

Tesis Doctoral

Origen, divergencia y filogenia de endofitos *Neotyphodium* aislados de gramíneas nativas argentinas

Gentile, Agustina

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gentile, Agustina. (2004). Origen, divergencia y filogenia de endofitos *Neotyphodium* aislados de gramíneas nativas argentinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3729_Gentile

Cita tipo Chicago:

Gentile, Agustina. "Origen, divergencia y filogenia de endofitos *Neotyphodium* aislados de gramíneas nativas argentinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3729_Gentile

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGIA EXPERIMENTAL

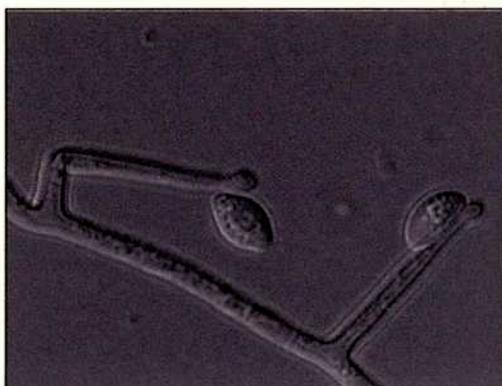
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA, BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR



WRHIDEB-CONICET

**ORIGEN, DIVERGENCIA Y FILOGENIA DE ENDOFITOS
Neotyphodium AISLADOS DE GRAMINEAS NATIVAS
ARGENTINAS**

Autora: Lic. AGUSTINA GENTILE



03729

TESIS PARA ASPIRAR AL TITULO DE DOCTOR

Directores:
Dra. M. Susana Rossi
Dr. Daniel Cabral

2004



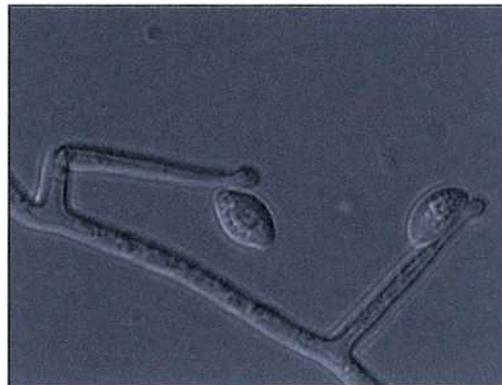
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA, BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR



VRHIDEB-CONICET

**ORIGIN, DIVERGENCE Y PHYLOGENY OF *Neotyphodium*
ENDOPHYTES FROM NATIVE ARGENTINE GRASSES**

Author: Lic. AGUSTINA GENTILE



DOCTORAL THESIS

Directors:
Dra. M. Susana Rossi
Dr. Daniel Cabral

2004

Palabras clave: endofitos, gramíneas, simbiosis, híbridos, *tub2*, *tef1*

Keywords: endophytes, grasses, symbiosis, hybrids, *tub2*, *tef1*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis, **Dr. Daniel Cabral** y **Dra. Susana Rossi**, por su apoyo constante, dedicación y por ayudarme a terminar esta tesis aún estando muy lejos. Gracias por todo lo que he aprendido de ustedes en estos años.

Gracias al **Dr. Christopher Schardl**, por brindarme la posibilidad de trabajar en su laboratorio y porque aprendí mucho de biología molecular a su lado. Fue la mejor experiencia que he tenido.

Gracias **Fer**, por ser mi compañero de viaje, por hacerme muy feliz, por todo lo que compartimos cada día y por ser el papá de Mateo, lo mejor que me pasó en la vida.

Gracias a toda mi familia, que siempre están ahí, apoyándome en todo lo que emprendo y preocupándose por todo lo que me pasa.

A Lily, Sole, Lau y Pau por muchos años de amistad.

A mis compañeros del laboratorio, Vicky, Belén y Leo, por todo lo que hicieron mientras no estaba, por su compañía y consejos y por las ayudas brindadas a larga distancia.

Gracias a todos mis amigos de la facu: Darío, Santi, Lau Asseo, Mariana, Marina, July, Pau, E, Matías, etc.

A la Universidad de Buenos Aires, por la beca otorgada para realizar esta tesis.

A la gente del laboratorio 5 y a todo el PRHIDEB, por su constante preocupación y ayuda.

A la ciudad de Vinhedo, en Brasil, un lugar maravilloso desde donde trabaje muy tranquila en la escritura de esta tesis.

A Fer y a Mateo

A toda mi familia

**“Se debe hacer todo tan sencillo como sea
posible, pero no más sencillo”**

EINSTEIN

CONTENIDO

1- Resumen	1
1.1 Abstract	2
2- Introducción	
2.1 Prólogo	3
2.2 Que es un endofito fúngico?	4
2.3 Híbridos fúngicos	6
2.4 Antagonistas o mutualistas?	7
2.5 Ciclo de vida. Tipos de reproducción	8
2.6 Clasificación y sistemática	12
2.7 Antecedentes en Argentina	13
2.8 Inferencia filogenética	16
2.8.1 Datos y filogenias moleculares	17
2.8.1.1 Datos moleculares	17
2.8.1.2 Filogenias moleculares	19
2.8.2 Teoría neutralista de la evolución molecular	20
2.8.3 Modelos de evolución molecular	22
2.8.4 Árboles de genes y árboles de especies	27
2.8.5 Los genes de β -tubulina (<i>tub2</i>) y el factor de elongación de la traducción 1- α (<i>tef1</i>)	29
2.8.6 Métodos de inferencia filogenética	29
2.8.6.1 Métodos de distancia: <i>Neighbour-joining</i> o método del vecino más próximo	33
2.8.6.2 Máxima parsimonia	34
2.8.6.3 Máxima verosimilitud	36
2.8.7 Métodos de búsquedas de árboles	37
2.8.8 Congruencia y calidad de datos. <i>Bootstrap</i> .	37
2.9 Coevolución Hospedante-hospedador	39
3- Hipótesis	42
4- Objetivos	43
5- Materiales y Métodos	
5.1 Cepas utilizadas en el estudio	44
5.2 Relevamiento y colección de las gramíneas	47
5.3 Aislamiento del endofito	47
5.4 Caracterización morfológica de la colonia y el cultivo	48
5.5 Extracción del ADN genómico	49
5.6 Cuantificación del ADN genómico	49
5.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	49
5.8 Secuenciación de ADN	53
5.8.1 Preparación y cuantificación de los templados	53
5.8.2 Reacción de secuenciación	53
5.8.3 Híbridos y generación de cebadores selectivos	53
5.9 Análisis de secuencias y filogenéticos	53

6- Resultados

6.1 Detección de endofitos en el material vegetal	55
6.2 Aislamiento e identificación de los endofitos	55
6.3 Caracterización de los cultivos aislados	55
6.4 Amplificación y secuenciación de los genes <i>tub2</i> y <i>tef1</i>	66
6.4.1 Identificación de los organismos híbridos	66
6.5 Filogenia molecular	68
6.5.1 Variabilidad a nivel nucleotídico de ambos genes	68
6.6 Análisis filogenéticos	69
6.6.1 Análisis de Máxima verosimilitud (MV)	71
6.6.2 Método de distancia: <i>Neighbour-joining</i> (NJ)	75
6.6.3 Método de Máxima Parsimonia (MP)	79

7- Discusión

7.1 Árboles filogenéticos: Origen y divergencia de los híbridos de <i>Neotyphodium</i>	82
7.2 Caracterización morfológica e identificación de los endofitos <i>Neotyphodium</i>	84

8- Conclusiones	90
------------------------	----

9- Bibliografía	92
------------------------	----

RESUMEN

1. RESUMEN

Los endofitos fúngicos proveen a muchas especies de gramíneas de una protección biológica frente a factores bióticos y abióticos, que incrementa su productividad.

Los endofitos del tipo *Neotyphodium* son asexuales, sistémicos y no patogénicos, mientras que sus parientes más cercanos son especies sexuales del género *Epichloë* (Familia Clavicipitaceae, Orden Hypocreales) que causan una enfermedad conocida como "Choke". Se cree que los endofitos asexuales han evolucionado directamente a partir de especies sexuales de *Epichloë* o por medio de hibridaciones inter-específicas entre distintas especies de *Epichloë* y/o *Epichloë* y *Neotyphodium*.

En el presente trabajo, reportamos el origen evolutivo de endofitos *Neotyphodium* aislados de diversas poblaciones de 10 pastos nativos de Argentina, y los comparamos con especies tanto sexuales como algunas asexuales de hospedantes nativos de otros continentes.

Las relaciones entre los endofitos aislados de gramíneas nativas y también con especies de *Epichloë* fue estimada por análisis filogenéticos basados en secuencias de la porción variable (principalmente intrones) de los genes de β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*). Fueron analizados los caracteres morfológicos de los endofitos que mostraron afinidad filogenética.

Los análisis filogenéticos revelaron que la mayoría de los endofitos son híbridos inter-específicos para ambos genes, derivados de dos especies de *Epichloë*: *E. festucae* y *E. typhina*. Varios aislamientos de distintos hospedantes resultaron cercanamente relacionados con *Neotyphodium tembladerae*, previamente analizado filogenéticamente a partir de una gramínea nativa, *Poa huecu*.

Es interesante destacar que un endofito de *Phleum commutatum* fue aparentemente derivado a partir de un evento de doble hibridación que involucra al menos tres genotipos distintos (*E. baconii*, *E. amarillans* y *E. typhina*). Este endofito particular podría ser considerado una nueva entidad taxonómica.

Además de los organismos híbridos, se encontraron endofitos en algunas plantas de *Bromus setifolius* que resultaron ser, aparentemente, no híbridos; es decir, contaron solamente con una copia de cada gen.

Nuestros resultados indican que la hibridación inter-específica podría ser un mecanismo importante y común en la generación de variabilidad genética en endofitos *Neotyphodium* de Argentina.

1.1 ABSTRACT

Seed-borne fungal symbionts (endophytes) provide many cool-season grass species with biological protection from biotic and abiotic stresses together with an increase in productivity. *Neotyphodium* endophytes are asexual, systemic and nonpathogenic, whereas closely related sexual species of genus *Epichloë* (family Clavicipitaceae, order Hypocreales) cause grass choke disease. It seems that asexual endophytes have evolved directly from sexual *Epichloë* species or by inter-specific hybridization between different species of *Epichloë* and/or *Epichloë* and *Neotyphodium*.

In the present work, we report on the evolutionary origins of *Neotyphodium* endophytes from several populations of 10 different native hosts in Argentina, and compare them with the sexual and some asexual species from hosts native to other continents.

Relationships among these fungi and with *Epichloë* species were estimated by phylogenetic analysis based on sequences from variable portions (mainly introns) of genes for β -tubulin (*tub2*) and translation elongation factor 1- α (*tef1*). Some morphological characters of the endophytes that showed phylogenetic affinities were analyzed.

Phylogenetic analysis revealed that most of the endophytes were inter-specific hybrids from two different species of *Epichloë*: *E. festucae* and *E. typhina*. Several isolates from different hosts were closely related to *Neotyphodium tembladerae*, previously described from the Argentinian grass, *Poa huecu*. It worth noting that an endophyte of *Phleum commutatum* was apparently derived from two hybridization events involving three different genotypes. This particular endophyte could be considered a distinct taxonomic entity. In addition to the apparent hybrids, we found likely non-hybrid endophytes in some plants of the grass *Bromus setifolius*.

Our results indicate that inter-specific hybridization may be a common and important mechanism for genetic variation in *Neotyphodium* endophytes from Argentina.

Parte de los resultados que se presentan en esta tesis han dado origen a la siguiente publicación:

- **Origin, Divergence and Phylogeny of *Epichloë* Endophytes of Native Argentine Grasses.** Molecular Phylogenetics and Evolution. En prensa. Gentile, A., Rossi, M. S., Cabral, D., Craven, K. D. & Schardl, C. L.

