalente a homología y a la asociación por colonización equivalente a homoplasia. Bajo este enfoque se utiliza a los organismos asociados (huéspedes) y su reconstrucción filogenética como caracteres y series

de transformación, respectivamente, sobre la filogenia de sus hospederos. Diferentes medidas de ajuste como el índice de consistencia (CI), se utilizan para estimar cuantitativamente las proporciones relativas de asociaciones por descendencia y asociaciones por colonización para grupos particulares. Una desventaja de este método es que no permite establecer la fuente de la incongruencia, ya que para determinar si ésta se debe a un cambio de hospedero, a la especiación independiente del huésped, o a la extinción del huésped, se requiere información adicional (Page , 1994b).

El método de reconciliación de árboles desarrollado por Page (1994a) se basa en la reconstrucción de asociaciones de huésped y hospedero a partir de las filogenias independientes de dichos grupos. En este método se maximiza el número de eventos de especiación que se atribuyen a la coespeciación entre los linajes asociados. Esta metodología permite identificar entre posibles fuentes de incongruencia. El fundamento de este método es obtener un mapa de las dos reconstrucciones filogenéticas en donde se identifican pares de nodos que reflejan el mismo evento evolutivo de coespeciación. Otros eventos que se mapean en la reconstrucción de la asociación, corresponden a eventos de duplicación (cuando el huésped presenta un evento de especiación independiente), cambios de hospederos y eventos de disociación (sorting) que incluyen: extinción del huésped, eventos de especiación independiente del hospedero y problemas de muestreo insuficiente.

En general, estos métodos se han desarrollado para estudiar interacciones de parásitos y hospederos (Brooks 1988; Page 1993), sin embargo pueden utilizarse para otros tipos de interacciones en donde se presume que ocurre coevolución. Por ejemplo en asociaciones mutualistas de plantas y polinizadores, hospederos y endosimbiontes (Distel et al. 1994, Bandi et al. 1995), arboles y micorrizas (Swensen 1996), asociaciones entre plantas e insectos fitófagos (Becerra 1997), y asociaciones especializadas de depredador presa (Chapela et al. 1994). Una de las asociaciones que se ha estudiado intensamente en las últimas tres décadas, desde una perspectiva ecológica es la de plantas y hongos endófitos (Carroll y Carroll 1978, Stone White 1999). Algunas de las preguntas

que surgen del estudio de estas asociaciones ampliamente distribuidas son: ¿cuáles son los grados de especificidad entre especies asociadas?, y ¿se trata de asociaciones por descendencia o involucran comúnmente cambios de hospederos?.

En este trabajo se presenta un análisis de la asociación entre hongos endófitos, en su mayoría del género *Lophodermium*, y sus hospederos del género *Pinus*. Existe evidencia de especificidad entre algunas especies fúngicas de este género y sus hospederos (Johnston 1989, 1992). Además, el estudio de la relación de dos especies de *Lophodermium* con su hospedero *P. sylvestris*, representa uno de los pocos ejemplos en los que se tiene evidencia de relaciones antagonistas entre patógenos y endófitos. El posible papel mutualista de la especie endófito (*L. conigenum*) sugiere que la interacción entre estos organismos y sus hospederos posiblemente representa una asociación muy antigua, que pudiera reflejarse en patrones de especiación conjunta. Además, los procesos involucrados en el reconocimiento en asociaciones de patógenos y hospederos pueden incluir mecanismos específicos, muy elaborados y fijos genéticamente (Lamb et al. 1989). Esto, nuevamente sugiere que asociaciones de este tipo pueden tener una larga historia evolutiva.

Si los linajes de hongos endófitos se mantienen asociados de manera estricta con sus hospederos durante largos periodos de tiempo evolutivo, diversos eventos de vicarianza que aíslan a las poblaciones de hospederos también aíslan a las poblaciones de endófitos. En la medida en que estos eventos hayan llevado a la formación de nuevas especies, se podrá evidenciar la especiación conjunta con la obtención de filogenias paralelas. El objetivo de este trabajo es establecer cuál es el papel relativo de la coespeciación, los cambios de hospedero, eventos de especiación independiente y de disociación, en la evolución de la interacción entre especies del género *Pinus* y un grupo de hongos endófitos del género *Lophodermium*.

### 4.3 Materiales y Métodos.

Los análisis de reconstrucción filogenética para ambos grupos de especies estudiadas se llevaron a cabo a partir de secuencias de espaciadores internos transcritos de DNA ribosomal de núcleo (ITS nrDNA). Los métodos de extracción y purificación de DNA así como los parámetros para la amplificación de las secuencias por el método de PCR, se reportan en Liston et al. (1999) y en el Capítulo II de esta tesis. La comparación formal de las filogenias de *Lophodermium* y *Pinus*, reportada en este trabajo se realizó con el método de reconciliación de árboles (Page, 1994b) con base en el programa TreeMap (Page 1995). La comparación formal de filogenias así como la obtención del árbol reconciliado, requieren que todos los huéspedes, en este caso los hongos endófitos, estén asociados a un hospedero. No se contó con las secuencias de ITS de cinco especies de pinos para las que se tenían datos de secuencias de sus hongos endófitos. Debido a esto, se llevaron a cabo dos grupos de muestreos para los análisis de reconstrucción filogenética, así como para la obtención de filogenias reconciliadas.

#### Muestreo de *Lophodermium*.

En el primer análisis se incluyeron 26 secuencias (Tabla 4.1). De este total, 22 secuencias corresponden a miembros del género *Lophodermium* asociados a pinos, dos secuencias son de otros miembros de la familia Rhytismataceae que también se encuentran asociados a pinos: *Meloderma desmazierii* y *Elytroderma deformans*. Además se utilizaron como grupos externos a *Lophodermium piceae* y a *Lirula macrospora*, ambos en hospederos de *Picea* sp. Para el segundo análisis se seleccionaron 20 secuencias del total usadas en el primer análisis (Tabla 4.1). Únicamente las secuencias de endófitos para las cuales se tenía la información de las secuencias de sus hospederos fueron utilizados en este segundo análisis.

Tabla 4.1. Aislados de hongos de la familia Rhytismataceae, incluidos en cada uno de los dos análisis filogenéticos.

Taxon	Análisis 1	Análisis 2
<i>Leptostroma decipiens</i> 1 Petr.	✓	✓
<i>Leptostroma decipiens</i> 2	✓	✓
<i>Leptostroma</i> sp.	✓	✓
<i>Lophodermium australe</i> 1 Dearn	✓	×
<i>Lophodermium australe</i> 2	✓	×
<i>Lophodermium baculiferum</i> 1 Mayr	✓	✓
<i>Lophodermium baculiferum</i> 2	✓	✓
<i>Lophodermium baculiferum</i> 3	✓	✓
<i>Lophodermium baculiferum</i> 4	✓	✓
<i>Lophodermium conigenum</i> 1 (Brunaud) Hillitz	✓	×
<i>Lophodermium conigenum</i> 2	✓	×
<i>Lophodermium indianum</i> 1 Singh & Minter	✓	×
<i>Lophodermium indianum</i> 2	✓	✓
<i>Lophodermium molitoris</i> Minter	✓	×
<i>Lophodermium nitens</i> Darker	✓	✓
<i>Lophodermium piceae</i> (Fckl.) Höhn	✓	✓
<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad. ex Fr.) Chev.	✓	✓
<i>Lophodermium seditiosum</i> Minter, Staley u. Millar	✓	✓
<i>Lophodermium</i> sp 1	✓	✓
<i>Lophodermium</i> sp 2	✓	✓
<i>Lophodermium</i> sp 3	✓	✓
<i>Lophodermium</i> sp 4	✓	✓
<i>Lophodermium</i> sp 5	✓	✓
<i>Elytroderma deformans</i> (Weir) Darker	✓	✓
<i>Lirula macrospora</i> (Hartog) Darker	✓	✓
<i>Meloderma desmazieri</i> (Duby) Darker	✓	✓

## Muestreo de *Pinus*.

En el primer análisis se seleccionaron las especies de pinos para las cuales se tenía información de secuencias de ITS de sus huéspedes endófitos.

Dado que cinco especies de hospederos para las que se han aislado especies de *Lophodermium* no cuentan con datos moleculares, se llevó a cabo la construcción una matriz de datos combinada para los pinos. Esta matriz contenía las secuencias parciales de la región de ITS para ocho especies de pinos y el grupo externo *Picea* con un total de 654 pares de bases, así como 70 caracteres morfológicos para todas las especies mencionadas y para cinco especies más de las cuales se tenía únicamente la información de los caracteres morfológicos (Tabla 4.2).

El segundo análisis filogenético para los pinos incluyó únicamente las especies para las que se tenían los datos de secuencias de ITS (Tabla 4. 2) . Esto con el objetivo de poder hacer una comparación más directa de las tasas de evolución molecular entre pinos y sus endófitos asociados.

Tabla 4.2. Especies de pinos incluídas en cada uno de los dos análisis de reconstrucción filogenética.

Host	Análisis 1	Análisis 2
<i>Pinus ayacahuite</i> Ehrenb	✓	✓
<i>P. chiapensis</i> (Martínez) Andresen	✓	✓
<i>P. contorta</i> Dougl.	✓	✓
<i>P. douglasiana</i> Martínez	✓	✓
<i>P. greggii</i> Engelm.	✓	×
<i>P. hartwegii</i> .	✓	✓
<i>P. montezumae</i> Lamb.	✓	✓
<i>P. palustris</i> Miller	✓	×
<i>P. ponderosa</i> Dougl.	✓	✓
<i>P. pseudostrobus</i> Lind.	✓	×
<i>P. radiata</i> D. Don	✓	×
<i>P. sylvestris</i> L.	✓	✓
<i>P. taeda</i> L.	✓	×
<i>Picea mexicana</i>	✓	✓



## Análisis filogenéticos y de comparación de filogenias.

Todos los análisis de reconstrucción filogenética se llevaron a cabo con el método de máxima parsimonia. Para lo cual se utilizó el programa PAUP\* Versión 4 (Swofford 1998). Todas las búsquedas se hicieron con las rutinas de *branch and bound*, con lo cual nos aseguramos que se obtiene el árbol más corto.

Una vez inferidas las reconstrucciones filogenéticas de los dos grupos de especies asociadas, se obtuvieron los árboles reconciliados utilizando el programa MapTree (Page, 1995). Dado que el método de reconstrucción de asociaciones busca la reconstrucción que maximiza los eventos de especiación conjunta, se requiere de evaluar si dicha reconstrucción es evidencia real de un patrón general de coespeciación o si bien no difiere significativamente de la hipótesis nula que establece que la filogenia del huésped es independiente de la filogenia del hospedero. El método que se ha implementado para poner a prueba esta hipótesis se basa en obtener los eventos de coespeciación entre filogenias de huéspedes y hospederos generadas al azar. Así la proporción de filogenias aleatorias que tengan el mismo número o un número mayor de eventos de especiación conjunta, corresponde a la probabilidad de obtener el valor observado como producto del azar (Page, 1994). Este método de obtención aleatoria de topologías se llevó a cabo con 1000 réplicas, para ambos grupos de reconstrucciones obtenidas. Se generaron topologías para los hospederos, para los huéspedes y para ambos simultáneamente, para las cuales se obtuvieron los árboles reconciliados y el número de eventos de coespeciación.

Por último, se estimó la divergencia entre linajes asociados mediante la comparación de longitudes de ramas equivalentes entre las topologías de endófitos y hospederos. Esta prueba de correlación determina si las tasas relativas de sustitución entre las especies de la filogenia de hospederos, son consistentes con las tasas relativas entre las especies de huéspedes en la filogenia de los hongos.

## 4.4 Resultados

### Reconstrucción filogenética.

Para el análisis de los endófitos que incluyó los 26 aislados se obtuvieron 20 árboles filogenéticos igualmente parsimoniosos con una longitud de 317 pasos (CI = 0.7098, RI = 0.8728). Para el análisis que incluyó únicamente 20 aislados de endófitos se obtuvieron dos árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 284 pasos (CI = 0.7465, RI = 0.8491).