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

2.1 Prólogo

Darwin fue el fundador de la teoría moderna de la evolución. Aunque no fue el primero en proponer que los organismos *evolucionan*, o cambian, a lo largo del tiempo, fue el primero en acumular evidencias que apoyaron esta idea y en proponer un posible mecanismo por el cual podían ocurrir la evolución.

Hoy en día los biólogos modernos están convencidos, por la vasta evidencia acumulada, que la Tierra tiene una larga historia y que todos los organismos vivos, incluyendo al hombre, surgieron en el curso de la historia de formas anteriores más primitivas. Esta evidencia acumulada está formada por una trama llena de datos del pasado y del presente, provenientes de estudios sistemáticos, anatómicos, fisiológicos, bioquímicos, patrones de desarrollo y de comportamiento. Más recientemente, se agregó la información que contienen las moléculas de ADN que constituyen los cromosomas.

En este trabajo de tesis se estudia la simbiosis que se establece entre hongos asexuales del género *Neotyphodium* y gramíneas nativas de Argentina. Una *simbiosis* es una asociación íntima, y a largo plazo, entre organismos de especies diferentes (Curtis y Barnes 1993). Los sistemas hongos-autótrofos, particularmente aquellos con características mutualistas como las micorrizas, endofitos y líquenes, han contribuido tanto a la teoría simbiótica de la evolución como a las hipótesis sobre el origen y evolución de las plantas terrestres (Margulis y Sagan 1995). Las relaciones simbióticas prolongadas pueden dar como resultado cambios evolutivos profundos en los organismos que intervienen.

Durante los últimos 20 años, se ha puesto en evidencia una interacción simbiótica ampliamente distribuida entre gramíneas y hongos, denominados endofitos fúngicos (Clay y Schardl, 2002). Estas interacciones exhiben varias características únicas no encontradas en otro tipo de simbiosis entre plantas y microorganismos. Varias gramíneas de importancia como pasturas y forrajes, son hospedantes corrientes de estos hongos. La colonización ha ocasionado consecuencias importantes para los herbívoros y para la biología de los pastos, originando intensas investigaciones en todo el mundo. Recientes avances en la sistemática, genética, química, ecología, evolución y biología molecular de estos endofitos ha permitido contar con una nueva perspectiva de esta interacción. Los estudios de la asociación entre endofitos y gramíneas ofrece un acercamiento a varios problemas generales en la evolución de la simbiosis y de las relaciones infecciosas.

2.2 ¿Qué es un endofito fúngico?

El término "endofito" es un término genérico, de ubicación espacial, que define a cualquier organismo que vive dentro de una planta, contrariamente a "epifito" que se refiere al que vive en la superficie de las mismas.

Los endofitos fúngicos son hongos sistémicos, asociados con los tejidos aéreos de las plantas. Se encuentran presentes en un amplio rango de hospedantes, como plantas superiores, algas y briofitas. Un grupo particular y de mucha importancia es el de los endofitos de gramíneas. En este caso crecen intercelularmente en el tejido vegetal, con sus hifas paralelas al eje longitudinal de la planta, convolutas o lineales, e invaden los óvulos y semillas durante la floración del hospedante. Se desarrollan en asociación con la capa de aleuronas, donde permanece latente hasta la germinación (Schardl y Phillips, 1997, Clay y Schardl, 2002). El crecimiento es usualmente lento y con abundante biomasa de micelio en relación al tejido del hospedante, si lo comparamos con el otro tipo de endofitos fúngicos que se conocen (Carroll 1988). Se transmiten verticalmente a la siguiente generación de hospedantes por medio de la semilla (White, 1987). La relación simbiótica entre ellos es conocida como mutualismo constitutivo, ya que el hongo provee a la planta de potentes toxinas antiherbívoro que beneficia al hospedante y además está siempre presente en las líneas reproductivas de los mismos (Carroll 1988).

Estos endofitos y sus plantas hospedantes comparten una relación mutualista donde el endofito se provee de nutrientes, particularmente carbohidratos, de un medio de propagación a través del hospedante y de un hábitat seguro que los protege de los predadores y de la competencia con otros microorganismos. Se ha determinado en numerosos ensayos de campo, vivero y laboratorio, que el hospedante se beneficia en esta interacción con la protección ante un número importante de factores estresantes, bióticos y abióticos, que incluyen efectos antiherbívoro, mamíferos e insectos (Bacon et al., 1977; Fletcher y Harvey, 1981), resistencia a enfermedades (Gwin y Gavin, 1992), y a condiciones de estrés hídrico (Arachevaleta et al., 1989). Estas asociaciones gramínea-endofito disminuyen la presión de pastoreo sobre las gramíneas por parte del ganado que los consume, ya que muchos pastos con endofitos son tóxicos (White 1987; White 1994). También se los ha podido relacionar con el incremento del tamaño de la planta, peso seco y fotosíntesis como así también con una mayor resistencia a nematodos (Clay, 1988; Cheplick y Clay, 1988).

Las plantas de *Festuca alta* (*Festuca arundinacea* Sreb.) infectadas con el hongo endofítico *Neotyphodium coenophialum* Glenn, Bacon et Hanlin (= *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones et Gams) son perjudiciales para mamíferos herbívoros que se alimentan de ellas (Schardl y Phillips, 1997). Algo similar ocurre con el rye-grass perenne (*Lolium perenne*

L.) infectado con *N. lolii* Latch, Christensen et Samuels (Schardl, 1996). En ambos sistemas los alcaloides producidos por los endofitos son los que causan, en el ganado que los consume, síntomas que van desde elevada temperatura, reducción de la alimentación y de fertilidad, necrosis, vasoconstricción, gangrena y, dependiendo del dosaje y las condiciones ambientales, hasta la muerte (Raisbeck et al., 1991).

Los pastos infectados contienen una variedad de alcaloides que no presentan aquellos no infectados, entre los que se encuentran los alcaloides del ergot, lolinas, lolitrems y peraminas (Clay y Schardl, 2002). La toxicidad de los alcaloides del ergot (ergotismo) es conocida desde mucho tiempo atrás, producidos por *Claviceps spp* (Groger 1972) y muchos de ellos tienen aplicaciones farmacéuticas.

El genotipo de la planta, el tipo de tejido, la estación de año, y otras condiciones ambientales abióticas pueden influir en la concentración de los alcaloides en la planta (Clay y Schardl, 2002). Belesky y colaboradores en 1988 encontraron que la concentración de alcaloides del ergot en el campo fue mayor en primavera y en otoño, mientras que existió un marcado descenso de su concentración a mediados del verano. También Lyons y col. (1986) comunicaron un aumento de la concentración de los alcaloides del ergot en plantas de festuca alta creciendo en vivero con suministro de fertilización nitrogenada. El nivel de fósforo disponible en el suelo también podría influir en la concentración de los alcaloides en el hospedante (Arachevaleta et al, 1992).

Siegel y col. (1990) encontraron que la peramina estaba presente en la mayoría de los endofitos que infectan pastos seguidos por los alcaloides del ergot (50%), lolinas (35%) y lolitrems (10%). Estos últimos son los responsables de los temblores experimentados por animales que pastorean *Lolium perenne* (Raisbeck et al., 1991). Los genes de los alcaloides en los endofitos fúngicos ya han sido identificados en algunas gramíneas infectadas domesticadas (Wilkinson et al., 2000; Faeth et al., 2002). Spiering y colaboradores (2002) informan el hallazgo de los genes asociados a la expresión de lolinas por el endofito *Neotyphodium uncinatum*.

Dentro de la familia Clavicipitaceae se diferencian 3 tribus: Clavicipiteae, Balansieae y Cordycipeae. Esta última incluye patógenos de insectos y de hongos, mientras que Clavicipiteae involucra solamente especies del género *Claviceps*, parásitos especializados de las flores del hospedante, donde los óvulos son reemplazados por esclerocios fúngicos (Schardl et al., 1991). Dentro de la tribu Balansieae se reconocen 2 grupos de endofitos en gramíneas, aquellos con ciclo de vida completo (sexual y asexual) y los del ciclo de vida incompleto (asexual) que se ubican dentro del género-forma *Neotyphodium* Glenn, Bacon et Hanlin de los Deuteromycetes. Las fases asexuales de los organismos con ciclo completo tienen características morfológicas que permiten ubicarlos también como pertenecientes al

género *Neotyphodium* (Tsai et al., 1994). El primer grupo forma un estroma que determina una infección patogénica conocida como "choke disease". En el segundo en cambio, la planta no presenta síntomas externos de infección durante su ciclo de vida, pero los cariopses y las plantas están infectados con micelio del hongo.

Se considera que los endofitos asexuales son estados anamórficos de la forma perfecta *Epichloë* que perdieron la capacidad de reproducirse sexualmente. Está firmemente documentado mediante análisis de datos principalmente de índole molecular, que los endofitos *Neotyphodium* han evolucionado a partir de especies de *Epichloë* (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994; Moon et al., 2000; Craven et al., 2001a; Moon et al., 2002).

2.3 Híbridos fúngicos

Actualmente se ha hipotetizado sobre la existencia de dos procesos evolutivos importantes que podrían haber sido los responsables de la formación de las especies de *Neotyphodium*. El primero es la evolución a partir de una sola especie de *Epichloë*, hacia la pérdida de la reproducción sexual (Schardl et al., 1997; Moon et al., 2002). *N. lolii* y *N. typhinun* var *canariense* Moon et al., parecen haber evolucionado de esta manera a partir de *E. festucae* Leuchtman et al (Schardl et al., 1991; Leuchtman et al., 1994) y de *E. typhina* (Pers.:Fr.) Tul (Moon et al., 2000) respectivamente.

El segundo patrón de evolución de los endofitos *Neotyphodium* implicaría la hibridación inter-específica de distintos linajes de *Epichloë* y/o de *Epichloë* y *Neotyphodium* (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994; Moon et al., 2000; Craven et al., 2001a; Moon et al., 2002). Las evidencias suministradas por los datos moleculares, sugieren que la mayoría de los hospedantes son infectados solamente por endofitos de un único genotipo (Kover et al., 1997; Meijer y Leuchtman, 1999). Sin embargo pueden ocurrir múltiples infecciones y esto podría posibilitar una hibridación fúngica (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994).

Los distintos linajes híbridos en un mismo hospedante son fácilmente reconocidos por la presencia de múltiples copias génicas usando técnicas como las de isoenzimas, análisis de microsatélites y Southern blot (Leuchtman y Clay 1990; Schardl et al., 1994; Moon et al., 1999). También es posible reconocerlos mediante análisis filogenéticos en base a la secuencia de genes ortólogos. El origen de varios endofitos híbridos ha sido dilucidado mediante la utilización de este tipo de análisis (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994; Moon et al., 2000; Craven et al., 2001a, Moon et al., 2002), por ejemplo el origen de *N. coenophialum* infectando *F. arundinacea* (Tsai et al., 1994) y el de *N. uncinatum* Gams et al asociado con *Lolium pratense* (Craven et al., 2001a).

2.4 ¿Antagonistas o mutualistas?

Los primeros trabajos sobre la biología de estos hongos datan de la década del '30 y '40 aunque a principios del siglo pasado Freeman comunica la presencia de un hongo en el cariopse de *Lolium temulentum* (Freeman 1904, Sampson 1933; Neill 1940; 1941). Hacia finales de los años '70 vuelven a recibir atención cuando son relacionados con enfermedades del ganado de gran importancia económica.

Bacon y colaboradores (1977), estudiaron plantas de *Festuca arundinacea* (*Festuca alta*) que se presumía eran la causa de la enfermedad conocida como festucosis, estableciendo, por primera vez la correlación entre el endofito y la toxicidad del pasto (Bacon et al., 1977; Fletcher y Harvey, 1981).

Las asociaciones *Festuca arundinacea* - endofito y *Lolium perenne* - endofito han sido las más estudiadas y se las ha considerado modelos de simbiosis mutualista. Una vez que la simbiosis se ha establecido, el hongo y el pasto no se vuelven a separar y por eso, también se los ha descrito como **mutualistas obligados** (Bacon y Hill, 1996).

Las plantas hospedantes infectadas con endofitos no parecen exhibir ningún tipo de respuesta defensiva a pesar de la extensa ramificación de las hifas creciendo a través de los tejidos de la planta. Los endofitos no producen haustorios y no causan daño a las células vegetales, y sólo penetran el apoplasto. Sin embargo, inoculaciones cruzadas de plántulas con endofitos aislados de distintas especies de hospedantes, pueden inducir una muerte celular localizada, típica reacción a organismos patogénicos (Koga et al., 1993). Se asume que el hongo se nutre de macro y micromoléculas que circulan en la matriz intercelular, aunque podría haber mecanismos desconocidos que aporten nutrientes al apoplasto de manera más activa (Lindstrom y Belanger, 1994).

Como podemos observar, los endofitos fúngicos en gramíneas mantienen diferentes grados de interacción con sus hospedantes, desde el antagonismo al mutualismo. El efecto mutualista o antagonista está directamente relacionado con el ciclo sexual. El grado al cual se expresa el ciclo sexual varía desde 100% de esterilización del hospedante hasta el 100% de transmisión por medio de la semilla, donde el hospedante no pone en riesgo su transferencia a la próxima generación (Moon et al., 2002). Las asociaciones endofito-hospedante han sido clasificadas en 3 tipos, basándose en el nivel de expresión del estroma (White 1988). Las especies antagonistas extremas son aquellas que no permiten la producción de semillas por parte del hospedante y además son transmitidas de manera horizontal (**tipo I** White 1988). Los endofitos mutualistas son aquellos hongos asexuales de transmisión solamente vertical que no afectan la producción de semillas del hospedante (**tipo III** White 1988). Otras especies de *Epichloë* son llamadas simbiontes pleiotrópicas ya

que presentan ambos efectos, siendo transmitidos tanto vertical como horizontalmente (**Itipo II** White 1988) (Schardl et al., 1997).

Sin embargo, aún en antagonistas extremos, se ha podido comprobar una interacción mutualista. La pérdida de la reproducción sexual de la planta derivaría la energía hacia el aumento de crecimiento, el tamaño y la supervivencia de los hospedantes. De esta manera, siempre parece haber un componente altamente beneficioso para la planta que permite considerar a los endofitos mutualistas en sentido amplio (Clay 1990).

Schardl y colaboradores (1997) comunicaron que la mayoría de las especies simbiotes pleiotrópicas coevolucionan con sus hospedantes y que están adaptadas a ellos. Esta simbiosis ocasiona un menor costo al hospedante en relación a la fecundidad, y provee al simbiote de 2 alternativas de diseminación: una transmisión vertical altamente eficiente que asegura la diseminación (Siegel et al., 1984) mientras que la transmisión horizontal le permite al hongo explorar grupos de pastos de especies distintas (Schardl et al., 1997). A pesar de que la transmisión vertical podría por sí sola promover una coespeciación hospedante-endofito, las especies estrictamente asexuales no parecen haber coevolucionado con sus pastos hospedantes (Clay y Schardl, 2002). La razón es que la propagación clonal no es sustentable a largo plazo evolutivo a menos que la acumulación de mutaciones deletéreas (Muller's ratchet) (Muller 1964) que semejante proceso conlleva, sea contrarrestada por la parasexualidad mediante la hibridación inter-específica. Este último es un fenómeno corriente entre los endofitos asexuales (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994; Craven et al., 2001a; Moon et al., 2002).

2.5 Ciclo de vida. Tipos de reproducción

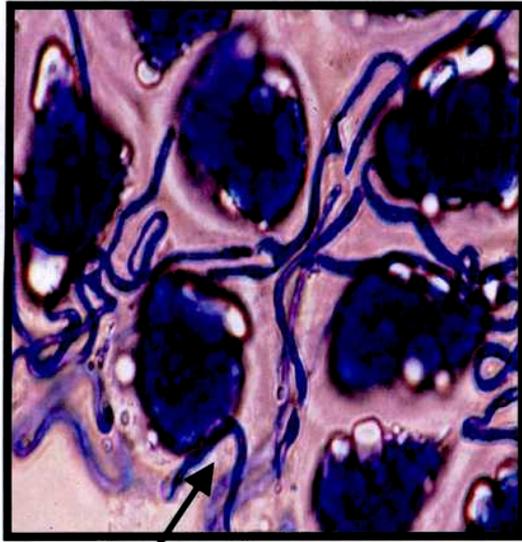
Las infecciones de los endofitos de ciclo completo como las del género *Epichloë* son de larga duración y sistémicas, persisten durante todo el ciclo de vida de la planta y presentan una fase sexual y otra asexual (Figura 1).

Durante el ciclo sexual, el hongo se desarrolla intercelularmente de manera asintomática y emerge en forma de estroma que rodea a las inflorescencias inmaduras, interrumpiendo la reproducción sexual de la planta. Este es el único signo macroscópico de la infección. Sobre el estroma se desarrollan espermacios y como son organismos haploides, heterotáticos bipolares, la fertilización se produce por la transferencia de estos sobre la cepa compatible. Esto se realiza por medio de moscas del género *Botanopila spp. (ex Phorbia)* (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1974; Bultman y White, 1988; Bultman et al., 1995), que se alimentan del estroma sobre los que depositan sus huevos, transfiriendo de este modo los espermacios. Se ha demostrado que estas moscas forman una asociación tan estrecha con el hongo, que son necesarias para la formación de sus estructuras de reproducción sexual.

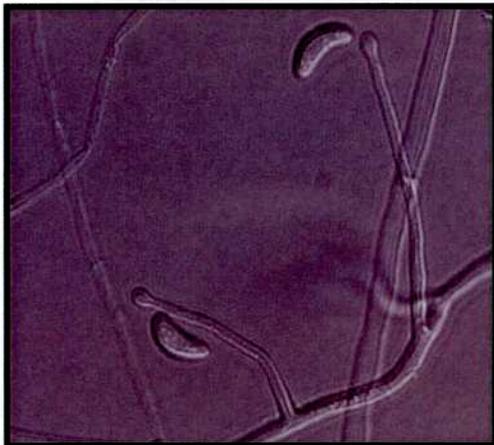
Parece que *Botanopila* es un vector primario de los espermacios de *Epichloë* y que el modo de transferencia sería a través del sistema digestivo de la misma (Bultman et al., 1995). Parece existir una relación entre la cantidad y frecuencia de peritecios y el depósito de huevos. En aquellos estromas donde fueron depositados huevos, se produjeron mayor cantidad de peritecios y más frecuentemente que en aquellos donde no se depositaron (Bultman et al., 1995).

El resultado final es la formación, en los peritecios, de ascosporas filiformes que son expulsadas, de manera activa al medio ambiente para infectar nuevas plantas. Se cree que germinan produciendo ciclos de conidiación y estos conidios infectarían las inflorescencias en desarrollo y posteriormente los cariopses (Tsai et al., 1994).

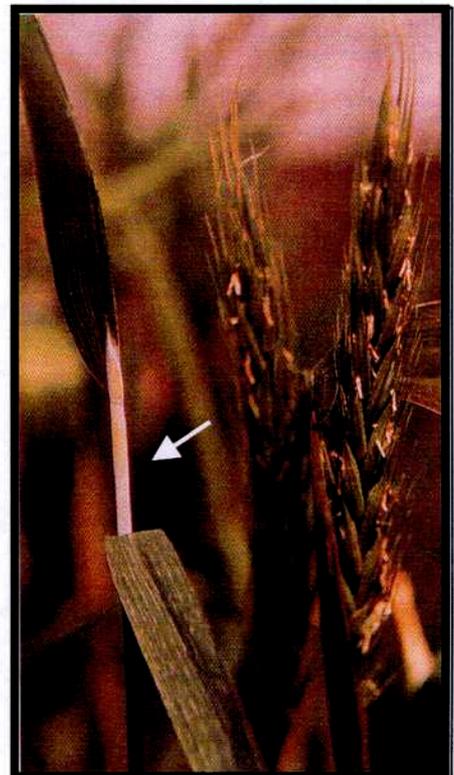
Durante el ciclo asexual las hifas también crecen intercelularmente en el parénquima del hospedante e invaden los meristemas florales para colonizar por último el cariopse. De esta manera el hongo tiene asegurada su transferencia a la siguiente generación. En este ciclo de vida reducido el hongo es estrictamente endofítico y su transmisión es vertical a través de su hospedante exclusivamente. Este sistema es muy eficiente, encontrándose hasta un 100% de semillas infectadas en las plantas hospedantes (Siegel et al., 1984).



Hifas del endofito creciendo intercelularmente



Fíalides y conidios de un endofito asexual



CHOKE DISEASE

Ciclo de vida de un endofito

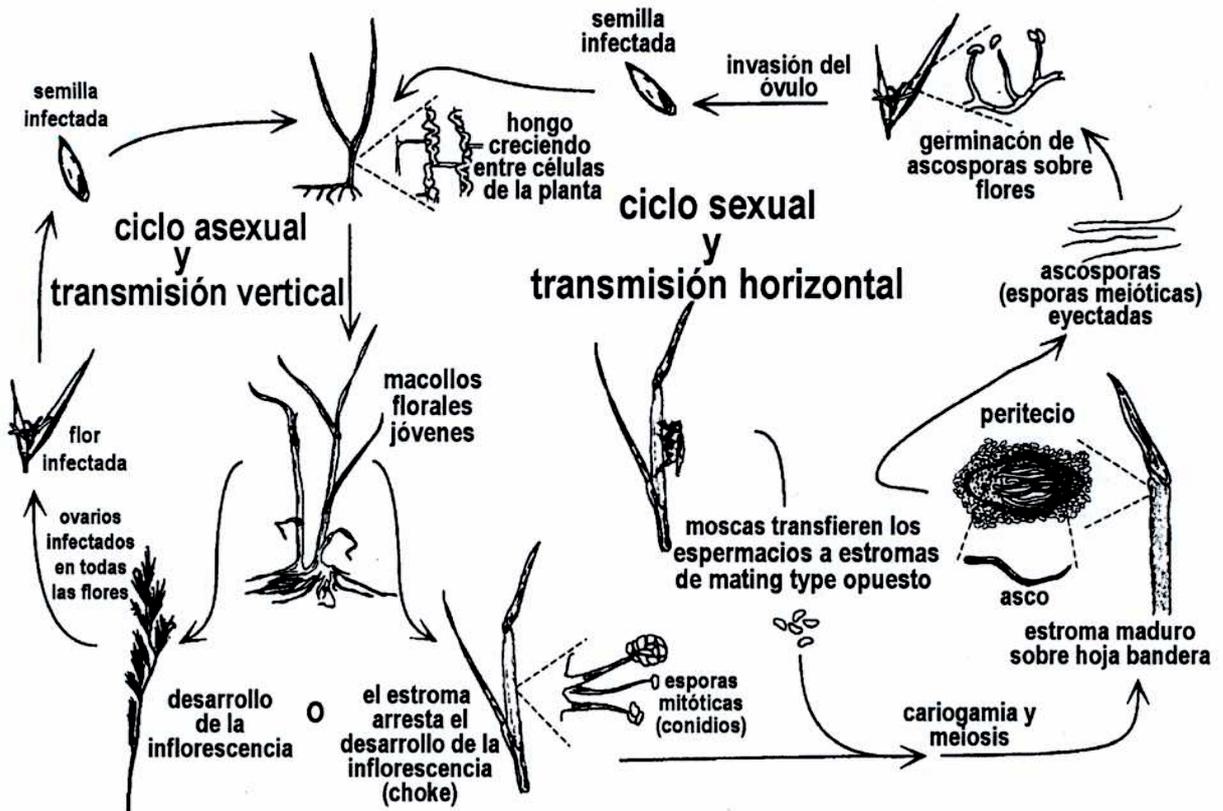


Figura 1. Esquema que muestra el ciclo de vida completo del endofito *Epichloë festucae* y su planta hospedante, *Festuca rubra*. Extraído de Schardl et al., 1997, con modificaciones. Gentileza de Iannone, 2003.