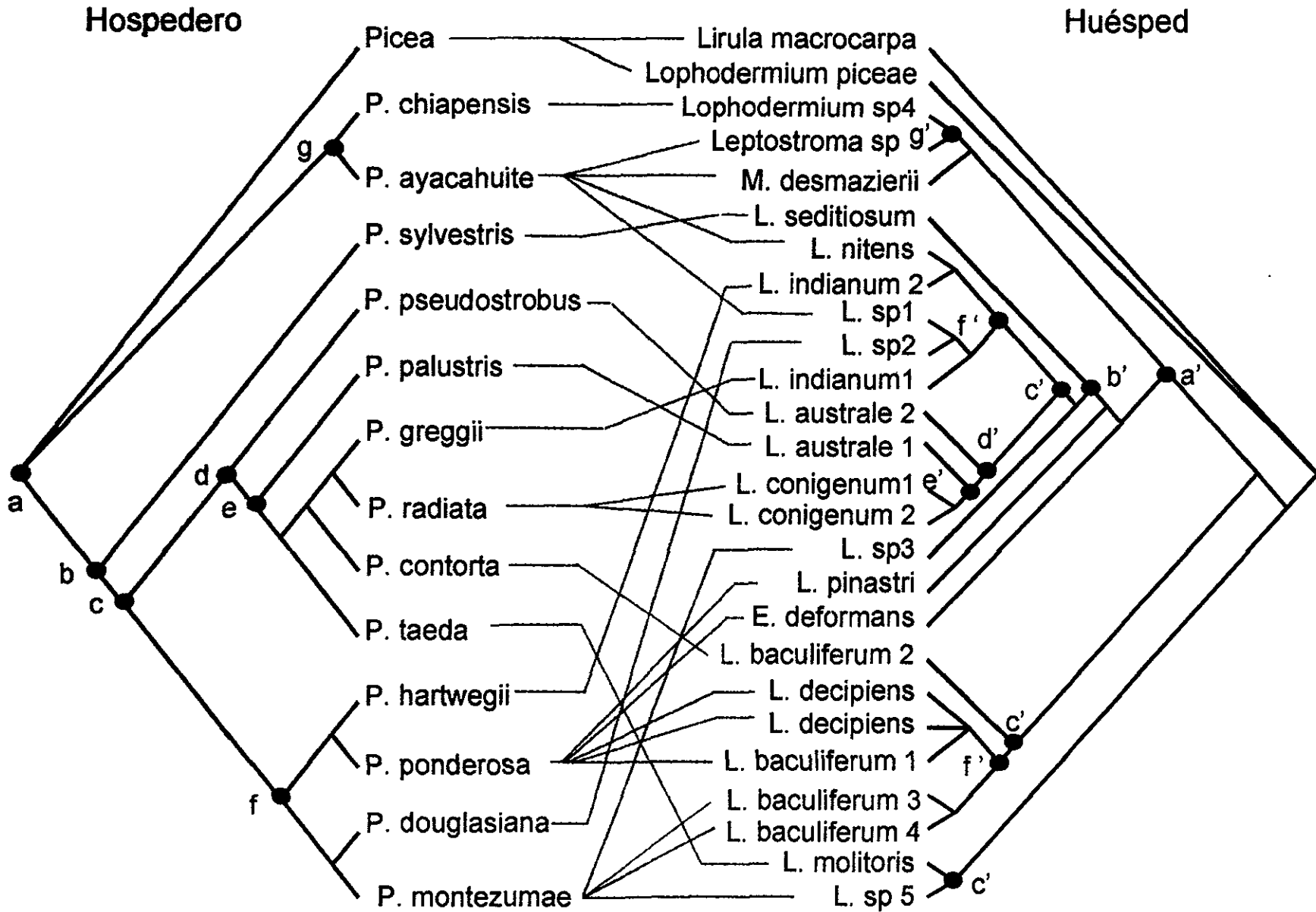
Para el análisis combinado de los hospederos que incluyó 14 especies de pináceas (13 pinos y una picea), se obtuvieron 3 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 386 pasos (CI = 0.8264, RI = 0.7666). En el análisis en el que se incluyeron 9 pináceas, se obtuvo un sólo árbol más parsimonioso con una longitud de 244 pasos (CI = 0.9631, RI = 0.9313).

Todas y cada una de estas topologías más parsimoniosas obtenidas con las especies muestreadas de cada uno de los dos análisis se compararon entre sí. En cada caso se seleccionó la comparación que presentó el mayor número de eventos de especiación conjunta y cuando se obtenían dos reconstrucciones con el mismo número de eventos de especiación se seleccionó la que presentaba el menor número de eventos de disociación (sorting).

La figura 4.1 muestra la comparación de hipótesis filogenéticas entre 14 hospederos y 26 taxa de hongos asociados. La hipótesis filogenética de los pinos corresponde a una de tres igualmente parsimoniosas obtenida mediante el análisis combinado con una matriz de datos morfológicos y moleculares. La hipótesis filogenética de los hongos huéspedes corresponde a una de 20 topologías igualmente parsimoniosas encontrada para el muestreo de 26 aislados de hongos ascomicetos. Se seleccionaron estas dos topologías después de comparar un total de 60 combinaciones de topologías (3 x 20), por que presentaron el mayor número de eventos de especiación conjunta y el menor número de eventos de disociación, antes de llevar a cabo la búsqueda exhaustiva que incluye posibles cambios de hospedero. Las líneas entre los grupos de especies ilustran los patrones de asociación. Las letras asignadas a diferentes

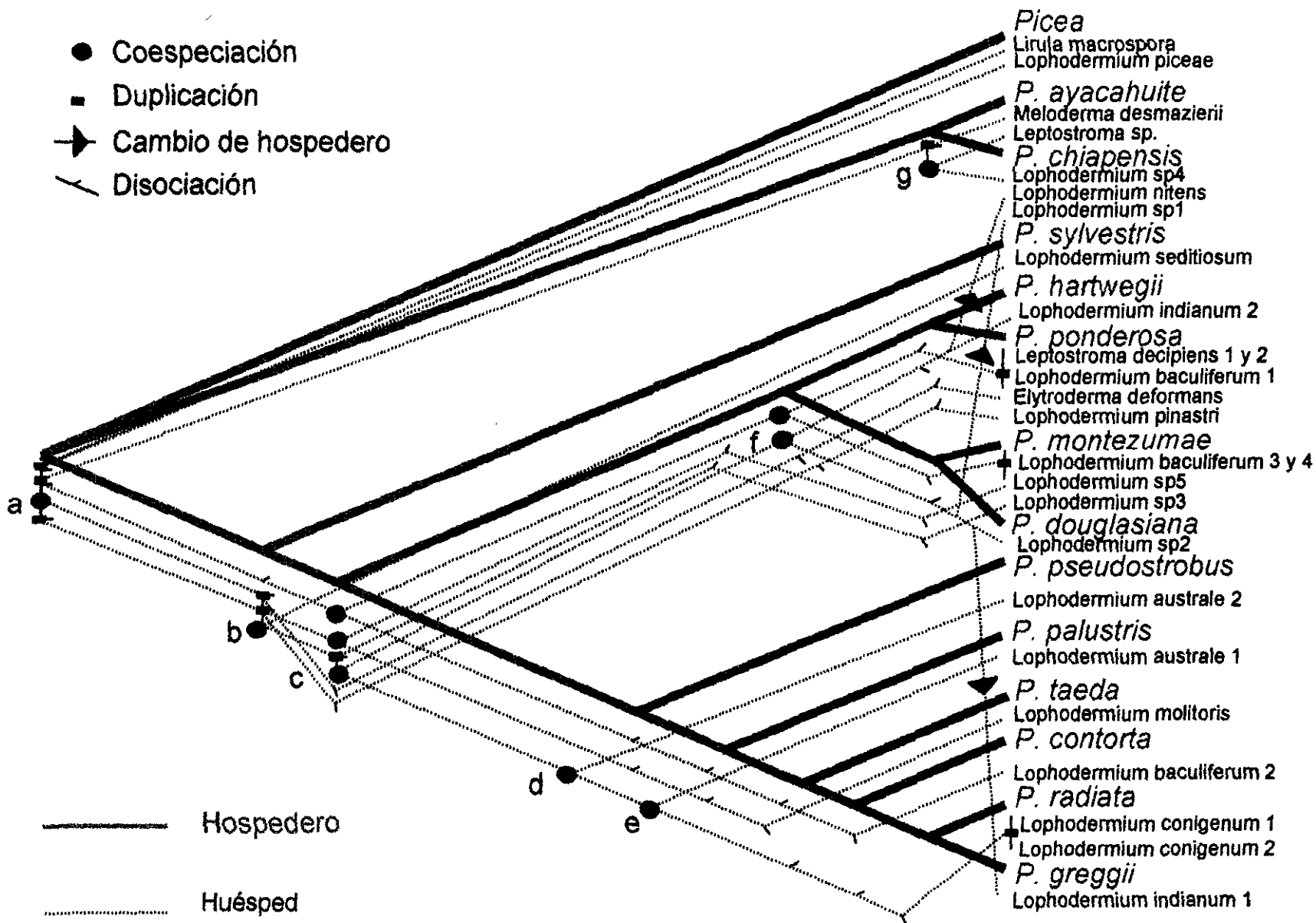
nodos dentro de cada reconstrucción filogenética corresponden a posibles eventos de coespeciación obtenidos a partir de una búsqueda exhaustiva. Siete eventos de especiación en la filogenia de estos pinos se pueden asociar con 10 eventos de especiación en la filogenia de sus huéspedes ascomicetos. El número de eventos de coespeciación postulados, es menor para los hospederos pinos porque hay eventos de coespeciación en los hongos que ocurren después de eventos de especiación independiente.

**Figura 4.1.** Comparación de una hipótesis filogenética de 13 especies de pinos, con *Picea* como grupo externo, y 26 hongos asociados del género *Lophodermium*. Las líneas entre las topologías muestran los patrones de asociación de diferentes taxa terminales. Los nodos con círculos muestran eventos donde se postula especiación paralela y las letras iguales indican eventos correspondientes.



La figura 4. 2 muestra el mapa de las anteriores topologías reconciliadas. Se postulan 10 eventos de coespeciación, 10 eventos de duplicación (especiación independiente de los hongos), 3 cambios de hospedero, y 32 eventos de disociación. Cuatro de los diez eventos de especiación conjunta están también relacionados con eventos de duplicaciones en donde el huésped endófito diverge de manera independiente a la divergencia del hospedero. En las ramas terminales se observan además tres posibles eventos de duplicación. Los posibles casos de cambios de hospedero postulados por esta reconstrucción de asociaciones ocurren en ramas terminales y se dan tanto entre especies hospederas del subgénero *Pinus* como entre especies de pinos de ambos subgéneros.

**Figura 4.2.** Mapa de las reconstrucciones filogenéticas de 13 especies de pinos, con *Picea* como grupo externo y 26 aislados de hongos asociados. Se observan escenarios de cambio de hospedero y de especiación independiente del huésped para explicar la incongruencia.



El análisis de aleatorización de árboles para establecer si el número de eventos de especiación conjunta difiere significativamente de una distribución al azar, dió como resultado que el patrón observado no se puede distinguir de un patrón aleatorio. El resultado fue consistente tanto para la generación de árboles al azar calculados para los huéspedes, como para árboles al azar de los hospederos y para el caso en el que se obtuvieron árboles aleatorios para ambos linajes.

La correlación entre la longitud de las ramas de huéspedes y hospederos fue de  $r = 0.8925$ . Este valor alto de correlación entre longitudes de ramas de huéspedes y hospederos nos indica que la reconstrucción obtenida está relativamente bien apoyada por la información de las topologías comparadas. Las longitudes de las ramas de la topología de los hospederos corresponden a cambios tanto de caracteres morfológicos como moleculares, para la mayoría de las especies de pinos. Sin embargo cinco especies de pinos presentan longitudes de ramas obtenidas únicamente a partir de cambios de caracteres morfológicos.

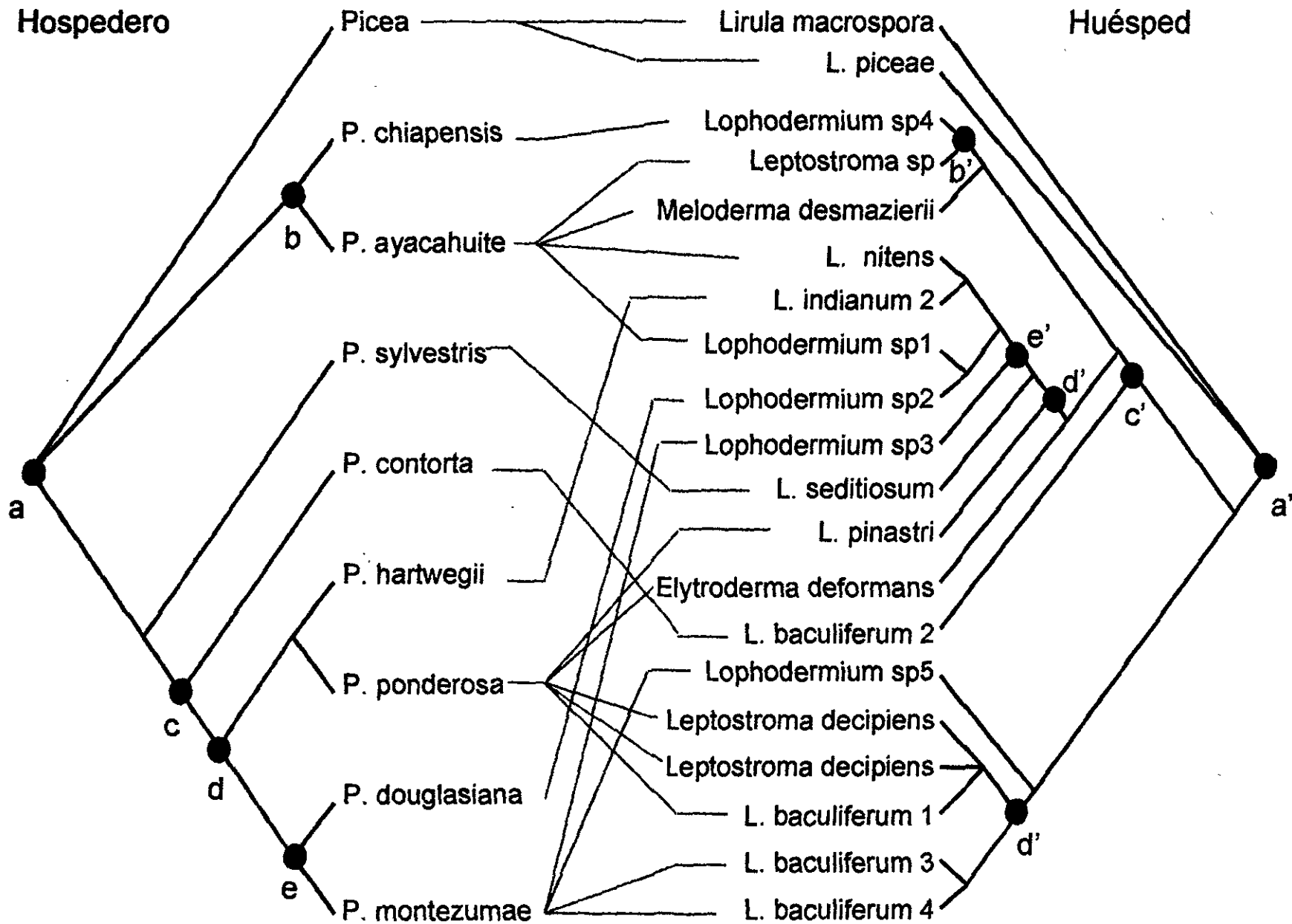
Los resultados del segundo análisis con un muestreo más limitado de especies se muestran en las figuras 4.3 y 4.4. En este caso, TreeMap interpretó la comparación de topologías de hospederos y huéspedes con un total de seis eventos de coespeciación, cinco en los hospederos y seis en los hongos, uno de estos eventos de coespeciación ocurre después de un cambio de hospedero. La reconstrucción postula además, cinco cambios de hospedero, cinco duplicaciones y 10 eventos de disociación. Los eventos de cambio de hospederos postulados, ocurren tanto en ramas terminales como en algunas ramas internas. Los eventos de coespeciación postulados ocurren en cuatro casos asociados a eventos de especiación independiente de los hongos. Nuevamente se observan cambios de hospederos dentro del subgénero *Pinus* y entre miembros de ambos subgéneros.

La correlación entre la longitud de las ramas de huéspedes y hospederos fue de  $r = 0.42$ , este valor de correlación indica un apoyo pobre para los eventos reconstruidos con la información topológica disponible. En este caso, únicamente se correlacionan longitudes de ramas correspondientes a sustituciones de

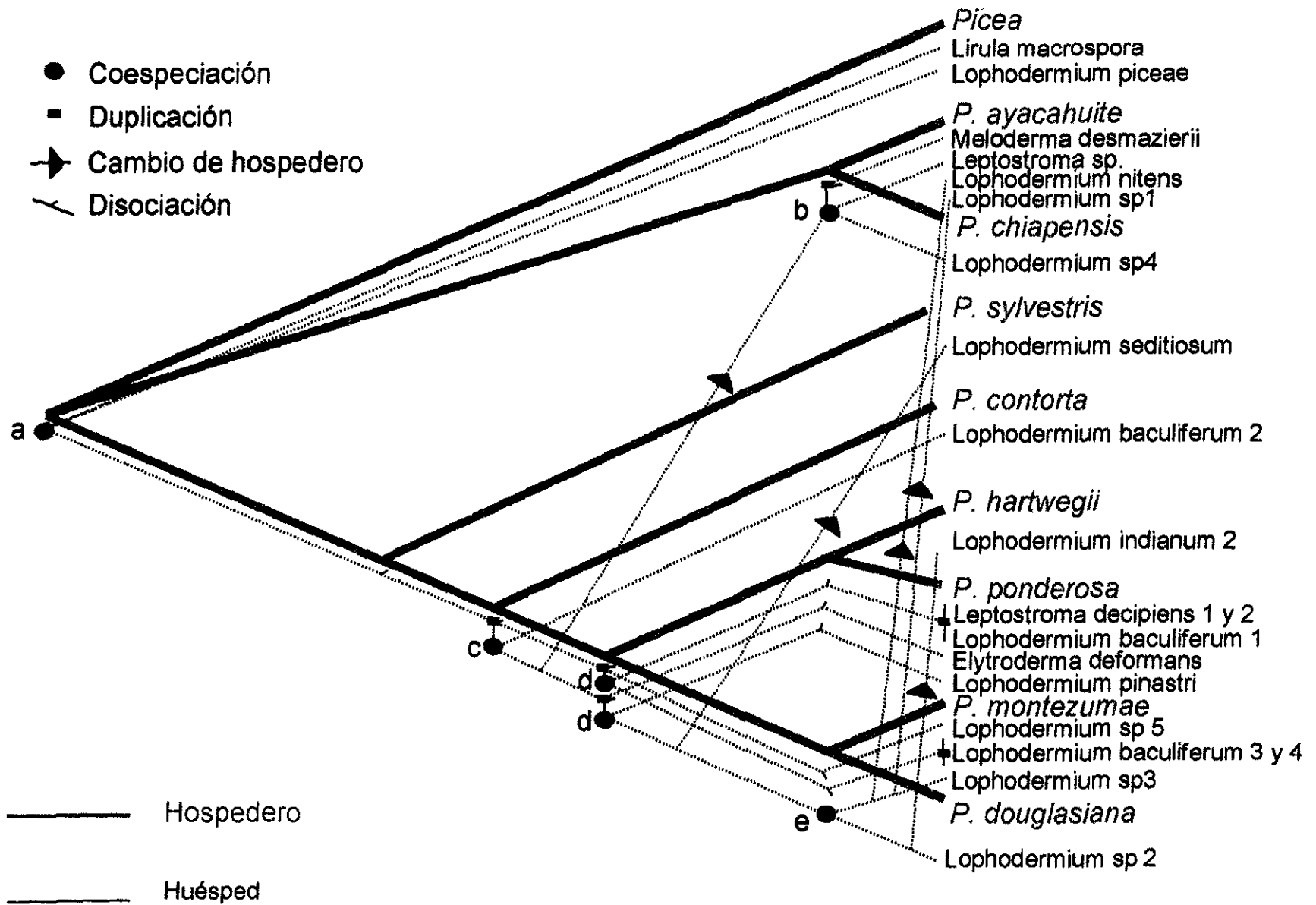
nucleótidos para ambos linajes por lo que la interpretación de este resultado es más explícita.

**Figura 4.3.** Comparación de una hipótesis filogenética de 8 especies de pinos, con *Picea* como grupo externo, y 20 aislados de hongos asociados del género *Lophodermium*. Las líneas entre las topologías muestran los patrones de asociación de diferentes taxa terminales. Los nodos con círculos muestran eventos donde se postula especiación paralela y las letras iguales indican eventos correspondientes.





**Figura 4.4.** Mapa de las reconstrucciones filogenéticas de 8 especies de pinos, con *Picea* como grupo externo y 20 aislados de hongos asociados. Se observan escenarios de cambio de hospedero y de especiación independiente del huésped para explicar la incongruencia.



## 4.5 Discusión

Existen algunos problemas con el enfoque utilizado para el estudiar las asociaciones entre *Lophodermium* y sus hospederos pinos, a partir de la comparación de las filogenias obtenidas de manera independiente. Dado que para cada linaje se encontró mas de una hipótesis filogenética igualmente parsimoniosa, se obtienen a su vez varias hipótesis de reconstrucción de asociaciones. La decisión de evaluar con más detalle únicamente las reconstrucciones que maximizan el número de eventos de coespeciación, se puede considerar análoga a utilizar el principio auxiliar de Henning (ver Capítulo I) en sistemática (Brooks y McLennan, 1991). Al definir la “mejor “ reconstrucción como la que maximiza el número de eventos de coespeciación, se busca explicar la mayor parte de la historia de los linajes como historia compartida, debida a una causa común (Page, 1994a). De cualquier forma esta decisión representa un sesgo a priori hacia la coespeciación. Esto debe tenerse en cuenta sobre todo en los sistemas en los que la coespeciación domina la reconstrucción de las asociaciones, y debe llevar a evaluar también reconstrucciones subóptimas.

La reconstrucción de la asociación obtenida presenta varios eventos de coespeciación, sin embargo, el número de eventos de coespeciación observado no difiere del obtenido para asociaciones aleatorias. Aunque estos resultados rechazan la hipótesis de que en la asociación de hongos endófitos del género *Lophodermium* y sus hospederos pinos ocurre evolución paralela, esto no excluye la posibilidad de que un subgrupo de los linajes asociados presente codivergencia con sus hospederos. Cambios de hospedero, así como eventos de especiación independientes por parte de los hongos son relativamente frecuentes por lo que estos fenómenos tienen un importante papel en la dinámica evolutiva de la asociación.

La falta de congruencia entre las hipótesis filogenéticas de *Pinus* y *Lophodermium* puede tener varias fuentes. Para algunas especies de pinos se ha reportado gran variación interespecífica en la composición de terpenos (Valterová et al. 1995). Si parte de esta variación se correlaciona con distintas poblaciones

de pinos y la capacidad de algunos hongos endófitos de colonizar las acículas depende de la composición de compuestos secundarios, posiblemente algunos linajes sean capaces de especializarse a nivel de poblaciones de pinos y eventualmente divergir y especiar en estas poblaciones sin que exista de por medio una especiación del hospedero. Este proceso podría explicar en parte, el alto número de eventos de duplicación (especiación independiente de los hongos) observados en las reconstrucciones obtenidas. Una primera aproximación para poner a prueba esta hipótesis requiere de datos de la composición química de las especies y de distintas poblaciones de pinos con las que se asocian diferentes especies de *Lophodermium*. Becerra (1997) encontró evidencia de que la composición química de árboles de *Bursera* que sirven de alimento a escarabajos del género *Blefarida*, tiene un papel preponderante en determinar las asociaciones que presentan estos grupos de especies, así como los cambios de hospederos observados. La autora observó varios cambios de hospedero entre diferentes linajes de *Bursera*, pero muy pocos de estos cambios de hospedero ocurrieron entre especies de *Bursera* con composiciones químicas muy contrastantes.

Otro factor que puede explicar la incongruencia entre filogenias es la frecuencia de eventos de cambios de hospedero. El mecanismo de transmisión de los hongos endófitos es por transferencia horizontal por medio de esporas dispersadas por el viento o el agua (Minter y Cannon, 1984). Esto facilita los cambios de hospedero en sitios donde varias especies de pinos se distribuyen de manera simpátrica. Un mecanismo de transferencia vertical, por ejemplo en las semillas podría restringir las posibilidades de cambios de hospederos. En el caso de la asociación entre endófitos de gramíneas se ha documentado que la asociación por descendencia es común (shardl et al. 1997). Las especies de *Epichloë* (Clavicipitaceae) simbioses de pastos, presentan variación en los mecanismos de transferencia entre hospederos. Las especies fúngicas con transferencia vertical por semillas muestran patrones de especiación conjunta con sus hospederos, los hongos con transferencia horizontal tienen rangos de hospederos más amplios y menos especificidad. Un sistema modelo en donde se ha evidenciado coespeciación, corresponde a los topos de bolsillo (pocket

gophers) y sus piojos parásitos (Hafner y Page, 1995). Varias características biológicas de este sistema han favorecido la especiación conjunta. Estos roedores de la familia *Geomyidae* comúnmente son solitarios y las diferentes especies se distribuyen de manera alopátrica, sus parásitos asociados miembros de la familia Trichodectidae, llevan a cabo todo su ciclo de vida en sus hospederos y tienen pocas posibilidades de cambiar de hospedero.