2.6 Clasificación y Sistemática

Basándose en similitudes de estudios in vitro, Morgan-Jones y Gams (1982) describen a las especies de endofitos anamórficos utilizando la morfología de las colonias, de los conidios y de las células conidiógenas. Ubicaron estos endofitos dentro del género *Acremonium* creando la sección *Albo-lanosa* para aquellos que presentaban crecimiento lento, con colonias blancas a amarillentas, filídes solitarias y delgadas en la base, conidios hialinos y con teleomorfos dentro de la familia Clavicipitaceae. Reconocieron 7 especies: *Acremonium chisosum* White et Morgan-Jones, *A. coenophialum* Morgan-Jones et Gams, *A. huerfanum* White, Cole et Morgan-Jones, *A. lolli* Latch, Christensen et Samuels, *A. starri* White et Morgan-Jones, *A. typhinum* White et Morgan-Jones y *A. uncinatum* Gams, Petrini et Smith.

Debido a la alta heterogeneidad del género y a que es morfológicamente muy cosmopolita (Glenn et al, 1996), esta clasificación basada exclusivamente en caracteres morfológicos provocó desacuerdos en la comunidad científica, aludiendo la falta de un criterio filogenético para su agrupamiento. Por esto, Glenn y col. en 1996 realizaron estudios de secuenciación del ADN ribosomal 18s y posteriores análisis filogenéticos. Esto dio como resultado la transferencia de estas especies anamórficas al nuevo género ***Neotyphodium*** Glenn, Bacon et Hanlin (del griego *neos* = nuevo + *Typhodium* = nombre del género original dado por Link en 1826). Ellos cambiaron el género de las 7 especies descritas por Morgan-Jones y Gams en 1982 y también el de *A. chilense* descrito por Morgan-Jones, White y Piontelli en 1990.

En los últimos años, los avances en las técnicas moleculares y bioquímicas han permitido estudios de carácter evolutivo y sistemático. La posibilidad de estudiar proteínas y el ADN aumenta la cantidad de caracteres a evaluar y permite realizar estudios poblacionales y establecer relaciones filogenéticas con mayor precisión.

Hasta el momento han sido descritas un total de 14 especies dentro del género *Neotyphodium*, 6 especies nuevas además de las descritas previamente por Glenn y col. (1996). La mayoría de estas nuevas especies fueron analizadas por medio de estudios morfológicos, isoenzimáticos y moleculares (Leuchtmann, 1994; Cabral et al., 1999; Schardl y Leuchtmann, 1999; Moon et al., 2000; Craven et al., 2001a; Moon et al., 2002). Se reconocieron:

N. australiense Moon et Schardl

N. aotearoae Monn, Miles et Schardl

N. melicicola Moon et Schardl

N. occultans Moon, Scott et Christensen

N. siegelli Craven, Leuchtmann et Schardl

N. tembladera Cabral et White

En un estudio realizado por Morgan-Jones y col. en 1990 reconocen que todas las especies de *Neotyphodium* descritas hasta el momento, excepto *N. uncinatum* y *N. siegelli*, presentan conidios pequeños, que van desde la forma elipsoide a alantoide y cuyos tamaños se superponen, demostrando que en algunos casos es imposible observar diferencias morfológicas. Estos autores sugieren que la macromorfología de la colonia es también un carácter inconsistente pues la apariencia y la tasa de crecimiento varían con las condiciones de cultivo. Igualmente es posible hacer comparaciones del crecimiento de las colonias manteniendo las condiciones ambientales y el medio de cultivo constantes, encontrando diferencias significativas entre las mismas (Moon et al., 2002).

2.7 Antecedentes en la Argentina

La existencia de gramíneas tóxicas para el ganado es conocida desde mucho tiempo atrás, pero la relación de la enfermedad con un hongo fue conocida recién a principios del siglo pasado. Se publicó en el Boletín de la Facultad de Agronomía de La Plata, un trabajo que enumeraba las posibles causas de una enfermedad del ganado, conocida como "tembladera". La misma era producida por la ingesta de una gramínea autóctona conocida como *Festuca hieronymi* Hackel (Rivas y Zanolli 1909).

La intoxicación del ganado producida por la alimentación con este pasto, es caracterizada por manifestaciones nerviosas particulares (temblores) durante los primeros estadios de la enfermedad. Estos temblores se van acentuando hasta que el animal está constantemente echado de cúbito dorsal, existen fuertes contracciones musculares cervicales seguidos de una rigidez en los miembros. Luego sobreviene una debilidad generalizada, la temperatura corporal disminuye y finalmente se produce la muerte. La especie atacadas son tanto ovinos, bovinos como caprinos (Rivas y Zanolli 1909).

Estos autores identificaron de manera equivocada al endofito presente en la planta y causante de la enfermedad, denominándolo *Endoconidium tembladera*. Sin embargo, fueron los primeros en relacionar este tipo de afecciones con un endofito fúngico. Este descubrimiento permaneció en la oscuridad hasta que Bacon y col. en 1977 concluyen lo mismo en relación a la festucosis producida por la ingesta de *Festuca arundinacea* por el ganado.

En los últimos 15 años se han estudiado en el laboratorio de Micología de la FCEyN (UBA), los endofitos de gramíneas nativas de Argentina. Se lleva a cabo el reconocimiento y la identificación de las asociaciones y de los organismos que las forman (Bertoni et al.,

1993). Se han reconocido hasta el presente 35 pastos autóctonos asociados a endofitos fúngicos (Lugo et al., 1998; Cabral et al., 1999).

Varias son las especies de pastos de la familia Poaceae registradas como tóxicas para el ganado (Parodi 1950), habiéndose detectado y aislado hasta el momento, endofitos fúngicos del vástago de *Festuca argentina* (Speg.) Parodi y *Poa huecu* Parodi, ambas presentes en los pastizales del sur del país (Bertoni et al., 1993; Cabral y Lugo 1993, 1994), y en *Festuca hieronymi* Hack., distribuida en San Luis y Tucumán (Bertoni et al., 1993, Cabral y Lugo, 1994). También se han aislado cepas de endofitos de diferentes gramíneas sin registro de toxicidad para el ganado como *Poa rigidifolia* Steud, *Festuca magellanica* Lam., *F. superba* (Turpe) Parodi, *Melica stuckertii* Hack., *Bromus setifolius* Presl., *B. auleticus* Trin. y *Phleum commutatum* Gaudin (Cabral y Lugo, 1994; White et al., 1996; White et al., 2001; Iannone 2003; Novas 2004). Todos los organismos aislados hasta el presente muestran los caracteres micromorfológicos y de cultivo que permiten incluirlos dentro del género *Neotyphodium*.

Como ocurre con los endofitos aislados de gramíneas del hemisferio norte, las características macro y micromorfológicas resultan escasas para determinar si se trata de especies ya descritas. Para ello, Cabral y col. en 1999, realizaron un estudio preliminar aplicando técnicas isoenzimáticas y moleculares a los endofitos de las tres gramíneas tóxicas y las compararon con aislamientos del hemisferio norte. Esto dio como resultado una nueva especie para los endofitos sudamericanos a la que denominaron *Neotyphodium tembladerae* Cabral et White. Estos endofitos formaron un clado único (clado tembladerae), separándose de aquellos del otro hemisferio.

Al mismo tiempo, se realizó un estudio químico del endofito de *Poa huecu*, donde se identificó al compuesto letal como de naturaleza glicopeptídica (Acher 1995). Esto coincidió con estudios previos hechos directamente sobre la planta (Pomilio et al., 1989).

Posteriormente se caracterizó morfológica e isoenzimáticamente los endofitos aislados a partir de diversas poblaciones de 5 hospedantes no tóxicos de Argentina, comparándolos con aquellos aislamientos de pastos del hemisferio norte y también con *N. tembladerae*, aislado de los pastos tóxicos (Gentile 1998). Los endofitos nativos estudiados conformaron un grupo con más del 67% de similitud, diferenciándose claramente de los del hemisferio norte. Los endofitos de distintos hospedantes resultaron muy similares entre sí, lo que presupone una colonización por una o pocas formas sexuales o asexuales provenientes del hemisferio norte (Gentile 1998).

A continuación, se estudió la distribución e incidencia del género *Neotyphodium* en poblaciones nativas de gramíneas de la Patagonia austral y su correlación con caracteres climáticos del lugar (Novas 2004). Se muestrearon poblaciones de *Bromus setifolius* de la

provincia de Santa Cruz y de *Phleum commutatum* y *Poa rigidifolia* de Tierra del Fuego. En el primer caso la incidencia se asoció positivamente con las precipitaciones, mientras que para *Phleum commutatum* se detectó lo contrario.

También se compararon parámetros de crecimiento en cariopses y plántulas entre poblaciones de *Bromus setifolius* que diferían en el estatus de infección endofítica, mostrando valores significativamente mayores en las plantas infectadas por endofitos (Novas et al., 2003). En ese mismo sistema se estudió la interacción de los endofitos y las micorrizas arbusculares. La respuesta del hospedante fue afectada por la presencia de endofitos y micorrizas con un efecto positivo de los endofitos sobre el desarrollo de *B. setifolius* y una interacción positiva con las micorrizas arbusculares (Novas 2004).

En paralelo, se estudiaron poblaciones naturales de *Bromus auleticus* Trin. de Argentina asociadas a endofitos fúngicos. Se analizaron las características poblacionales con distinto nivel de incidencia del simbionte fúngico y se estudió el peso de las semillas, emergencia y desarrollo de plántulas, crecimiento vegetativo y respuesta al estrés hídrico entre otros factores. Todos los resultados mostraron diferencias significativas entre las poblaciones con distinta incidencia del endofito presentando aquellas poblaciones con 100% de infección menor peso de semillas, menor tiempo de emergencia, mayor número de macollos y menor respuesta a la sequía entre otros factores. Esto parecería indicar que existe un mayor valor adaptativo en las plantas pertenecientes a poblaciones asociadas a endofitos fúngicos (Iannone 2003).

En el laboratorio de Micología contamos con una colección de más de 130 aislamientos de endofitos pertenecientes al género *Neotyphodium*, que en su mayoría fueron aislados de pastos no tóxicos para el ganado. La mayor parte de los endofitos *Neotyphodium* no forman estromas ni tampoco algún tipo de estructura de reproducción sexual en pastos. Por ello, se cree que la transmisión vertical es la única forma de diseminación de estos endofitos asexuales. Sin embargo, en un estudio realizado por White y col. en 1996, se informa la presencia de células conidiógenas y conidios en el filopiano de las hojas de dos especies de gramíneas, una del hemisferio norte *Agrostis hiemalis*, y otra sudamericana, *Poa rigidifolia*. Esta evidencia parece contradecir la creencia de una transferencia solamente vertical (a través de las semillas) y podría especularse con una transmisión de tipo horizontal. Igualmente son necesarias mas evidencias que apoyen este último tipo de transferencia en los endofitos asexuales de Argentina.

2.8 Inferencia filogenética

La antigua búsqueda de un sistema de clasificación de plantas y animales fue el origen de los trabajos del biólogo y naturalista sueco Carlos Linneo (1707-1778), quién en 1758 publicó lo que sería la piedra fundamental de la clasificación de los organismos. Sin embargo, este sistema jerárquico fue construido sin tener en cuenta consideraciones evolutivas. Es hasta el día de hoy que esta clasificación se sigue utilizando y es usada también por los biólogos evolutivos como referencia.