En el caso de *Lophodermium* y pinos, en ambos análisis, las reconstrucciones hipotéticas de linajes asociaciones postulan un gran número de eventos de disociación. La falta de un registro fósil en donde se encuentre evidencia de este tipo de asociaciones, así como lo limitado del muestreo, impiden determinar la causa real de las disociaciones observadas. Cuando no se tiene un linaje del hongo asociado con un evento de especiación del hospedero, puede deberse a que el endófito no se encuentra (es decir se extinguió) o bien a que no fue muestreado. Se tiene evidencia de que en algunos casos ocurrió esto último. Para algunas especies de *Lophodermium*, por ejemplo *L. durilabrum*, no fue posible obtener cultivos. Esto sugiere que los requerimientos de esta especie son muy específicos. Probablemente otras especies con alta especificidad en sus requerimientos tampoco fueron muestreadas y por lo tanto los resultados obtenidos pueden estar sesgados por que las especies incluidas tienen un rango más amplio y por lo tanto pueden representar linajes más generalistas. Un muestreo más exhaustivo que incluya un mayor número de especies putativamente especialistas puede proporcionar evidencia adicional de coespeciación e ilustrar la dinámica evolutiva de estos organismos.

## 4.6 Referencias Bibliográficas

- Bandi C., M. Sironi, G. Damiani, L. Magrassi, C. A. Nalepa, U. Laudani y L. Sacchi. 1995. The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **259**: 293-299.
- Becerra, X. J. 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science*, **276**: 253-256.
- Brooks, D. R. 1981. Hennig parasitological method: a proposed solution. *Syst. Zool.* **28**:299-307.
- Brooks, D. R. 1988. Macroevolutionary comparisons of host and parasite phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**:235-259
- Brooks, D. R. & D. A. McLennan, 1991. *Phylogeny, Ecology and Behavior. A research Program in Comparative Biology.* The University of Chicago Press. 434p.
- Carroll, G. C., y Carroll, F. E. (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* **56**: 3034-3043.
- Chapela, H. I., S. A. Rehner, T. R. Schultz, y U. G. Mueller. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* **266**: 1691-1694.
- Darwin C. 1859. *The Origin of Species.* Facsimil de la primera edición. Mentor Books, New York.
- Dirzo, R. 1983. El significado del "co" en coevolución. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* **44**:91-44.
- Distel D. L., H. Felbeck, C. M. Cavanaugh. 1994. Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbionts and their bivalve hosts. *J. Mol. Evol.* **38**: 533-542.
- Erlich P. R. & P. H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study of coevolution. *Evolution* **18**:586-608.
- Goodman M., J. Czelusniak, G. W. Moore, A. E. Romero-Herrera & G. Matsuda. 1979. Fitting the gene lineage into its species lineage: A parsimony strategy

- illustrated by cladograms constructed from globin sequences. *Syst. Zool.* **28**:132-168.
- Hafner M. S. & R. D. M. Page. 1995. Molecular phylogenies and host parasite cospeciation: gophers and lice as a model system. *Phil. Trans R. Soc. Lond.* **349**: 77-83.
- Johnston, P. R. 1989. Rhytismataceae in New Zealand. The genus *Lophodermium* on indigenous plants. *New Zealand Journal of Botany.* **27**:243-274.
- Johnston, P. R. 1992. Rhytismataceae in New Zealand. 6. Checklist of species and hosts, with keys to species in each hosts genus. *New Zealand Journal of Botany.* **30**: 329-351.
- Lamb C. J., M. A. Lawton, M. Dron y R. A. Dixon. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**: 215-224
- Liston, A., W.A. Robinson, D. Piñero y E. R. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **11**: 95-109.
- Minter D. W. & P. F. Cannon 1984. Ascospore discharge in some members of the Rhytismataceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* **83**: 65-92.
- Nelson G. & N. Platnick. 1981. Systematics and Biogeography. Cladistics and Vicariance. Columbia University Press. New York. 567 p.
- Page, R. D. M. 1993. Parasites, phylogeny and cospeciation. *Intern. J. Parasit.* **23**: 499-506.
- Page R. D. M. 1994a. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*, **10**: 155-173.
- Page R. D. M. 1994b. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms, and areas. *Syst. Biol.* **43**: 58-77
- Page R. D. M. 1995 . TreeMap for windows. Version 1.0a.
- Schardl, C. L., A. Leutschmann, K. -R. Chung, D. Penny y M. Siegel. 1997. Coevolution by common decent of fungal (*Epichloë* spp.) and grass hosts. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 133-143.



- Stone K. J., y J. F. White, Jr. (1999). Biodiversity of endophytic fungi. *En: Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standar Methods for Fungi. Biological Diversity Handbook Series*. Eds. G. Mueller, G. Bills, A. Rossman and H. Burdsall. Smithsonian Institution Press. (in press).
- Swensen M. S. 1996. The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot.* **83**: 1503-1512.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP\*, Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 . Sunderland, MA: Sinauer.
- Thompson J. N. 1994. *The Coevolutionary Process*. The University of Chicago Press. Chicago & London. 376 p.
- Valterová I., K. Sjödin, J. Vrkoc & T Norin. 1995. Contents and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem oleoresins from four *Pinus* species growing in Cuba. Comparison of trees unattacked and attacked by *Dioryctria horneana*. *Bioch. Syst. and Ecol.* **23**: 1-15.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El enfoque filogenético para el estudio de la dinámica evolutiva de la asociación endófito-hospedero desde una perspectiva histórica, permite descubrir patrones evolutivos a gran escala. Este acercamiento complementario al estudio de las interacciones, permite poner a prueba hipótesis de asociación por descendencia, coadaptación, y coevolución, así como establecer la influencia real de los hospederos sobre la evolución de sus organismos asociados.

Tradicionalmente se ha sugerido que los hospederos juegan un papel determinante en la evolución de sus simbioses, particularmente parásitos. Bajo esta premisa, se habían establecido una serie de supuestos respecto a las asociaciones de parásitos hospederos que se daban por ciertas y que incluso se llegaron a llamar reglas (Barrett, 1986). Con estos supuestos se estableció el llamado método parasitológico que indicaba que la filogenia de los parásitos podía resolver las relaciones filogenéticas de los hospederos, además aplicadas a la taxonomía de hongos, define las especies en función de los hospederos en donde se encuentran. Los resultados de este trabajo producto de la comparación formal de filogenias, sugieren que para el caso de *Lophodermium* y pinos, la especiación independiente y la colonización juegan un importante papel en la dinámica de la asociación, y que la posible influencia de los pinos hospederos sobre sus simbioses no necesariamente modula la macroevolución de éstos.

La utilización de la inferencia filogenética para el estudio de las interacciones, tiene como ventaja que incluye la producción independiente de hipótesis filogenéticas para ambos grupos de linajes. Esto permite expandir el conocimiento del sistema de estudio ya que con una filogenia disponible se pueden estudiar muchos otros aspectos de la evolución de los organismos,

además de sus asociaciones históricas. Para el caso de esta tesis se abarcaron dos de estos aspectos: se exploró la congruencia entre hipótesis de parentesco producto de diferentes grupos de datos, y además se evaluó la importancia de los caracteres morfológicos usados en taxonomía tradicional de hongos. Diversos aspectos a estudiar desde una perspectiva filogenética incluyen entre otros: la adaptación, la biogeografía, los tiempos de aparición de linajes y la correlación de tasas de evolución morfológica y molecular.

El método de árboles reconciliados de Page (1994a) para el estudio de interacciones, ha resuelto varios problemas metodológicos que otros enfoques no habían solucionado. Sin embargo, se detectaron algunos problemas metodológicos por resolver: la inclusión de topologías con politomías en los análisis de reconstrucción de asociaciones y la posibilidad de incluir parásitos de vida libre.

Los resultados de la comparación de hipótesis filogenéticas, probablemente reflejan de manera fiel lo que sucede en la naturaleza dentro de las asociaciones de endófitos y hospederos. Es una dinámica compleja en donde podemos encontrar toda la gama de procesos que intervienen en la evolución. Se observan grupos con asociaciones históricas y que posiblemente han coevolucionado con sus asociados, y también hay otros grupos de interactuantes que representan asociaciones fortuitas recientes resultado de preadaptaciones oportunistas. Esto probablemente ocurre tanto en linajes emparentados, como entre diversos grupos de hongos no relacionados entre sí.

La biología de la interacción entre hongos que no presentan mecanismos de transferencia vertical y sus hospederos puede limitar la posibilidad de desarrollar alta especificidad y de establecer el escenario para la coespeciación, como ocurrió en el caso de *Lophodermium* y pinos. Otros sistemas con características biológicas similares probablemente tampoco muestren filogenias paralelas.

De los resultados obtenidos en este trabajo, surgen numerosas hipótesis respecto a la asociación pinos- endófitos que pueden ponerse a prueba. Entre otras están las siguientes: establecer si los cambios de hospedero de los

endófitos ocurren entre especies con composiciones similares de terpenos y otros compuestos secundarios. Explorar si las especies de *Lophodermium* que mostraron divergencia en una sola especie de hospedero lo hacen en respuesta a variación intraespecífica de la composición química de la especie de pino.

Establecer si los cambios en el uso de substrato y en el tiempo de reproducción observados en los hongos patógenos, se encuentran en otros grupos de linajes con ambos tipos de simbioses. Por último, otro enfoque importante que se desprende de este trabajo, incluye desarrollar modelos de la interacción entre *Lophodermium* y pinos en donde se contrasten atributos de historia de vida de endófitos y patógenos para establecer las condiciones que favorecen una u otra estrategia de vida.

## BIBLIOGRAFIA

- Allard, M. W. & J. M. Carpenter, 1996. On weighting and congruence. *Cladistics* **12**:183-198.
- Álvarez- Buylla E. R. & F. J. Espinosa-García. 1995. Proyecto presentado al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Tecnológica de la UNAM.
- Alvin, K.L. 1960. Further conifers of the Pinaceae from the Wealden Formation of Belgium. *Bull. Inst. Roy. Sci. Nature. Belgique* **146**:1-39.
- Axelrod, D. I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **73**: 565-641.
- Bailey, D. K. 1970. Phytogeography and taxonomy of *Pinus* subsection *Balfourianae*. *Ann Mo. Bot. Gard.* **57**: 210-249.
- Baker, R. H., X. Yu, & R. Desalle. 1998. Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**: 427-436.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F. Cambell, C. S., & Donoghue M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **82**: 247-277.
- Bandi C., M. Sironi, G. Damiani, L. Magrassi, C. A. Nalepa, U. Laudani & L. Sacchi. 1995. The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **259**: 293-299.
- Barret, J. A. 1986. Host parasite interactions and systematics. Pp. 1-17. *En Coevolution and Systematics*. Eds. Stone A. R. & D. L. Hawksworth. Clarendon Press. Oxford. USA.
- Becerra, X. J. 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science*, **276**: 253-256.
- Bergmann, F. & E. M. Gillet. 1997. Phylogenetic relationships among *Pinus* species (*Pinaceae*) inferred from different numbers of 6PGDH loci. *Pl. Syst. Evol.* **208**: 25-34.
- Bowman B. H. & J. W. Taylor. 1993. Molecular phylogeny of pathogenic and nonpathogenic Onygenales. Pp 169-178. *En The fungal holomorph: Mitotic,*

- Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Eds. D R. Reynolds & J. W. Taylor, CAB International, Wallingford, Oxon.
- Bowman B. H., T. J. White, & J. W. Taylor. 1996. Human pathogenic fungi and their close nonpathogenic relatives. *Mol. Phylogenet. Evol.* **6**: 89-96.
- Bremer, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* **42**: 795-803.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* **10**: 295-304.
- Brooks, D. R. 1981. Hennig parasitological method: a proposed solution. *Syst. Zool.* **28**: 299-307.
- Brooks, D. R. 1988. Macroevolutionary comparisons of host and parasite phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**:235-259
- Brooks, D. R. & D. A. McLennan, 1991. Phylogeny, Ecology and Behavior. A Research Program in Comparative Biology. The University of Chicago Press. 434 p.
- Bruns, T. D., T. J. White & J. W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*: **22**: 525-564.
- Buchholz, J.T. 1951. A flat-leaved pine from Annam, Indo-China. *Amer. J. Bot.* **38**: 245-252.
- Bull, J.J., J. P. Huelsenbeck, C. W. Cunningham, D. L. Swofford & P. J. Waddell. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 384-397.
- Cannon, P. F., & D. W. Minter. 1983. The nomenclatural history and typification of *Hypoderma* and *Lophodermium*. *Taxon.* **32**: 572-583.
- Cannon, P. F. & D. W. Minter. 1986. The Rhytismataceae of the Indian subcontinent. *Mycological Papers* **155**: 1-25.
- Cannon, P. D. & D. L. Hawksworth. 1995. The diversity of fungi associated with vascular plants: the know, the unknown and the need to bridge the knowledge gap. Pp. 277-302. *En Advances in Plant Pathology* Vol. 11. Academic Press.
- Carbone, I., & L. M. Kohn. 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* **85**: 415-427.
- Carroll, C. G. & F. E. Carroll 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* **56**: 303-3043.