La comprensión de las relaciones evolutivas entre los individuos constituye uno de los puntos de partida para la sistemática y la taxonomía. Dichas relaciones son representadas como patrones de ramificación en los **árboles filogenéticos** (ver 2.8.6). Un árbol es un algoritmo matemático que se utiliza para modelar las relaciones evolutivas de un grupo de organismos, inferidas, en el caso de caracteres moleculares a partir de secuencias de ADN, ARN o proteínas de cada uno de ellos. La representación gráfica de un árbol consiste en nodos conectados por ramas. Los nodos son las unidades taxonómicas operacionales (**OTUs**, del inglés *operative taxonomic units*) y pueden ser tanto terminales como internos. Los nodos terminales del árbol representan las secuencias de los organismos de los que tenemos datos. Los nodos internos representan las secuencias de ancestros hipotéticos, de los que obviamente no se tienen datos. El ancestro hipotético de todas las **OTUs** constituye la raíz del árbol, aunque no siempre los datos disponibles permiten definirlo.

Hay dos grandes corrientes o escuelas conceptuales de la sistemática. Una de ellas, denominada escuela feneticista, construye los árboles con el mayor número de caracteres comparables posibles, estableciendo la afinidad de las **OTUs** según la similitud general que tengan. En esta metodología los agrupamientos reflejan el parecido global entre las **OTUs** aunque, dependiendo del tipo de caracteres y de su modo de evolución, los árboles que resultan no necesariamente representan las relaciones evolutivas. El método de distancia actualmente más usado es el de *Neighbour-joining* o método del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987) (ver 2.8.6.1).

La escuela cladista, se propone construir los árboles en base a las relaciones ancestro - descendiente entre los organismos. Cuando el mismo estado del carácter fue adquirido directamente del ancestro común se habla de **homología**. En cambio se denomina **homoplasia** cuando existe una coincidencia en el estado del carácter en dos o más taxones, no originado por herencia del ancestro común, sino por convergencia, paralelismo o reversión. Paralelismo es la evolución independiente del mismo carácter en dos taxa no relacionados filogenéticamente. La convergencia también se debe a la evolución independiente del mismo estado de carácter en taxa no relacionados filogenéticamente, pero

en este caso, a diferencia del paralelismo, el carácter es adaptativo. Finalmente, una reversión es el pasaje desde el estado derivado al estado ancestral.

El análisis cladista busca inferir la historia real a través de características particulares conocidas como rasgos derivados compartidos o **sinapomorfias**. Una sinapomorfía es un estado del carácter derivado compartido por dos o más *OTUs*, heredado del ancestro inmediato de un grupo de taxones. Si los rasgos estudiados en las *OTUs* ya se encuentran presentes en el ancestro no inmediato, sino en el común al grupo en estudio, estos rasgos no proporcionan información de las relaciones de parentesco y se denominan **plesiomorfias** o rasgos primitivos. Tampoco toma en cuenta las **autapomorfias**, que es un estado de carácter derivado presente exclusivamente en un único *OTU*. No tiene valor filogenético ya que no relaciona a este *OTU* con ningún otro.

Existió y aún existe hoy en día una fuerte discusión entre las corrientes feneticista y cladista, aunque en ciertos casos la escuela fenética es de mayor utilidad debido a la resolución que brinda y el número de árboles que se obtienen, el cladismo tiene bases lógicas y hasta filosóficas más sólidas.

En los comienzos, la sistemática moderna comparó solamente los caracteres morfológicos entre los individuos; los caracteres moleculares eran escasos o inexistentes. Similitudes y diferencias en el fenotipo de los organismos podían ser interpretados como un reflejo de los cambios genéticos de los mismos y así se podían establecer relaciones de parentesco.

Sin embargo, existen muchos grupos de organismos en los cuales las homologías son inestables y/o muy difíciles de establecer, donde las características morfológicas son insuficientes o inadecuadas. Este es un problema muy importante entre los endofitos fúngicos anamórficos, donde no existen una cantidad suficiente de caracteres morfológicos a ser evaluados y es preciso recurrir a estudios que utilizan caracteres moleculares (Glenn et al., 1996).

Cuando se quieren estudiar grupos de organismos muy relacionados entre sí, el primer problema que aparece es que las características morfológicas son poco variables, dificultando el análisis. Sin embargo, a diferencia de los caracteres moleculares, en los caracteres morfológicos la adquisición independientemente de un mismo carácter (**convergencia evolutiva**) es fácilmente reconocible.

2.8.1 Datos y filogenias moleculares

2.8.1.1 Datos moleculares

Como ya se mencionó anteriormente, muchos caracteres morfológicos son escasos, incompletos o pueden estar sujetos a la influencia del ambiente y por ello resultan no

informativos; por ejemplo, en determinaciones taxonómicas. Los datos moleculares han aportado información directamente desde el genotipo, y ello permite la caracterización de un organismo o grupos de organismos en estudio. Las técnicas moleculares son utilizadas en muchos campos de la biología, desde la taxonomía hasta la biodiversidad, pasando por la genética y la ecología.

Una ventaja de los caracteres moleculares, que utilizan secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos, es que pueden construir filogenias de organismos, independientemente de la morfología que presenten. Esto es de gran importancia en los endofitos fúngicos de gramíneas nativas que presentan muy baja diferenciación morfológica entre ellos y donde, es casi imposible establecer entidades taxonómicas (Cabral et al., 1999).

Las técnicas moleculares han sido utilizadas ampliamente desde la década del 70, pero en los endofitos recién se empezaron a utilizar de manera rutinaria hace 13 años atrás, cuando el gen *tub2* de *Epichloë typhina* fue secuenciado y se perfeccionaron las técnicas de extracción de ADN en hongos (Byrd et al., 1990).

Existen varios factores a tener en cuenta en el momento de elegir un marcador molecular y de considerar que región de la secuencia total es adecuada para el análisis (Irwin y Wilson, 1991). Estos factores incluyen:

- La región del marcador a ser comparada debe evolucionar a una tasa apropiada para los tiempos de divergencia de las *OTUs* de interés. Idealmente esto significa que debe proveer diferencias suficientes para diferenciar los taxones en grupos monofiléticos (grupo proveniente de un único ancestro común más su ancestro). Las regiones muy conservadas proveerán muy pocos cambios, mientras que las regiones muy variables contendrán demasiadas homoplasias debido a múltiples sustituciones en una misma posición nucleotídica y entonces el establecimiento de las homologías en el alineamiento será un problema adicional.
- El gen utilizado como marcador debe presentarse idealmente como una copia única o al menos debe evolucionar como copia única. En el caso de familias génicas, las copias parálogas (ver 2.8.4) deben haber divergido lo suficiente como para poder diferenciarlas por la secuencia de los cebadores y las condiciones en las que se realizan los experimentos de PCR.
- El gen debe tener la misma función en todos los taxones. La evolución de una nueva función cambia la presión selectiva y por consiguiente la tasa de sustitución nucleotídica.
- Debe ser considerado el efecto de la composición de bases (CG/AT) de las secuencias en estudio ya que sino se pueden distorsionar los estimadores de la divergencia (Bruns et al., 1991).

Los datos que se obtienen de la aplicación de técnicas moleculares son de dos grandes tipos: discretos y continuos o de distancia. Un carácter discreto nos proporciona información sobre una especie o secuencia individual. Las metodologías moleculares que nos proveen de este tipo de datos son la secuenciación de ADN y ARN, o de proteínas. En el caso del ADN existen cuatro posibles estados del carácter que cada sitio puede tener: A, G, T ó C. Los datos continuos o de distancia resultan de la comparación cuantitativa de las similitudes o diferencias entre pares de secuencias.

Es interesante destacar que los caracteres moleculares también pueden sufrir homoplasia y están sujetos a paralelismos. Un típico ejemplo de evolución paralela es el de las secuencias aminoacídicas en la lisozima de monos (que se alimentan de hojas) y de vacas (Stewart et al., 1987). Ambos animales han evolucionado independientemente hacia la fermentación utilizando una bacteria, y en ambos casos la lisozima endógena ha sido reclutada para degradar esta bacteria, de tal manera que ambas comparten ciertos reemplazos aminoacídicos (Li y Graur, 1991). La homología puede ser muy difícil de distinguir de la homoplasia, especialmente en el caso de caracteres moleculares. Un aminoácido o un nucleótido adquiridos por los genes en forma independiente son literalmente idénticos. Por ejemplo, las secuencias de las lisozimas de monos y vacas comparten exactamente el mismo aminoácido en la posición 14 de sus secuencias. Aunque es la misma entidad, no ha sido heredada del ancestro común; es decir, no tienen un origen común. Si el mismo aminoácido está codificado por distintos codones en los dos taxones, dada la condición degenerada del código genético, es una evidencia de que el aminoácido no es homólogo en los dos genes (Page y Holmes 1998).

2.8.1.2 Filogenias moleculares

Las filogenias construidas en base a datos moleculares utilizan la información de las secuencias genómicas. Los genomas de los organismos actuales son un documento invaluable de la historia de la vida en la Tierra, sobre todo considerando que sólo una pequeñísima proporción de las especies que poblaron la Tierra dejaron registro fósil.

El nacimiento de la evolución molecular data de la década del 50 del siglo pasado. Dos eventos fueron detonantes. El primero fue el descubrimiento, por Watson y Crick en 1953, de la doble hélice del ADN. En el nivel más fundamental, la evolución fue pensada como cambios en la estructura del ADN. El segundo evento tomó lugar cuando Sanger y colaboradores en 1955 (Sanger et al., 1955) publicaron la primera comparación de secuencias aminoacídicas de la proteína insulina de distintas especies.

Alrededor de los años 60 fue necesario construir modelos de evolución molecular, dado que las predicciones de la nueva síntesis sobre la cantidad y el tipo de cambios que ocurrían a nivel molecular no se ajustaban a los datos que el análisis de la variabilidad génica estaba mostrando. Analizar el número y el tipo de cambios en la secuencia de los genes acumulados a lo largo del tiempo y los patrones que siguen estos cambios es uno de los primeros objetivos de la evolución molecular.

La secuencias de ADN han ido reemplazando a las secuencias de proteínas como la fuente principal de información y esto se debe a la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR= *polimerase chain reaction*) a mediados de 1980 (Kocher y White 1989, Kwoc y Sninsky 1989, Von Breoldingen et al., 1989, White et al., 1989). Esto permitió amplificar segmentos de ADN muy rápidamente a partir de muy poco material original.

2.8.2 Teoría neutralista de la evolución molecular

A partir de los años 50 fue posible obtener las secuencias de aminoácidos que conforman las proteínas. Una de las proteínas más estudiadas fue la hemoglobina. En 1965, Zuckerkandl y Pauling (Zuckerkand y Pauling, 1965), compararon las secuencias aminoacídicas de esta proteína de distintos organismos, desde el hombre y el pollo, pasando por el caballo y la rana. Cuando compararon las especies que eran más distantes observaron un mayor número de cambios en los aminoácidos que cuando compararon especies más cercanas. Esto los indujo a proponer que los cambios de aminoácidos que ellos observaban eran el resultado de mutaciones en el ADN que estarían ocurriendo a intervalos de tiempo regulares, existiendo una proporcionalidad entre los cambios de aminoácidos y el tiempo transcurrido desde la divergencia de las especies. Este trabajo fue muy importante en la biología evolutiva ya que introdujo un nuevo concepto: el del **reloj molecular**.

Quizás una de las predicciones más sorprendentes, inesperadas y controvertidas en la evolución molecular, es que los genes evolucionan a una tasa constante, dando origen a este reloj molecular. Este concepto no significa que todos los genes de un organismo y sus proteínas evolucionen a la misma tasa. Secuencias de ADN pertenecientes a distintas regiones de un mismo genoma, con funciones y ambientes replicativos diferentes, muestran diferencias en las tasas y los patrones de sustitución. Cuando las secuencias estuvieron disponibles en un amplio rango de organismos, se observó que estas diferencias en general se mantienen aún en organismos no relacionados. Un ejemplo es la tasa de sustitución nucleotídica mitocondrial en mamíferos, que resulta ser unas 10 veces más alta que la tasa encontrada para los genes nucleares (Li 1997). La alta tasa de evolución encontrada en los genomas mitocondriales parece deberse a la alta tasa de mutación encontrada en los mismos (Martin 1995).

Desde 1960 se ha discutido cuál es la naturaleza de los procesos que operan a nivel molecular. De acuerdo al modelo neutralista de evolución de las secuencias de ADN, la deriva genética (DG) de las mutaciones neutras o casi neutras y la selección natural (SN) de las mutaciones ventajosas. Existe una manera de explicar los altos niveles de variación genética sin tomar en cuenta la SN; asumiendo, en cambio, que la mayoría de las mutaciones fijadas no tengan efecto en la adecuación darwiniana (*fitness*) (Kimura 1983). Estas mutaciones, que no están sujetas a SN, son llamadas mutaciones neutras o neutrales y se pierden (usualmente) o son fijadas (ocasionalmente) por el proceso de DG. Este análisis fue formulado como **teoría neutralista de la evolución molecular** y fue propuesta primeramente por Kimura (1968) y luego por King y Jukes (1969), y se ha convertido en una de las más importantes y controvertidas teorías de la evolución molecular.

Para los neutralistas, la mayoría de las mutaciones son deletéreas y removidas por SN; o bien neutrales. La SN es incorporada en esta teoría pero sólo como una fuerza purificadora, negativa, que remueve las mutaciones deletéreas del genoma y juega un rol menor en la fijación de los mutantes (Kimura 1983). Los neutralistas han tomado al reloj molecular como soporte de su teoría porque para ellos el reloj demuestra la constancia de la tasa de mutaciones neutras que es la que determina el ritmo de la evolución a nivel molecular. Al mismo tiempo puede demostrarse que la velocidad de fijación de las mutaciones en condiciones de neutralidad depende solamente de la tasa intrínseca de mutación (Li 1997). Por lo tanto, si esta teoría es correcta, las mutaciones mayoritarias en un gen serían neutrales y la tasa de evolución a nivel molecular debería ser constante.

La constancia del reloj molecular en los sitios sinónimos (donde no hay reemplazo de aminoácido) es determinado por la tasa de mutación neutral, pero también está afectada por el tiempo generacional, la tasa metabólica y la eficiencia de reparación del ADN, que es particular de cada organismo. Estos factores son conocidos colectivamente como efectos de linaje (Page y Holmes 1998). Los neutralistas argumentan que estos efectos pueden explicar toda las desviaciones de la universalidad de la constancia del reloj molecular de un gen, mientras que los seleccionistas dicen que aún si estas diferencias se tienen en cuenta, los genes aún muestran variación en la tasa de evolución debido a factores selectivos (Page y Holmes 1998).

La teoría neutralista de Kimura tiene en cuenta que en ciertas posiciones nucleotídicas donde una mutación modifica el aminoácido (sustituciones no sinónimas), existe una presión de selección en contra. La selección en contra en estos sitios varía según el grado de restricción funcional que presenta ese sitio. Sin embargo, no todas las sustituciones de reemplazo están sujetas a selección purificadora y entonces, el cambio de aminoácido es posible. Cuando las mutaciones no determinan un cambio de aminoácido, por

la naturaleza degenerada del código genético, dicha presión no existe y pueden evolucionar neutralmente (Kimura 1983).

Es interesante destacar que existen ciertas evidencias sobre desviaciones a las predicciones de la Teoría Neutralista, por razones diferentes a los efectos de linaje. Un ejemplo bien documentado en varios organismos, es el sesgo en el uso de codones sinónimos. El sesgo en el uso de codones sinónimos en algunos organismos como *Escherichia coli*, implica que una posición considerada neutra en extremo, como la tercera posición de un codón que puede tomar cualquiera de las 4 bases, esta sujeta a restricciones de índole funcional, por lo que su tasa de sustitución es menor que la esperada (Sharp y Li 1987). Es sabido que en *E. coli* y en levaduras, este sesgo es mas pronunciado en genes que se expresan a niveles altos, como las proteínas de membrana (Bulmer 1991).

Por esto último, Ohta incorporó estos hallazgos y críticas y elaboró una nueva versión de la teoría neutralista a la que denominó Teoría "Casi Neutralista", reconociendo que muchas sustituciones sinónimas no son absolutamente neutrales sino ligeramente deletéreas o casi neutrales (Ohta 1992; 1995).

A pesar de las críticas y cuestionamientos a las que esta teoría neutralista esta expuesta hasta nuestros días, la misma representa un aporte fundamental a la evolución molecular y la formalización matemática que ha desarrollado permite evaluar la naturaleza neutral o seleccionista de los procesos que median la evolución de secuencias en las poblaciones.

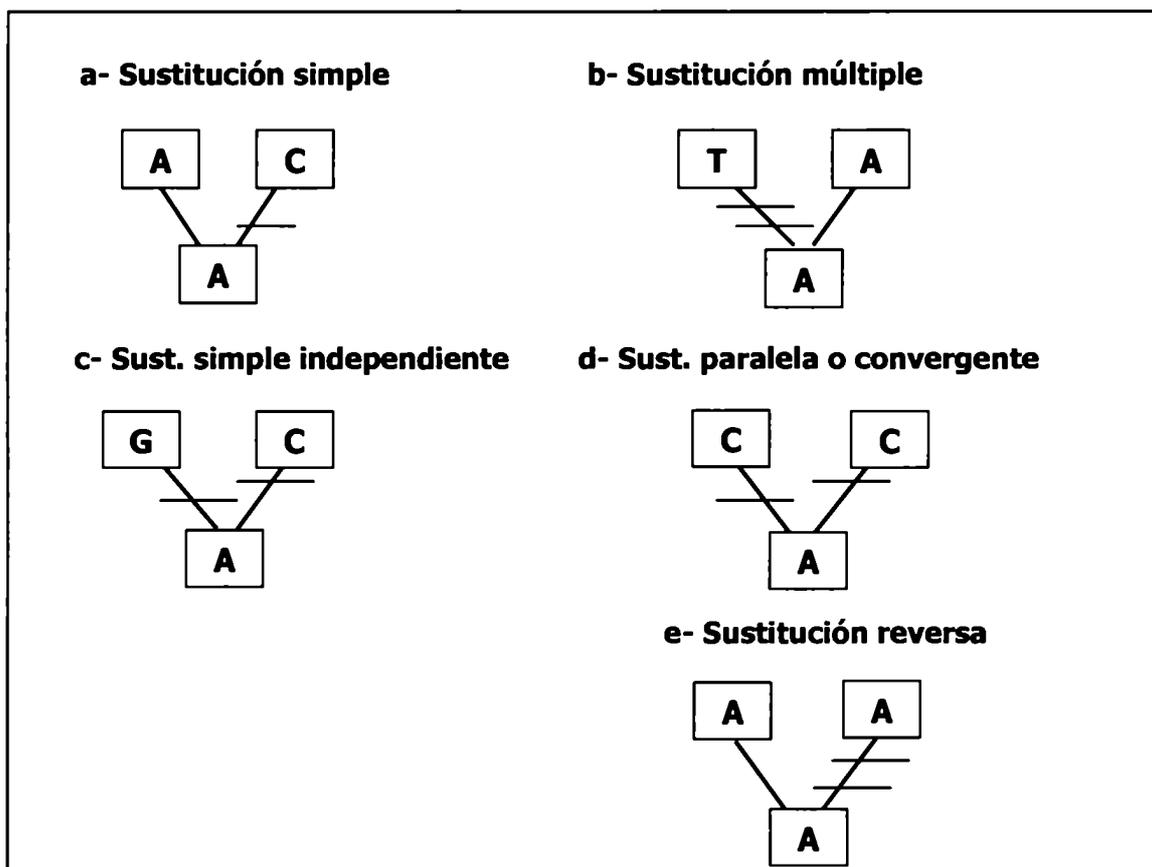
2.8.3 Modelos de evolución molecular

Cuando comparamos sitios homólogos en dos secuencias de ADN, simplemente observamos si el estado de carácter es igual o no. Existen cuatro posibles estados del carácter que cada sitio puede tener: A, G, T ó C. Si ocurrió más de una sustitución nucleotídica en un mismo sitio, el registro de la/s sustitución/es se ha perdido.

Si comparamos dos secuencias nucleotídicas, podemos preguntarnos cómo se produjeron sus similitudes y diferencias. Existen varios tipos de sustituciones (Figura 2). El primero es una **sustitución simple** (a) donde ocurre el reemplazo de un nucleótido por otro. También podría ocurrir una **sustitución múltiple** (b), donde se produce más de un reemplazo en el mismo sitio; es decir, para pasar de A a T se produjo A a C y luego de C a T. También podría suceder que para el mismo sitio, cada linaje tuviera una **sustitución simple independiente** (c), dando origen finalmente a distintos nucleótidos en cada uno. En estos dos últimos casos podemos observar que el número de diferencias observadas entre las dos secuencias está subestimado en relación a la cantidad real de cambio evolutivo.

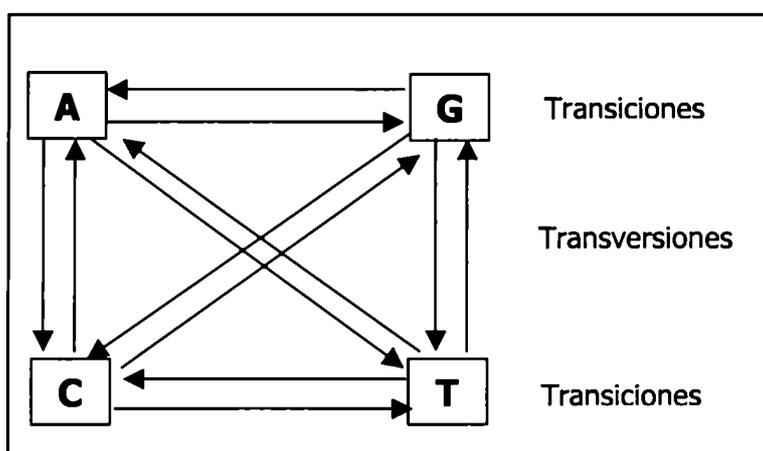
Los otros dos tipos de sustituciones múltiples tienen potencialmente consecuencias más severas. En todos los casos las dos secuencias son idénticas, aunque esta similitud en ningún caso es heredada del ancestro común. Cuando la similitud es heredada por el ancestro hablamos de homología mientras que, como ya hemos visto, la similitud adquirida independientemente es un caso de homoplasia. Los casos de homoplasia son básicamente dos: puede ocurrir la misma mutación simple en cada linaje (**sustitución paralela o sustitución convergente** (d)) o en un linaje no producirse cambios mientras que en el otro pueden suceder dos mutaciones revirtiendo al nucleótido original (**sustitución reversa** (e)).

Figura 2. Cinco posibles tipos de sustituciones nucleotídicas. En todos los casos el nucleótido ancestral es A. Las rayas transversales indican cambios en el sitio nucleotídico en cada linaje.



También podemos clasificar a las sustituciones de acuerdo a su naturaleza fisicoquímica. Los nucleótidos son purinas (A y G) o pirimidinas (C y T). Los reemplazos pueden cambiar una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina y son denominadas **transiciones**; o puede ocurrir que más comúnmente se produzcan sustituciones de purina por pirimidina o viceversa y se denominan **transversiones** (Figura 3).

Figura 3. Este esquema muestra las posibles sustituciones nucleotídicas entre los cuatro nucleótidos.