- Carvajal, S. & R. Mc Vaugh. 1992. *Pinus*. In *Flora Novo Galiciana: A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico*. Vol. 17 ed. W.R. Anderson, Ann. Arbor. Mi. The University of Michigan Herbarium. Pp 32-100.
- Chapela, I. & Boddy L. 1988. Fungal colonization of attached beech branches. *New Phytol.* **110**: 47-57.
- Chapela, H. I., S. A. Rehner, T. R. Schultz, & U. G. Mueller. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* **266**: 1691-1694.
- Chaw, S.M., H.M. Sung, H. Long, A. Zharkikh & W.H. Li. 1995. The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus* and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* **37**: 224-230.
- Chaw, S. M., A. Zharkikh, H.S. Sung, T.C. Lau & W.H. Li. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 56-68.
- Childs, T. W., K. R. Shea & J. L. Stewart. 1971. *Elytroderma* disease of ponderosa pine. *Forest Pest Leaflet.* **42**: 1-6.
- Clay, K. 1988a. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10-16.
- Clay, K. 1988b. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. Pp. 79-105. *En Coevolution of Fungi with Plants and Animals*. Academic Press. USA.
- Chippindale, P. T. & J. J. Wiens. 1994. Weighting, partitioning and combining characters in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **43**: 278-287.
- Coffey, K., C.W. Benkman & B. G. Milligan (in press). The adaptative significance of spines on pine cones. *Ecology*.
- Critchfield, W. B. 1986. Hybridization and classification of the white pines (*Pinus* section *Strobus*). *Taxon* **35**: 647-656.
- Cunningham, C. W. 1997. Can three incongruence test predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* **14**: 733-740.
- Darker, G. D. 1967. A revision of the genera of the Hypodermataceae. *Can. J. Bot.* **45**: 1399-1444.

- Darwin C. 1859. *The Origin of Species*. Facsimil de la primera edición. Mentor Books, New York.
- De Queiroz, A. 1993. For consensus (sometimes). *Syst. Biol.* **42**: 368-72.
- De Queiroz, A., M. J. Donoghue & J. Kim. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **26**: 657-681.
- DiCosmo, F., T. R. Nag-Rag & B. Kendrick. 1983. Prodrumus for a revision of the Phacidiaceae and related anamorphs. *Can. J. Bot.* **61**: 31-44.
- Dirzo, R. 1983. El significado del "co" en coevolución. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* **44**:91-44.
- Distel D. L., H. Felbeck, & C. M. Cavanaugh. 1994. Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbionts and their bivalve hosts. *J. Mol. Evol.* **38**: 533-542.
- Donoghue M. J. & M. J. Sanderson. 1992. The suitability of molecular and morphological evidence in reconstructing plant phylogeny. Pags. 340-368 *En Molecular Systematics of Plants*. Soltis P. S. Soltis D. E. & J. J. Doyle Eds. Chapman & Hall.
- Doyle, J. J., & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin.* **19**: 11-15.
- Dubuisson J.-Y., R. Hébant-Mauri & J. Galtier. 1998. Molecules and morphology: conflicts and congruence within the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae). *Mol. Phy. Evol.* **9**: 390-397.
- Egger, K. N. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* **73**: S1415-S1422.
- Eguiluz-Piedra, T. 1985. Origen y evolución del género *Pinus*. *Dasonomia Mexicana* **3**: 5-31.
- Ellis, M. B., & J. P. Ellis. 1997. *Microfungi on land plants. An identification handbook.* The Richmond Publishing Co. Ltd. England. 868 pp.
- Enkerlin, E. C. & A. Madero-Enkerlin. 1999. Cotorras serranas. *Escala*. Noviembre: 75-80.
- Erlich P. R. & P. H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study of coevolution. *Evolution* **18**:586-608.



- Espinosa-García, F. J., & J. H. Langenheim. 1990. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population. Diversity and spatial patterns. *New Phytol.* **116**: 89-98.
- Espinosa-García, F. J., P. Saldivar-García & J. H. Langenheim 1993. Dose-dependent effects In Vitro of essential oils on the growth of two endophytic fungi in coastal redwood leaves. *Biochem. Syst. Ecol.* **21**: 185-194.
- Farjon, A. 1984. Pines: Drawings and Descriptions of the Genus *Pinus*. Leiden: E.J. Brill & W. Backhuys.
- Farjon, A. 1990. Pinaceae: Drawings and descriptions of the genera. *Regnum Vegetabile* **121**: 1-330.
- Farjon, A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Bot. J. Linn. Soc.* **121**: 365-384.
- Farjon, A. & T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica Monograph 75. New York Botanical Garden. 293 p.
- Farris, J. S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* **5**: 417-419.
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge & C. Bult 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.
- Felsenstein, J. 1978. The number of evolutionary trees. *Syst. Zool.* **27**: 27-33.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferre, Y de. 1965. Structure des plantules et systematique de genre *Pinus*. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse.* **100**: 230-280.
- Ferrusquía, V. I. 1993. Geology of Mexico: a Synopsis, Pp. 3-107. *En Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution.* Eds T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot & J. Fa. New York: Oxford University Press.
- Fisher, P. J., F. Graft, L. E. Petrini, B. C. Sutton, & P. A. Wooley. 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia* **87**: 319-323.
- Florin, R. 1963. The distribution of Conifer and Taxad genera in time and space. *Acta Horti Bergiani* **20**: 240-285.

- Frankis, M. P. 1988. Generic interrelationships in Pinaceae. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* **45**: 527-548.
- Futuyma, D. J. & M. Slatkin 1983. *Coevolution*. Pp. 1-13. Sinauer Associates Inc. USA.
- Gaudet J., J. Julien, J. F. Lafay, & Y. Brygoo. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 227-242.
- Gaussen H. 1960. *Pinus*. Pp 1-272 in Les gymnosperms actualles et fossiles, vol Tome II, Section I Volume I Chapter Xi, Fascicle VI. Toulouse, France: Travaux du Laboratoire Forestier de Toulouse.
- Gernandt, D. S., A. Liston & D. Piñero. 1999. Systematics and evolution of the pinyon pines (*Pinus* subsection *Cembroides* s. l.): insights from the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. XVI International Botanical Congress. Abstracts.
- Glenn A. E., Bacon, C. W., Price, R., & Hanlin, R. T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* **88**: 384-394.
- Goodman M., J. Czelusniak, G. W. Moore, A. E. Romero-Herrera & G. Matsuda. 1979. Fitting the gene lineage into its species lineage: A parsimony strategy illustrated by cladograms constructed from globin sequences. *Syst. Zool.* **28**:132-168.
- Govindaraju, D., P. Lewis & C. Cullis. 1992. Phylogenetic analysis of pines using ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. *Pl. Syst. Evol.* **179**:141-153.
- Greguss, P. 1955. Identification of living gymnosperms on the basis of xylotomy. Budapest: Akademia Kiado.
- Hafner M. S. & R. D. M. Page. 1995. Molecular phylogenies and host parasite cospeciation: gophers and lice as a model system. *Phil. Trans R. Soc. Lond.* **349**: 77-83.
- Hansen, E. M. & K. J. Lewis. 1997. Compendium of Conifer Diseases. Pp. 51-55. APS Press.
- Harrington, F. A. & D. Potter. 1997. Pyhlogenetic relationships within *Sarcoscypha* based upon nucleotide sequences of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* **89**: 258-267.

- Hart, J. 1987. A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *J. Arnold Arbor.* **68**: 269-30.
- Haszprunar, G. 1998. Parsimony analysis as a specific kind of homology estimation and the implications for character weighting. *Mol. Phyl. Evol.* **9**: 333-339.
- Hata, K., & K. Futai. 1993. Effect of Needle aging on the total colonization rates of endophytic fungi on *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora* needles. *J. Jpn. For. Soc.* **75**: 338-341.
- Hata, K. & Futai K. 1995. Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Can. J. Bot.* **74**: 103-114.
- Hauser, D. L. & W. Presch. 1991. The effect of ordering characters on phylogenetic reconstruction. *Cladistics* **7**:243-265.
- Hawkins, J. A., C. E. Huges & R. W. Scotland. 1997. Primary homology assesment, characters and character states. *Cladistics* **13**: 275-283.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton & D. N. Pegler. 1995. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi (Ed. 8). International Mycological Institute.
- Hillis, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 23-42.
- Hillis, D. M. & J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assesing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 182-192.
- Hudson, R. H. 1960. The anatomy of the genus *Pinus* in relation to its classification. *J. Inst: Wood Sci.* **6**: 26-46.
- Huelsenbeck, J. P. , J. J. Bull & C. W. Cunningham. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol. Evol.* **11**:152-158.
- Jacobs K. A., & S. A. Rehner. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* **90**: 601-610.
- Jährig, M. 1962. Beiträge zur Nadelanatomie und Taxonomie der Gattung *Pinus* L. *Willdenowia* **3**: 329-366.
- Jasalavich, C. A., V. M. Morales, L. E. Pelcher & G. Séguin-Swartz. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* **99**: 604-614.

- Johnson, L. A., & D. E. Soltis. 1994. *matK* DNA sequencing and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae *sensu stricto*. *Syst. Bot.* **19**:13-156.
- Johnston, P. R. 1986. Rhytismataceae in New Zealand. Some foliicolous species of *Coccomyces* de Notaris and *Propolis* (Fries) Corda. *New Zealand Journal of Botany.* **24**: 89-124.
- Johnston, P. R. 1988. A new species of *Meloderma* (Rhytismataceae), with notes on *Meloderma* and related genera. *Mycotaxon.* **33**: 423-436.
- Johnston, P. R. 1989. Rhytismataceae in New Zealand. The genus *Lophodermium* on indigenous plants. *New Zealand Journal of Botany.* **27**: 243-274.
- Johnston, P. R. 1990. Rhytismataceae in New Zealand. The genus *Hypoderma*. *New Zealand Journal of Botany.* **28**: 159-183.
- Johnston, P. R. 1992. Rhytismataceae in New Zealand. 6. Checklist of species and hosts, with keys to species in each hosts genus. *New Zealand Journal of Botany.* **30**: 329-351.
- Johnston, P. 1997. Tropical Rhytismatales. Pp. 241-254. *En Biodiversity of Tropical Microfungi*. Ed. K. D. Hyde. Hong Kong University Press.
- Johnston P. R., & D. Jones. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-roots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* **89**: 420-430.
- Jukes, T. H. & C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-132. *En Mammalian Protein Metabolism*. Ed. H. N. Munro, Academic Press, New York.
- Jones, T. R., A.G. Kluge & A.J. Wolf. 1993. When theories and methodologies clash: a phylogenetic reanalysis of the North American ambystomatid salamanders (Caudata: Ambistomaitdade). *Syst. Biol.* **42**: 92-102.
- Keeley, J. E. & .P. H. Zedler 1998. Evolution of life history in *Pinus*. Pp. 219-250. *En Ecology and Biogeography of Pinus*. Ed D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Kelley, S. T., & B. D. Farrell. 1999. Phylogeny of bark beetle/pine interactions. XVI International Botanical Congress. Abstracts. 15.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions trough comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:11-120.

- Kitching, I. J. 1994. Tree-building techniques. Pp. 44-71. *En Cladistics. A Practical Course in Systematics*. Eds. Forey P. L., C. J. Humpries, I. J. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert & D. M. Williams. Clarenton Press. Oxford.
- Klaus, W. 1980. Neue Beobachtungen zur Morphologie des Zapfens von *Pinus* und ihre Bedeutung für die Systematik, fossil bestimmung, Arealgestaltung and Evolution der Gattung. *Pl. Syst. Evol.* **134**:137-171.
- Klaus, W. 1989. Mediterranean pines and their history. *Pl. Syst. Evol.* **162**: 133-163.
- Kluge, A. G. & J. S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- Kluge, G. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, serpentes). *Syst. Zool.* **38**:7-25.
- Kluge, G. 1998. Total evidence or taxonomic congruence: cladistic or consensus clasification. *Cladistics* **14**: 151-158.
- Ko, K. S., S. G. Hong & H. S. Jung. 1997. Phylogenetic analysis of *Trichaptum* based on nuclear 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **89**: 727-734.
- Koehne, 1893. Deutsche Dendrologie. Stuttgart: Ferdinand Enke.
- Kowalski, T. & R. D. Kehr. 1995. Fungal endophytes of living branch bases in several european tree species. Pp 67-86. *En Endophytic Fungy in Grasses and Woody Plants*. Eds: Redlin S. C. & L. M. Carris. APS Press.
- Krupkin, A. B., A. Liston & S.H. Strauss. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*) from chloroplast DNA restriction site analysis. *Am. J. Bot.* **83**: 489-498.
- Krutovskii, K. V., D. V. Politov & Y. P. Altuhnov. 1994. Genetic differentiation and phylogeny of stone pine species based on isozyme locy. Pp 19-30. *In Proceedings International Workshop on subalpine stone pines and their environment: the status of our knowledge. September 5-11, 1992. Compilers: Schmidt, W. C. & F.-K. Holtmeier. St. Moritz, Switzerland.*
- Kuhls, K., E. Lieckfeldt, G. J. Samuels, W. Meyer, C. P. Kubricek, & T. Börner. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* **80**: 442-462.