La manera más simple de medir la cantidad de cambio evolutivo que ha ocurrido entre estas secuencias es la distancia; es decir contar el número de sitios nucleotídicos donde las secuencias difieren. Sin embargo, para hacer una estimación más realista de los cambios evolutivos, es necesario introducir correcciones a las medidas de distancia. A medida que se acumulan sustituciones nucleotídicas a lo largo del tiempo desde la divergencia, ellas se **saturan**; es decir, la mayoría de los sitios que cambian ya han cambiado antes. Como resultado, las sustituciones más recientes tienen poco o ningún peso en el total de las diferencias observadas entre las secuencias (Page y Holmes 1998).

Dado que las distancias observadas pueden subestimar la cantidad real de cambio evolutivo, ha habido muchos estudios para desarrollar métodos que conviertan las distancias

observadas en medidas del cambio evolutivo real. La mayoría de los métodos que han sido propuestos tienen varios supuestos sobre la naturaleza de las sustituciones en el ADN.

El modelo de Jukes y Cantor (**JC**) (Jukes y Cantor 1969) fue el primer modelo propuesto y es el más sencillo (Figura 4). Asume que las cuatro bases tienen la misma frecuencia y que todas las sustituciones son igualmente probables. La distancia **d** corregida entre dos secuencias está dada por:

$$d = -3/4 \ln (1 - 3/4 p)$$

donde **p** es la proporción de nucleótidos que son diferentes entre las secuencias.

El modelo de Kimura 2 parámetros (**K2P**) (Kimura 1980) toma en cuenta que las transiciones suelen ser más frecuentes que las transversiones. Y esta diferencia de frecuencias se representa por:

$$d = 1/2 \ln \{1/(1-2p-q)\} + 1/4 \ln \{1/(1-2q)\}$$

donde **p** y **q** son las diferencias proporcionales entre las dos secuencias debidas a transiciones y transversiones respectivamente.

Si algunas bases son más comunes que otras, podría esperarse que algunas sustituciones sean más frecuentes que otras. El modelo propuesto por Felsenstein y colaboradores en 1981 (**F81**) toma en cuenta esta heterogeneidad en la composición de bases de la secuencia en estudio, permitiendo que las frecuencias de las bases sean diferentes.

El modelo **HKY85** (Hasegawa et al., 1985) es una combinación de los modelos F81 y K2P, ya que considera que la tasa de transiciones y transversiones sea diferente y que las frecuencias de las bases también varíen.

Por último, el modelo **GTR** (*general time reversible*) (Rodríguez et al., 1990 y Yang et al., 1995), es más general que todos los modelos anteriores y es el que abarca a los otros cuatro. Este permite especificar diferentes frecuencias de bases y una probabilidad de sustitución distinta para cada una de los seis tipos posibles. El esquema de la figura 4 muestra el resumen de todos los modelos descritos (Page y Holmes 1998).

Es necesario elegir el modelo más realista, que se ajuste mejor a nuestros datos, y a su vez el más sencillo. Es preferible usar el mínimo número de parámetros que permitan una estimación razonable. Una baja cantidad de parámetros pueden dar una estimación incorrecta, pero una alta cantidad puede disminuir la precisión de nuestra estimación (Hillis et al., 1996).

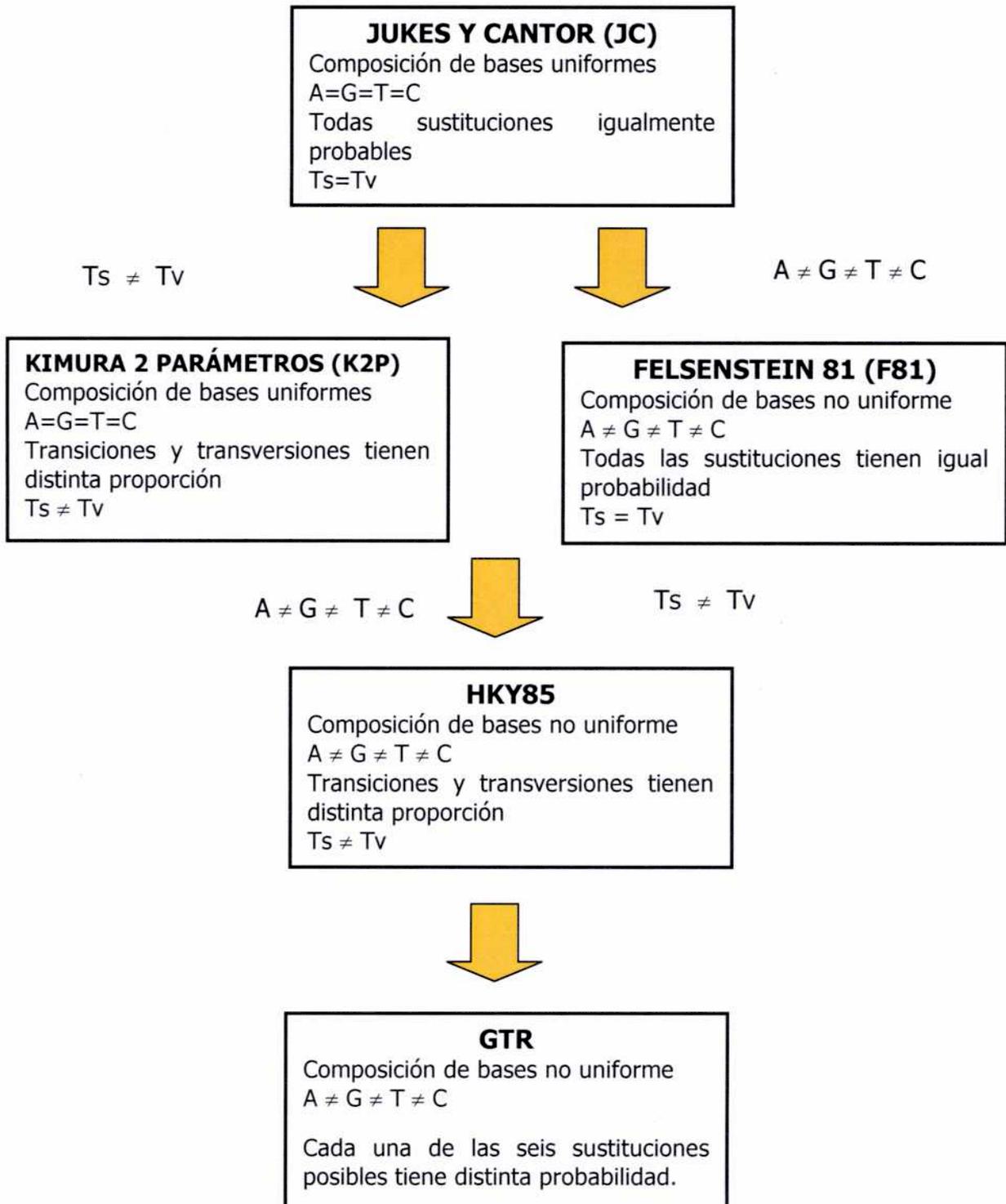


Figura 4. Esquema que resume los modelos de evolución molecular descriptos para estimar el número de sustituciones nucleotídicas entre secuencias de ADN. Esquema tomado de Page y Holmes 1998, con modificaciones.

2.8.4 Árboles de genes y árboles de especies

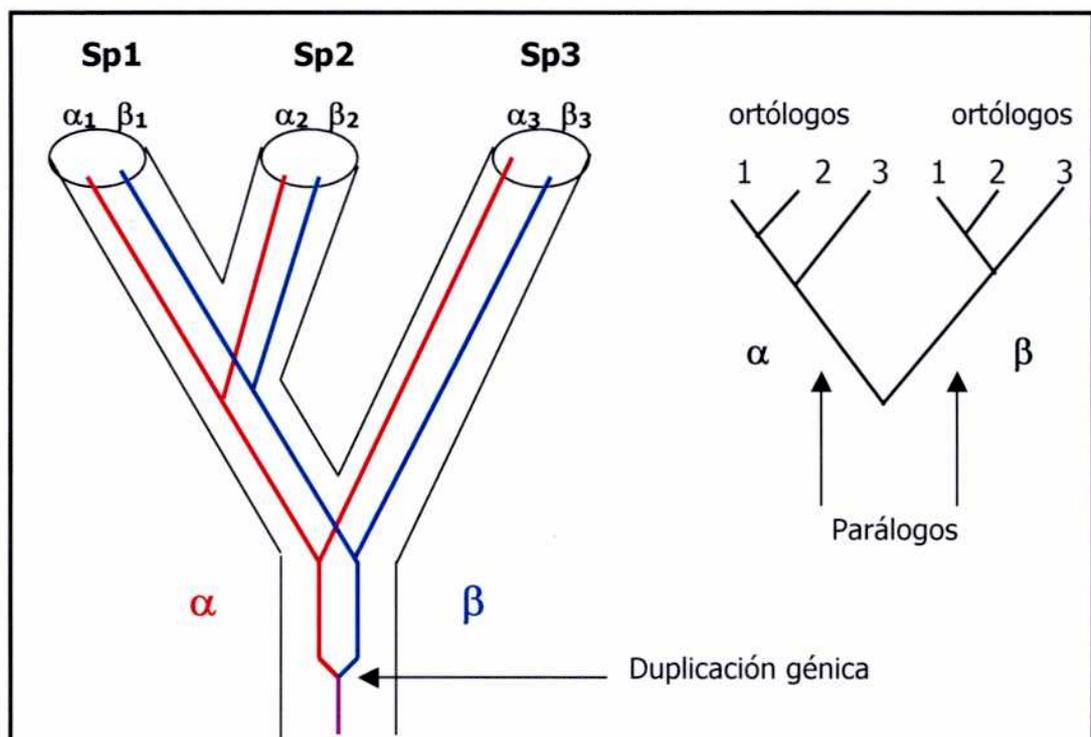
Cuando trabajamos con filogenias moleculares, nunca debemos olvidar el hecho de que cuando construimos filogenias con secuencias génicas, estrictamente estamos construyendo la filogenia del gen y no implica que estemos reconstruyendo necesariamente la filogenia de las especies que portan ese gen. Igualmente, la expectativa de la sistemática molecular es que la filogenia de los genes concuerde con la de los organismos. Sin embargo, hay numerosas razones por las cuales ambas filogenias pueden no concordar. Una de ellas se produce cuando en el linaje génico ocurre una duplicación, originando dos genes α y β por ejemplo, que evolucionan independientemente (Figura 5), dando origen a una familia génica. Cada gen acumula mutaciones independientemente, divergiendo de la otra. Cuando el linaje de los organismos experimenta un evento de especiación, las dos genes α y β codivergen quedando representados en ambas especies. Las copias que están en especies distintas y que eran "la misma copia" (por ejemplo α o β) en el ancestro se dicen que son **ortólogas**. Son ortólogas las copias α_1 , α_2 y α_3 y β_1 , β_2 y β_3 . Los genes que están en especies diferentes y derivan de copias distintas en el ancestro, se denominan genes **parálogos**. Son parálogos las copias α_1 , α_2 y α_3 con respecto a cualquiera de las copias β_1 , β_2 y β_3 . Si comparamos las secuencias nucleotídicas de genes ortólogos, el número de cambios ocurridos entre ellos nos dará información del tiempo transcurrido desde la especiación, mientras que si estimamos los cambios ocurridos en los genes parálogos esto nos dará la estimación del tiempo desde la duplicación génica (Page y Charleston 1998). Es importante que al momento de elegir un marcador para realizar análisis filogenéticos nos aseguremos de estar comparando genes ortólogos y no parálogos.

Otro motivo para la discrepancia entre el árbol del gen y el árbol de la especie es la ocurrencia de eventos de transferencia horizontal. Esto ocurre cuando un linaje adquiere material genético de otro y lo integra a su genoma, ya sea reemplazando la versión propia o en otro lugar. La transferencia horizontal de marcadores moleculares altera la naturaleza dicotómica del cladismo al adjudicar a un árbol filogenético, ramas que comunican distintas partes del árbol, transformándolo en una red (Page y Charleston, 1998).