- Lamb C. J., M. A. Lawton, M. Dron & R. A. Dixon. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**: 215-224
- Lanyon, J. W. 1966. A card key to *Pinus* based on needle anatomy. New South Wales-Australia: The Hon. J. G. Beale, M.E. M.I.E. Aust. M.L.A., Minister of Conservation.
- Larson, A. 1994. The comparison of morphological and molecular data in phylogenetic systematics. Pp. 371-390. *In* Molecular Ecology and Evolution Approches and Applications. Eds Schierwater, B. Streit, B. Wagner G.P. & DeSalle R. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Lee, S. B., & J. W. Taylor. 1992. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 636-653.
- Liston, A. & E. R. Alvarez-Buylla. 1995. Nuclear ribosomal DNA sequences from conifers: "There is a fungus among us". *Inoculum* **46**:26.
- Liston, A., W.A. Robinson, D. Piñero & E. R. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **11**: 95-109.
- Little, E. L. Jr. & Critchfield W. B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus*. USDA Forest Service Miscellaneous Publication 1144. Washington D. C.
- Livsey, S. 1993. *Tryblidiopsis pinastri*- Distribution, host, pathogenicity- a literature review. *En* "Shoot diseases of Conifers". Pp. 167-173. Procc. IUFRO.
- Livsey, S., & D. W. Minter. 1994. The taxonomy and biology of *Tryblidiopsis pinastri*. *Can. J. Bot.* **72**: 549-547.
- Lussenhop, J. & R. Fogel. 1999. Seasonal change in phosphorus content of *Pinus strobus*- *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizae. *Mycologia* **91**: 742-746.
- Madrigal, S. X. & D. M. Caballero. 1969. Una nueva especie mexicana de *Pinus*. *Bol. Tecn. Inst. Nac. Invest. Forest. México* **26**: 1-11.
- Mai, D. H. 1989. On the history of pines (*Pinus* L.) in Europe. Pp. 299-309. *In* the Proceedings of the symposium "Paleofloritics and Paleoclimatic changes in the Cretaceous and Tertiary.

- Malusa, J. 1992. Phylogeny and biogeography of the pinyon pines (*Pinus susect. Cembroides*). *Syst. Bot.* **17**:42-66.
- Margulis, L. & K. V. Schwartz, 1981. Cinco reinos: Guía Ilustrada de los Phyla de la Vida en la Tierra. Ed. Ciencias por una educación Popular. 304 p.
- Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos, ed 2. Mexico City .Ediciones Botas. 368 p.
- Mason-Gamer, R. J. & E. A. Kellogg. 1996. Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae). *Syst. Biol.* **45**: 524-545.
- McCune, B. 1988. Ecological diversity in North American pines. *Am. J. Bot.* **75**: 353-368.
- Mickevich, M. F. & J. S. Farris. 1981. The implications of congruence in *Menidia*. *Syst. Zool.* **30**: 351-370.
- Millar, C. I. & B. B. Kinloch, 1991. Taxonomy, phylogeny, and coevolution of pines and their stem rusts. Pp 1-38. *En Rust on Pine*. Proceedings of the IUFRO Rust of Pine Working Party Conference, September 18-22 1989, Banff, Alberta; Canada, eds Y. Hiratsuka, J. K. Samoil, P.V. Blenic, P.E. Crane, & B.L. Laishley. Canada, Edmond, Alberta.
- Millar, C.I. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus* L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **80**: 471-498.
- Millar, C.I. 1998. Early evolution in pines. Pp. 69-91. *En Ecology and Biogeography of Pinus*. Ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Miller, C. N. 1976. Early evolution in Pinaceae. *Rev. Paleobot. Palynol.* **21**: 101-117.
- Miller, C. N. & J. M. Malinky. 1986. Seed cones of *Pinus* from the late Cretaceous of New Jersey, U. S. A. *Rev. Paleobot. Palynol.* **46**:257-272
- Minelli, A. 1993. Biological Systematics. The state of the Art. Chapman and Hall. 387 p.
- Minter, D.W. 1980. *Leptostroma* on pine needles. *Can. J. Bot.* **58**: 906-917.
- Minter, D. W.1981. *Lophodermium* on pines. *Mycological Papers* **147**: 1-71. CAB.
- Minter, D. W. 1995. The Rhytismataceae in conifers from Europe. CAB. International Mycological Institute.
- Minter, D. W., J. Staley & C. Millar. 1978. Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. *Transactions of the British Mycological Society.* **71**: 295-301.

- Minter, D. W. & C. Millar. 1980. Ecology and biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *P. sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology*. **10**: 169-181.
- Minter, D. W. & P. F. Cannon 1984. Ascospore discharge in some members of the Rhytismataceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* **83**: 65-92.
- Mirov, N. T. 1967. The Genus *Pinus*. The Ronald Press Company. New York. 602p.
- Miyamoto, M. M. & W. M. Fitch. 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Syst. Biol.* **44**: 64-76.
- Morales, V. M., E. L. Pelcher, & J. L. Taylor. 1993. Comparison of the 5.8 rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Curr. Genet.* **23**: 490-495.
- Moran, G. F., D. Smith, J. C. Bell & R. Appels. 1992. The 5SRNA genes in *Pinus radiata* and the spacer region as a probe for relationships between *Pinus* species. *Pl. Syst. Evol.* **183**: 209-221.
- Morgan, D. R. 1997. Decay analysis of large sets of phylogenetic data. *Taxon* **46**: 509-517.
- Moritz, C. & D. M. Hillis, 1996. Molecular systematics: context and controversies. Pp. 1-13. *En Molecular Systematics*. 2<sup>nd</sup> Ed. Eds. Hillis, D. M., C. Moritz & B- Mable. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University press. New York.
- Nelson G. & N. Platnick. 1981. Systematics and Biogeography. Cladistics and Vicariance. Columbia University Press. New York. 567 p.
- Nixon, C. K., & Carpenter, J. M. 1993. On outgroups. *Cladistics*. **9**: 413-426.
- O'Donnell, K. O., E. Cigelnik & H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phytogeography of the *Gibberella fugikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493.
- Omland, K. E. 1994. Character congruence between molecular and morphological phylogeny for Dabbling ducks (*Anas*). *Syst. Biol.* **43**: 369-386.
- Page, R. D. M. 1993. Parasites, phylogeny and cospeciation. *Intern. J. Parasit.* **23**: 499-506.



- Page R. D. M. 1994a. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*, **10**: 155-173.
- Page R. D. M. 1994b. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms, and areas. *Syst. Biol.* **43**: 58-77
- Page R. D. M. 1995 . TreeMap for windows. Version 1.0a.
- Page, R. D. M. 1996. On consensus, confidence and "total evidence". *Cladistics* **12**: 83-92.
- Patterson, C., D. M. Williams & C. J. Humphries. 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 153-188
- Penny, J. S. 1947. Studies on the Magothy flora. *Am. Jour. Bot.* **34**: 281-296.
- Penny, D. & M. D. Hendy 1986. Estimating the reliability of evolutionary trees. *Mol. Biol. Evol.* **3**: 403-417.
- Perez de la Rosa, J., S. A. Harris & A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor Appl. Genet.* **91**:1101-1106.
- Perry, J. P. Jr. 1991. The pines of Mexico and Central America. Portland, Oregon: Timber Press. 231 p.
- Petrini, O. & G. Carroll. 1981. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Can. J. Bot.* **59**: 629-636.
- Petrini, O., K. J. Stone & F. E. Carroll, 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can. J. Bot.* **60**: 789-796.
- Petrini, L. & O. Petrini. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia*, **38**: 216-234.
- Piovesan, G., C. Pelosi, A. Schirone & B. Schirone. 1993. Taxonomic evaluations of the genus *Pinus* (Pinaceae) based on electrophoretic data of salt soluble and insoluble seed storage proteins. *Pl. Syst. Evol.* **186**: 57-68.
- Price, R. A., A. Liston & S.H. Strauss. 1998. Phylogeny and Systematics of *Pinus*. Pp 49-68. *In Ecology and biogeography of Pinus*. Ed. D.M. Richardson. Cambridge University Press.
- Quicke, D. L. J. 1993. Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy. Blackie Academic and Professional an imprint of Chapman and Hall. 311p.

- Reddy, P. V., S. B. Marshall, R. Patel & J. F. White Jr. 1998. An examination of molecular phylogeny and morphology of the grass endophyte *Balansia claviceps* and similar species. *Mycologia*. **91**: 108-117.
- Rushforth, K. 1987. Conifers. London: Helm.
- Rodrigues, K. F. & G. J. Samuels. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* **94**: 827-830.
- Saikkonen, K., S. H. Faeth, M. Helander, & T. J. Sullivan. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **29**: 319-343.
- Salas, L. R. 1998. La inferencia filogenética como una aproximación a la historia natural del género de hongos endófitos *Lophodermium* Chev. (Ascomycota) en dos especies mexicanas de pinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Samuels, G. J. & K. A. Seifert. 1995. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Ann. Rev. Phytopathology* **33**: 37-67.
- Sanderson, M. J. 1989. Confidence limits on phylogenies: the bootstrap revisited. *Cladistics*. **5**:113-129.
- Saylor, L. C. 1964. Karyotype analysis of *Pinus*-- group Lariciones. *Silvae Genet.***13**:165-170.
- Saylor, L. C. 1972. Karyotype analysis of *Pinus*--Subgenus *Pinus*. *Silvae Genet.* **21**:155-163.
- Saylor, L. C. 1983. Karyotype analysis of *Pinus*-- subgenus *Strobus*. *Silvae Genet.* **32**: 119-124.
- Schirone, B. G. Piovesan, R. Bellarosa & C. Pelosi. 1991. A taxonomic analysis of seed proteins in *Pinus* spp. (*Pinaceae*). *Pl. Syst. Evol.* **178**: 43-53.
- Seitz V., S. Ortíz-García & A. Liston (en prensa). Alternative coding strategies and the inapplicable data coding problem. *Taxon* (en prensa).
- Shardl, C. L., Liu, J.-S., White, J. F., Finkel, R. A., An, Z., & Siegel, M. R. 1991. Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. *Plant Syst. Evol.* **178**:27-41.

- Schardl, C. L., A. Leutschmann, K. -R. Chung, D. Penny & M. Siegel. 1997. Coevolution by common decent of fungal (*Epichloë* spp.) and grass hosts. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 133-143.
- Shaw, G. R. 1914 The Genus *Pinus*. Publications of the Arnold Arboretum 5. Forage Village, Massachusetts: The Murray Printing Co.
- Shurkhal, A., A. Podogas & L. Zhivotovsky. 1992. Allozyme differentiation in the genus *Pinus*. *Silvae Genet.* **41**: 105-109.
- Siddall, M. 1997. Prior agreement: arbitration or arbitrary?. *Syst. Biol.* **46**: 765-769.
- Sieber-Canavesi, F., O. Petrini, & T. N. Sieber. 1991. Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. *Mycologia.* **83**: 89-96.
- Sigurgeisson A. & E. A. Szmidt. 1993. Phylogenetic and biogeographic implications of chloroplast variation in *Picea*. *Noruegan J. Bot.* **13**: 233-246
- Simon, L., J. Busquets, R. C. Lévesque & M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Sinclair, W. A., Lyon, H. H., & Johnson, W. T. 1996. Diseases of Trees and Shrubs. Pp. 32-37. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press.
- Smith, A.G., D. G. Smith & B.M. Funnell. 1994. Atlas of Mesozoic and Cenozoic Coast Lines.
- Smith, D. E. & A. S. Klein. 1994. Phylogenetic inferences on the relationships of North American and European *Picea* species based on nuclear ribosomal 18S sequences and the internal transcribed spacer region. *Mol. Phyl. Evol.* **3**: 17-19.
- Smith, S. W., R. Overbeek, C. R. Woose, W. Gilbert & P. M. Gillevet. 1994. The genetic data environment: An expandable GUI for multiple sequence analysis. *CABIOS* **10**: 670-671.
- Snyder, M. A. 1999. Geographic differentiation of squirrel-pine interactions. XVI International Botanical Congress. Abstracts. 271.
- Spooner, B. M. 1991. *Lophodermium* and *Hypoderma* (Rhytismatales) from Mt Kinabalu, Sabah. *Kew Bulletin.* **46**: 73-100.

- Stone J. & O. Petrini. 1997. Endophytes of forest trees: a model for fungus-plant interactions. Pp. 129-140. *En The Mycota, Plant relationships*. Eds. Carroll G. & Tudzynski. Springer-Verlag. Berlin.
- Stone, K. J., & J. F. White, Jr. 1999. Biodiversity of endophytic fungi. *En Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Fungi*. Biological Diversity Handbook Series. Eds. G. Mueller, G. Bills, A. Rossman & H. Burdsall. Smithsonian Institution Press. (en prensa).
- Strauss, S. H. & Doerksen, A.H. 1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* **44**: 1081-1096.
- Stubblefield, S. P., & T. N. Taylor. 1983. Studies of Paleozoic fungi. I The structure and organization of *Traquairia* (Ascomycota). *Am. J. Bot.* **70**: 387-399.
- Styles, B. T. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican purview. Pp 397-420. *In Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Eds. T. P. Ramamoorthy et al. New York: Oxford University Press.
- Suske, J. & G. Acker. 1989. Identification of endophytic hyphae of *Lophodermium picea* in tissues of green, symptomless Norway spruce needles by immunoelectron microscopy. *Can. J. Bo.* **67**: 1768-1774.
- Swensen M. S. 1996. The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot.* **83**: 1503-1512.
- Swofford, D. L. 1991. When are Phylogeny Estimates From Molecular and Morphological Data Incongruent? Pp. 295-333. *In Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Eds. M.M. Miyamoto & J. Cracraft. Oxford University Press, New York.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP\*, Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 . Sunderland, MA: Sinauer.
- Taylor, T. N. 1990. Fungal associations in the terrestrial paleoecosystem. *Trends in Ecology and Evolution* **5**: 21-25.
- Taylor, T. N. 1994. The fossil history of ascomycetes. Pp 167-164. *En Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. Ed. D. L. Hawksworth. Plenum Press, New York.

- Templeton, A.R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. *Evolution* **37**: 221-244.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, & T. J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- Thompson, J. N. 1989. Concepts of coevolution. *Trends in Ecology and Evolution* **4**: 179-183.
- Thompson J. N. 1994. *The Coevolutionary Process*. The University of Chicago Press. Chicago & London. 376 p.
- Tomback, D. F. & Y. B. Linhart. 1990. The evolution of bird-dispersed pines. *Evol. Ecol.* **4**: 185-209.
- Tsumura, Y., K. Yoshimura, N. Tomaru & K. Ohba. 1995. Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR amplified specific chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.* **91**:1222-1236.
- Valterová I., K. Sjödin, J. Vrkoc & T. Norin. 1995. Contents and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem oleoresins from four *Pinus* species growing in Cuba. Comparison of trees unattacked and attacked by *Dioryctria homeana*. *Bioch. Syst. and Ecol.* **23**: 1-15.
- Van der Burgh, J. 1973. Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia" zu Herzogenrath, "Zukunft West" zu Eschweiler und "Victor" (Zülpich Mitte) zu Zülpich. Nebster einer systematisch-anatomischen Bearbeitung der Gattung *Pinus* L. *Rev. Paleobot. Palynol.* **15**: 73-275.
- Van der Heijden M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemkem & I. R. Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **365**: 69-72.
- Wang, X.-R. & A. E. Szmidt. 1993. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian species (*Pinaceae*). *Pl. Syst. Evol.* **188**: 197-221.

- Wang X.-R., Y. Tsumura, H. Yoshimaru, K. Nagasaka & A. E. Szmidt. (in press). Phylogenetics relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer and *trnV* intron sequences. *Am J. Bot.* (in press).
- Wayne A. S., H. H., Lyon & W. T. Johnson. 1996. *Lophodermium* needle cast. Pp 32-33. *En Diseases of trees and shrubs*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press.
- Vázquez-Lobo Y. A. 1996. Filogenia de hongos endófitos en el género *Pinus* L. : implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Weir, J. R. 1916. *Hypoderma deformans*, an undescribed needle fungus of the western yellow pine. *Journal of Agricultural Research*. **6**: 277-289
- Wheeler, W. C., J. Gatesy & R. DeSalle. 1995. Ellison: a method for accomodating multiple molecular sequence alignments with alignment-ambiguous sites. *Mol Phylogenet. Evol.* **4**: 1-9.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. Pp. 315-322. *En PCR protocols: a guide to methods and applications*. Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Snisky, & T. J. White. San Diego: Academic Press. San Diego.
- Wiley, E. O. 1981. Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. John Wiley & Sons. 439 p.
- Williams, D. M. 1994. DNA analysis: theory. Pp. 89-101. *En Cladistics. A Practical Course in Systematics*. Eds. Forey, P. L., C. J. Humpries, I. J. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert & D. M. Williams. Clarenton Press. Oxford.
- Willis, K. J., K. D. Bennet & H. J. B. Birks. 1998. The late Quaternary dynamics of pines in Europe. Pp. 107-121. *En Ecology and Biogeography of Pinus*. Ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press.
- Wilson, R., R. Wheatcroft, J. D. Miller, & N. J. Whitney. 1994. Genetic diversity among natural populations of endophytic *Lophodermium pinastri* from *Pinus resinosa*. *Mycol. Res.* **98**: 740-744.

- Wingfield B. D., S. D. Grant, J. F. Wolfaardt, & M. J. Wingfield. 1994. Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis sensu stricto*. *Mol. Biol. Evol.* **11**:376-383.
- Wu, H. & Z. Hu. 1997. Comparative anatomy of resin ducts in Pinaceae. *Trees* **11**: 135-143.
- Yoshie, F. & Sakai A. 1985. Types of Florin rings, distributional patterns of epicuticular wax, and their relationships in the genus *Pinus*. *Can. J. Bot.* **63**: 2150-2159.

APENDICE

MATRIZ DE CARACTERES MORFOLOGICOS.

	10	20	30	40	50	60	70
<i>Cathaya</i>	? 0 ? ? ? 0 1 0 0 1 ? ? ? ? ? 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 ? ? 0 0 0 1 ? 1 1 ? ? ? ? ? ? ? ? ? 1 0 0 0 0 0 0 0 ? 1 ? 0 1 0 0 ? ? 1 2 ? 0 0 1 ? ? 0						
<i>Picea</i>	? 0 ? ? ? 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 0 1 0 0 0 ? ? ? ? ? ? ? ? ? 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 2 0 0 0 1 0 ? ?						
<i>ayacahuite</i>	0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 3 1 2 1 2 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 1 2 1 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 ? ? 0 0 1 0 0 0 0 1 2 2 1 1 1 0 1 0 0 3 2 0 0 0 1 2 0 0						
<i>strobis</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 3 1 2 1 2 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 ? 0 0 3 ? ? 0 0 1 0 0 0 0 1 2 1 0 1 1 0 1 0 0 3 0 0 0 0 1 2 ? 0						
<i>albicaulis</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 3 1 3 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 ? 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 ? 0 1 ? ? 0 0 0 1 0 2 1 1 2 1 0 1 1 0 1 0 0 0 2 0 0 0 1 2 ? 0						
<i>parviflora</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 3 1 2 1 2 1 0 1 0 0 0 0 0 0 1 2 0 ? 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 ? 0 2 ? ? 1 0 0 0 0 0 1 1 1 2 1 2 0 1 1 0 ? 0 0 3 2 0 0 0 1 0 0 0						
<i>kwangtungensis</i>	0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 3 1 2 1 2 1 1 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 ? 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 ? 0 2 ? ? 1 0 1 0 0 0 0 1 ? 1 ? 0 1 0 ? ? 1 3 2 ? 0 0 0 2 ? ?						
<i>pumila</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 3 1 2 1 2 1 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 ? 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 ? 0 0 1 ? ? 0 0 0 1 0 2 ? 1 ? ? ? 0 ? ? ? ? ? 0 2 ? 0 0 1 ? ? 1						
<i>cebra</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 3 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 ? 0 0 1 ? ? 1 0 0 1 0 2 1 1 1 1 0 0 1 0 1 0 0 3 2 0 0 0 1 0 0 0						
<i>chiapensis</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 3 1 2 1 2 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 ? 0 ? ? ? 0 0 1 0 0 0 0 1 ? 1 ? 1 1 0 ? 0 0 3 1 ? 0 0 1 0 0 ?						
<i>peuce</i>	0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 3 1 2 1 2 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 ? 0 3 ? ? 1 0 0 0 0 0 0 1 2 0 1 1 1 0 0 0 0 0 2 2 0 0 0 0 0 0						
<i>lambertiana</i>	0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 3 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0 0 ? 0 1 2 ? ? 1 0 1 0 0 0 0 1 2 1 2 ? 1 1 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0						
<i>wallichiana</i>	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 3 1 ? 1 2 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 ? 0 3 ? ? 1 0 1 0 0 0 0 1 2 0 0 1 1 0 0 0 0 0 2 0 0 0 1 0 ? 0						
<i>bungeana</i>	0 1 0 0 0 2 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 2 0 1 ? 0 1 1 0 0 1 0 1 1 0 1 2 1 2 1 3 1 0 2 0 0 2 0 0 0 0 0 0 0						
<i>gerardiana</i>	0 2 0 0 0 2 1 0 1 0 1 0 1 ? 1 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 2 0 1 ? 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 2 1 1 1 1 0 2 0 0 2 0 0 0 0 0 ? 0						
<i>maximartinezii</i>	0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 3 1 2 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0 ? 0 1 0 2 0 1 1 1 1 1 0 0 1 ? 0 0 0 0 1 0 0 2 1 0 ? 1 ? 1 0 0 2 0 0 1 2 ? ? 0 1 ? 1 ?						
<i>culminicola</i>	0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 3 1 2 0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 2 0 ? 0 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 0 2 ? 2 2 0 0 0 1 1 2 1 0 ? ? ? ? ? ? ? ? ? 1 0 ? 0 0 1 0 1 ?						
<i>rzebowskii</i>	0 2 0 1 0 1 1 0 0 0 3 1 2 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ? 0 1 0 1 2 1 0 1 0 0 1 0 1 ? 0 2 0 0 1 0 0 1 0 0 ? ? ? 0 ? ? ? ? ? 1 1 ? ? 0 1 1 1 ?						
<i>centroides</i>	0 1 0 1 0 1 1 0 1 1 3 1 2 0 1 0 1 1 2 0 1 0 0 0 0 2 0 ? 0 1 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 2 ? 2 2 0 0 0 1 1 2 1 0 2 1 1 1 1 0 0 1 1 0 0 1 1 1 0 0 1 2 1 0						
<i>pinceana</i>	0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 3 1 2 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 2 0 ? 0 1 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 2 ? ? 2 0 0 1 0 0 2 1 0 ? ? ? 0 1 0 ? ? ? 1 2 ? 0 0 1 2 1 ?						
<i>johannis</i>	0 1 0 1 0 2 1 0 0 0 3 1 2 0 1 0 1 1 2 0 1 0 0 0 0 2 0 ? 0 1 0 1 2 0 1 1 1 1 1 0 2 ? ? ? 0 0 0 1 1 2 1 0 ? ? ? 1 ? 0 ? 0 1 1 0 ? ? 0 1 2 1 ?						
<i>aristata</i>	0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 2 3 1 3 ? 1 0 1 1 1 ? 0 0 0 0 0 1 2 0 ? 0 1 0 1 2 1 1 1 1 0 1 0 1 ? 1 2 0 0 0 0 0 1 0 0 2 1 1 1 1 0 2 1 0 1 0 2 0 0 0 2 0 0						
<i>nelsonii</i>	0 1 0 2 0 1 1 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 0 0 0 0 0 2 0 ? 1 1 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1 ? 2 1 1 1 1 1 0 2 1 0 1 1 0 3 0 0 2 1 1 0 2 ? 0 0 0 1 1 ?						



MATRIZ DE CARACTERES MORFOLOGICOS (continuación)

	10	20	30	40	50	60	70
resinosa	1 2 0 2 1 3 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 2 1 0 0 0 0 2 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 1 0 ? 1 2 1 1 0 0 0 1 0 1 1 1 0 3 0 1 2 0 0 3 2 1 0 0 0 1 1 1						
sylvestris	1 1 0 2 1 3 0 0 1 1 1 0 0 1 0 1 0 2 0 1 0 0 1 2 1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 1 2 ? 2 2 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 3 4 0 1 2 1 1 3 2 1 0 0 0 2 0 1						
kesiyya	1 2 0 2 1 2 1 0 1 1 2 2 0 0 1 0 1 0 1 2 1 2 0 1 1 1 2 0 1 2 1 0 0 2 0 1 0 1 1 1 1 0 1 1 2 ? 2 ? 1 0 0 0 0 1 0 1 0 1 2 ? 3 0 1 2 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 1						
tropicalis	1 2 1 2 1 2 1 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 2 1 2 2 0 0 3 2 0 1 2 1 0 0 2 0 ? 1 1 1 1 1 0 0 ? 2 ? 2 2 0 0 0 0 0 1 0 1 0 2 ? 3 0 1 2 1 1 ? 1 ? 1 0 0 ? ? 1						
merkusii	1 2 1 2 0 2 1 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 2 0 2 0 0 2 2 0 2 1 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 2 ? 1 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 2 0 3 0 1 2 1 1 3 2 0 1 0 0 0 0 ?						
halepensis	1 2 1 2 0 3 0 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 2 1 2 0 1 0 0 2 0 1 2 1 1 0 2 0 2 3 0 1 1 1 1 0 0 1 2 ? 2 2 1 0 0 0 0 1 0 0 1 1 1 3 0 0 2 1 0 1 0 2 0 0 1 0 0 1 1						
hartwegii	1 2 0 2 1 1 1 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 0 2 1 1 1 2 0 2 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 ? 2 2 1 1 0 0 0 1 0 0 1 1 2 0 4 0 1 2 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0						
montezumae	1 2 0 2 0 1 1 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 2 1 1 1 1 2 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 ? 1 1 2 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 4 5 0 1 2 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0						
durangensis	1 2 0 2 1 1 1 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 1 2 2 1 1 1 1 2 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 2 0 1 ? 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 ? 1 ? 4 0 1 2 1 1 1 1 ? 0 0 0 0 0 0 0						
ponderosa	1 2 0 2 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 2 0 1 2 1 1 1 1 2 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 2 0 1 ? 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 1 1 0 4 5 0 1 2 1 1 1 1 0 0 0 0 2 0 0						
douglasiana	? 2 0 2 0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 2 2 1 1 1 0 1 1 2 1 0 0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 1 ? 1 1 1 0 0 0 0 1 0 ? ? 1 ? 3 0 1 2 1 1 1 1 ? 0 1 0 ? ? 0						
coulteri	1 2 0 2 1 2 0 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 0 2 1 1 2 1 1 2 1 1 0 1 1 2 1 1 1 1 1 0 2 0 1 ? 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 5 0 1 2 1 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0						
contorta	1 2 0 2 1 3 0 0 1 1 2 2 0 0 1 0 1 1 2 1 2 1 0 1 3 1 1 2 1 1 0 1 1 2 0 1 1 1 1 0 2 1 1 ? 2 1 1 0 0 0 0 1 0 0 1 2 1 0 5 0 1 2 1 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0						
virginiana	1 1 0 2 1 3 0 0 1 1 2 0 0 1 0 1 1 2 0 2 1 0 1 2 3 0 0 1 1 0 3 0 1 0 1 1 1 1 0 2 0 1 ? 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 5 0 1 2 1 1 1 1 1 0 1 0 0 ? 0						
echinata	1 2 0 2 0 3 1 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 2 0 1 2 1 0 2 1 2 1 0 1 0 0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 ? 2 2 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 1 2 0 5 0 1 2 1 1 1 2 1 0 1 0 0 1 0						
leiophylla	1 2 0 0 0 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 2 1 0 1 1 1 2 1 0 0 1 0 2 3 0 1 1 1 1 0 1 1 1 ? 2 2 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 4 0 0 1 2 1 1 1 ? 0 0 1 1 2 1 0						
teocote	1 2 0 2 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 2 1 1 1 1 2 1 1 1 2 1 1 0 1 1 1 1 ? 2 2 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 2 0 4 5 0 1 2 1 1 1 1 ? 0 0 0 1 0 0						
patula	1 2 0 2 1 1 1 0 1 2 2 0 0 1 0 1 0 1 0 2 0 0 2 1 2 1 0 1 1 0 1 1 3 0 1 1 1 1 0 1 0 1 ? 2 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 3 0 1 2 1 ? 1 1 1 0 1 0 1 2 0 0						
attenuata	1 2 0 2 1 1 1 0 1 2 0 0 0 1 0 1 0 1 0 2 1 0 1 1 2 0 0 1 1 0 3 1 3 0 1 1 1 1 2 0 1 ? 2 1 1 0 0 0 0 1 0 0 ? 2 0 5 0 1 2 1 1 1 2 1 0 1 0 0 0 0						
roxburghii	1 2 1 2 0 2 0 0 1 1 2 2 0 0 1 0 1 0 1 1 2 0 0 0 1 0 1 2 1 0 0 2 0 1 1 1 1 1 0 1 0 2 ? 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 2 ? 3 0 0 2 0 0 1 1 0 0 1 0 0 1 0						
canariensis	1 2 1 2 1 2 1 0 1 0 2 0 0 1 0 1 0 1 1 2 0 0 0 1 0 0 1 0 0 ? 0 1 1 1 1 1 1 1 0 2 ? 1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 3 0 0 2 0 0 1 1 0 0 1 0 1 1 1						
pinna	1 2 1 2 1 3 0 0 1 2 1 0 1 0 0 1 0 2 0 1 2 1 1 0 2 0 1 2 1 1 0 0 0 2 0 1 1 1 1 0 1 1 2 ? ? 2 1 0 0 1 0 1 1 0 0 1 1 2 3 0 0 2 1 0 1 1 0 0 1 0 1 1 0						
pinaster	1 2 1 2 1 3 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 2 1 2 1 1 1 2 0 1 2 1 1 0 1 0 2 3 0 1 1 1 1 0 1 0 2 ? 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 ? 2 0 3 0 1 2 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0						
thunbergii	1 2 0 2 1 3 0 0 1 1 2 2 0 0 1 0 1 0 1 2 1 2 0 1 1 2 0 1 2 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 1 2 ? 2 2 0 0 0 0 0 1 0 1 1 2 1 0 3 0 1 2 1 1 1 0 1 0 0 0 0 1						
lunholtzii	1 2 0 0 0 1 1 0 1 2 2 0 0 1 0 1 0 1 1 2 0 1 2 1 2 1 0 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 2 ? ? 2 0 0 0 0 0 1 0 0 1 2 2 0 5 1 1 2 1 ? 1 1 1 0 0 1 0 0 0						

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar primeramente mi más sincero agradecimiento a mi maestra y amiga Elena Álvarez-Buylla, directora de esta tesis, por haberme otorgado apoyo y estímulo incondicionales durante todo el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral. La confianza depositada en mi, así como la constante motivación y el ejemplo impecable de Elena, han sido críticos en mi formación profesional.

También agradezco al Dr. Daniel Piñero su apoyo durante toda mi estancia en el programa del Doctorado, así como su valiosa asesoría como miembro de mi comité tutorial. Al Dr. Francisco Espinosa, también miembro de mi comité tutorial, le agradezco su importante contribución en diversas fases del desarrollo de esta tesis.

A los doctores Aaron Liston y Jeffrey Stone, quienes además de hacer numerosas revisiones a los manuscritos contenidos en esta tesis, representaron una gran fuente de apoyo durante mi estancia en la Universidad Estatal de Oregon les estoy en eterna gratitud. A *Jefe* agradezco especialmente su tiempo, dedicación y pasión para iniciarme en el conocimiento de los hongos endófitos y por la presentación formal de *Lophodermium*. Además agradezco a ambos su participación como miembros de mi jurado calificador.

Los miembros del jurado calificador, además de los ya mencionados, Dr. Jerzy Rzedowski, Dr. Gerardo Pérez-Ponce de León y Dra. Virginia León Regagnon hicieron una revisión expedita y cuidadosa del manuscrito, y aportaron valiosas ideas y comentarios, por lo que les estoy muy agradecida.

A Volkhard Seitz por su amabilidad y hacer posible una colaboración muy agradable y fructífera. Al Dr. Aljos Farjon por compartir con nosotros datos morfológicos en prensa.

A Celestino Flores y Patricia Delgado por su amable introducción al fascinante mundo de los pinos y por su compañía en mi primera colecta en el campo. A Alejandra Vázquez Lobo y Rodolfo Salas por compartir los primeros meses de los muchos por venir de trabajo de laboratorio y colectas de campo.

A Miguel Angel Soto le agradezco su interés en mi trabajo, sus comentarios a algunos capítulos de esta tesis, así como la positiva retroalimentación en temas de sistemática, biogeografía y más.

El Dr. Ignacio Chapela hizo posible en parte mi estancia de investigación en el extranjero y además estimuló la difusión de mi trabajo. El también contribuyó a establecer la colaboración con el Dr. Peter Johnston a quién agradezco compartir cultivos de *Lophodermium* así como invaluables sugerencias y comentarios al Capítulo III de esta tesis.

A todos los miembros del laboratorio de Genética Molecular y Evolución: Angelitos Cortes, Rosalinda Tapia, Adrián Quijada, Francisco Vergara, León Patricio Martínez, Caroline Burgeff, Luis Mendoza, Alicia Gamboa, Francisca Acevedo, Arturo Pérez, Alvaro Chaos, Eduardo de la Torre, Ale, Rodo y Miguel Angel, quienes han hecho más grata mi estancia en el Instituto de Ecología y en varias ocasiones también afuera de este. Pilar Huante, Emmanuel Rincón, Tino

Macias y Raúl Cueva, siempre me han ayudado en una u otra necesidad académica.

A los miembros de los laboratorios de Aaron, Joe Spatafora y Everett Hansen les agradezco su amabilidad, asesorías y cortesía: David Gernandt, Barbra Wilson, Susan Maser, Jim Oliphant, John Weeler, Bill Robinson, Justen Whittall, Anky Camacho, Jamie Platt, Teresa Label, Lori Winton, Pablo Rosso, Myke McWilliams, Bryan Capitano, Brennan Ferguson, Kimberly Davis, Deborah Clark, Lisa Grubisha, Eric Peterson y Mala Ranghoo. Matt, Steve y Kelly mis compañeros de oficina contribuyeron a hacer mi estancia en tierras lejanas aún más placentera.

Al Dr. César Domínguez le agradezco su apoyo y motivación para mi ingreso en el programa del doctorado. A Carolina y Alicia, les agradezco todo el apoyo logístico y la paciencia durante incontables encuentros en sus respectivas oficinas y su atenta respuestas a numerosas llamadas telefónicas. Al Dr. Luis Felipe Jiménez le agradezco por entrenarme en microscopía electrónica lo mismo que a Al Soeldner por entrenarme en microscopía electrónica de barrido. A Barbara Gardner por instruirme en el estudio de anatomía de maderas.

A mis compañeros de generación, especialmente Claudia Berea y Néstor Mariano, les agradezco momentos muy agradables y enriquecedores sobretodo durante el curso de campo. Además a Reyna Castillo, Ana Mendoza, Arturo Flores y Germán Avila les agradezco sus muestras de amistad y afecto.

Este trabajo recibió el apoyo económico de varias fuentes a las que debo todo mi reconocimiento: al CONACyT por las becas durante mis estudios en el programa del Instituto. A PADEP por apoyo a mi proyecto de tesis, a la DGIA por la beca para la estancia de investigación y al Instituto de Ecología por la beca de prórroga. También quiero agradecer a la Mycological Society of America por el Travel Award que me otorgó y así como por el apoyo económico para asistir al XVI International Botanical Congress.

A Francis Méndez por mas de 20 años! de compartir una amistad espléndida y enriquecedora. A mis amigos: Carlos Muñoz, Adriana Otero, Tere Valverde, Florecita Mendoza y Claudia Gallardo por su amistad, compromiso y ejemplo en muchos sentidos.

A mis hermanos: Salvador, Alejandro y Mario Antonio y a mi adorable cuñada Lourdes por ser y estar. A mi nueva familia: Benny, Matt, Adam, Colleen, Gary, Derek, Courtney, Vicki y Fred, les agradezco ser tan lindos conmigo.

A mi madre, ejemplo continuo de entereza, vigor y responsabilidad, le doy todo mi agradecimiento por todos los años de enseñanza, reflexión, amor y apoyo incondicionales.

A mi esposo David le agradezco su amor, sus asesorías académicas, los viajes de colecta y sobretodo su paciencia en esta última fase de la elaboración de la tesis.

A mi Solecito, mi razón de vida, le agradezco compartir su tiempo con mis interminables tesis así como por estar junto a mi.

Esta tesis la dedico con todo amor, admiración y respeto a la memoria de mi padre Salvador Ortiz-Pérez.