Con los hongos endofíticos ocurre este fenómeno. Por esto las relaciones entre ellos no son representables por árboles dicotómicos sino más bien por redes. La formación de híbridos fúngicos para algunos genes (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994; Craven et al., 2001a, Moon et al., 2002), podrían hacerse evidentes en la discrepancia entre las filogenias basadas en estos genes y de aquellas basadas en los caracteres morfológicos de los endofitos. Estas copias se originaron en eventos de parasexualidad, luego de que dos hifas "parentales" se fusionaran dentro de un mismo hospedante. La pérdida posterior de cromosomas, no de forma meiótica sino al azar, daría como resultado un estado haploide

más estable (Schardl et al., 1997). Cuando analizamos el árbol de genes vamos a observar las distintas copias de ese gen, que en este caso se los llama haplotipos, con diferente localización en el árbol, pero no debemos olvidar que estos haplotipos están presentes en un mismo organismo híbrido.

Figura 5. Filogenia de tres especies (1-3) y seis genes que se producen desde la duplicación génica y que resulta en dos clados de genes parálogos, α y β . Los genes α 1-3 son ortólogos entre ellos, como así también lo son los β 1-3. Sin embargo cada gen α es parálogo con un gen de β desde que se separaron por la duplicación génica (Modificado de Page y Holmes 1998).



2.8.5 Los genes de β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*)

En esta tesis se utilizaron las secuencias de dos genes nucleares, β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*).

El producto del gen de β -tubulina constituye el principal componente estructural de microtúbulos, componentes críticos del esqueleto nuclear y citoplasmático necesarios para la mitosis, meiosis y otros aspectos del desarrollo celular y la motilidad (Byrd et al., 1990).

Las moléculas de tubulina constituyen los microtúbulos de los organismos, cada una de las cuales es un heterodímero que consta de dos subunidades globulares fuertemente unidas, llamadas α -tubulina (*tub*) y β -tubulina (*tub2*). Los microtúbulos tienen múltiples funciones estructurales y contráctiles en casi todas las células eucariotas (Atkins 1988).

En la mayoría de los organismos la tubulina esta codificada por una familia génica (Alberts et al., 1992). Las tubulinas de diferentes especies están estrechamente relacionadas entre sí en cuanto a la secuencia, aunque no están tan conservadas como la actina, por ejemplo. Esta conservación de secuencia elevada de las tubulinas refleja en parte los límites estructurales impuestos por la gran cantidad de proteínas a las que se unen (Alberts et al., 1992).

Los genes de *tub2* son apropiados para estudios genético-moleculares iniciales por varias razones: están presentes en todos los eucariotas conocidos, tienen niveles de expresión altos y son regulados a nivel de la estabilidad del mRNA (Yen et al., 1988). Las secuencias de *tub2* han sido ampliamente utilizadas en filogenias moleculares de hongos endofíticos (Tsai et al., 1994; Schardl et al., 1994; Schardl y Clay, 1997; Schardl et al., 1997; Craven et al., 2001a; Moon et al., 2002).

El gen *tef1* también ha sido muy utilizado en filogenias de hongos aunque es mucho más reciente (Hirt et al., 1999; Roger et al., 1999). Este factor de elongación de la traducción es una proteína altamente conservada que comienza a ser usada para análisis de inferencias filogenéticas por tener propiedades explícitas. Los análisis llevados a cabo por Roger y col. en 1999 demostraron su congruencia con otras filogenias moleculares. Se ha sugerido que *tef1* puede proveer una estimación robusta de las relaciones entre grupos de organismos eucarióticos (Hashimoto y Hasegawa 1996; Hashimoto et al., 1995).

2.8.6 Métodos de inferencia filogenética

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los genes en estudio, es necesario extraer e interpretar esa información evolutiva contenida en las mismas. Para ello se han desarrollado, y aún continúan desarrollándose, métodos analíticos basados en estadísticos

complejos, que tienen en cuenta los mecanismos de evolución y las propiedades biológicas de las moléculas en estudio.

Estos métodos de inferencia filogenética dan como resultado un **árbol** que es una representación gráfica de las relaciones entre los taxones usados para modelar la historia evolutiva del grupo en estudio (Figura 6). Un árbol consiste en **nodos** que conectan **ramas**. Los nodos terminales (también llamados *OTUs* o taxones terminales) representan secuencias u organismos para los que contamos con datos. Los nodos internos representan *OTUs* o ancestros hipotéticos. El ancestro de todos los *OTUs*, hipotéticos y existentes, es la **raíz** del mismo (Figura 6).

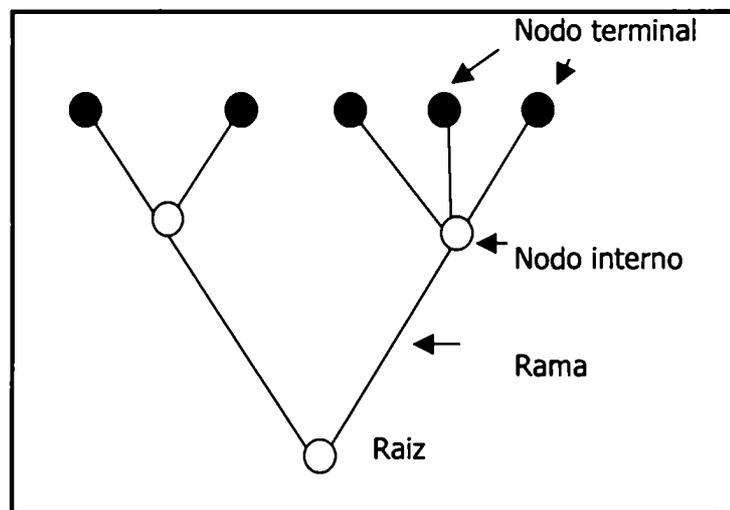


Figura 6. Esquema de un árbol y sus partes asociadas.

El número de ramas adyacentes que contiene un nodo interno es denominado **grado** del nodo. Si el nodo tiene un grado dos, el nodo es dicotómico, si tiene un grado de tres es una tricotomía, si tiene un número mayor a tres se dice que es una politomía. Un árbol que no presenta politomías se dice que está totalmente resuelto. Las politomías pueden representar dos situaciones muy diferentes (Figura 7). Primeramente, pueden representar una divergencia simultánea de los taxones; es decir, todos los descendientes evolucionaron al mismo tiempo y esto se denomina **politomía dura o pesada** (Hillis et al., 1996). Alternativamente las politomías pueden indicar incertidumbre sobre las relaciones filogenéticas; es decir, los linajes no divergieron al mismo tiempo, pero no es posible determinar el orden de divergencia de los mismos y entonces se denomina **politomía blanda** (Hillis et al., 1996). En este último caso, la politomía se debe a un desajuste entre la

velocidad de evolución del marcador y la de los taxones. La mayoría de las politomías son tratadas en primera instancia como blandas.

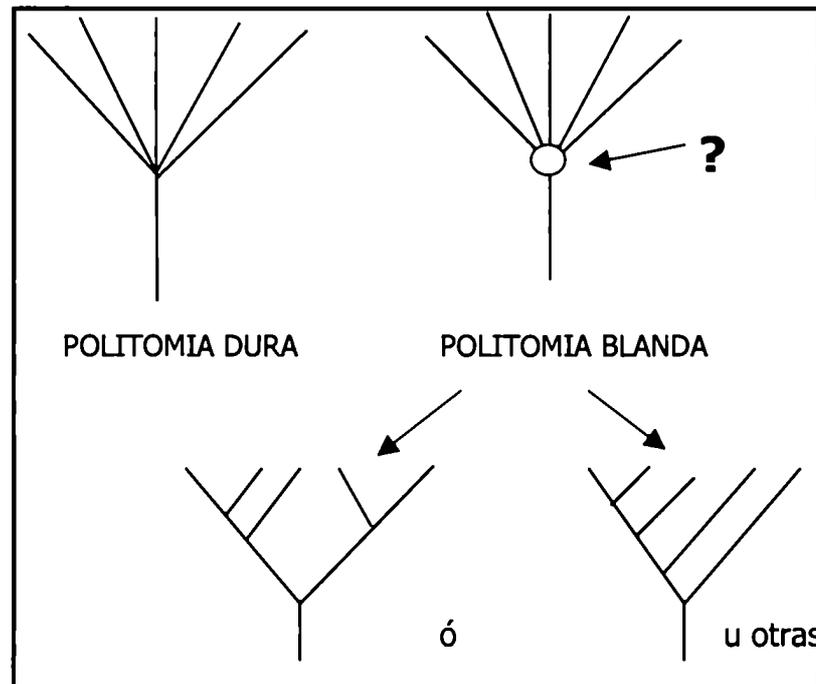


Figura 7. Las politomías pueden representar tanto divergencia simultánea de múltiples secuencias (politomías duras) o falta de resolución debido a datos insuficientes o árboles conflictivos (politomías blandas).

Existen distintos tipos de árboles que pueden ser usados para explicar diferentes aspectos de la historia evolutiva (Figura 8). El más básico es el **cladograma** que simplemente muestra relaciones de ancestro a descendientes. Dadas 3 secuencias por grupo, el cladograma nos dice cuáles 2 de esas 3 secuencias comparten un ancestro común más reciente. Los **árboles aditivos** contienen una información adicional: el largo de las ramas. Estos son números asociados a cada rama que corresponden a algún atributo de la secuencia, como la cantidad del cambio evolutivo (sustituciones) entre las secuencias. Otro término normalmente utilizado para estos árboles es filograma. Finalmente, los **árboles ultramétricos** o también llamados dendrogramas, son un tipo especial de árbol aditivo en el cual las puntas del árbol tienen todas la misma distancia a la raíz del mismo. Este tipo de árbol puede ser usado para estimar el tiempo de divergencia de los taxones, dado que el marcador está evolucionando en forma constante (reloj molecular), expresado directamente en años o indirectamente como la cantidad de divergencia de la secuencia usando las velocidades de sustitución del gen (Page y Holmes 1998).

Los cladogramas y los árboles aditivos pueden tener o no raíz. La raíz otorga al árbol direccionalidad, que permite tener idea de relaciones de ancestralidad entre las *OTUs*. La

dirección corresponde al tiempo; cuanto más cercano está el nodo de la raíz, más atrás está en el tiempo. Para enraizar un árbol es necesario introducir en el análisis un grupo externo (*outgroup*). Un grupo externo es un taxón que debe cumplir con tres condiciones:

- estar relacionado filogenéticamente con los taxones miembros del grupo interno (*ingroup*),
- haber divergido más tempranamente que los taxones del grupo interno en estudio y,
- tener una divergencia mayor con cualquiera de los miembros del grupo interno que ellos entre sí.

La inferencia filogenética constituye la base de la clasificación ya que permite agrupar los organismos por parentesco y reflejar su historia evolutiva. El cladismo toma en cuenta grupos monofiléticos o clados. Un grupo monofilético incluye a un ancestro y a todos sus descendientes, mientras que si se excluye a algún descendiente o al ancestro queda constituido un grupo parafilético. Los mamíferos, por ejemplo serían un grupo monofilético, mientras que los reptiles, grupo artificial que excluye a las aves, serían un grupo parafilético. Los grupos polifiléticos son agrupamientos formados por taxa no relacionados filogenéticamente pero que tienen caracteres que aparentemente son homólogos, como por ejemplo vertebrados con alas, que incluiría a las aves y murciélagos.

Existen varios métodos de inferencia filogenética molecular, pero tres son los más utilizados actualmente: *neighbour-joining* (NJ), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV). *Neighbour joining* y MP son utilizados con caracteres tanto moleculares como morfológicos, mientras que los algoritmos de MV han sido diseñados para datos moleculares.

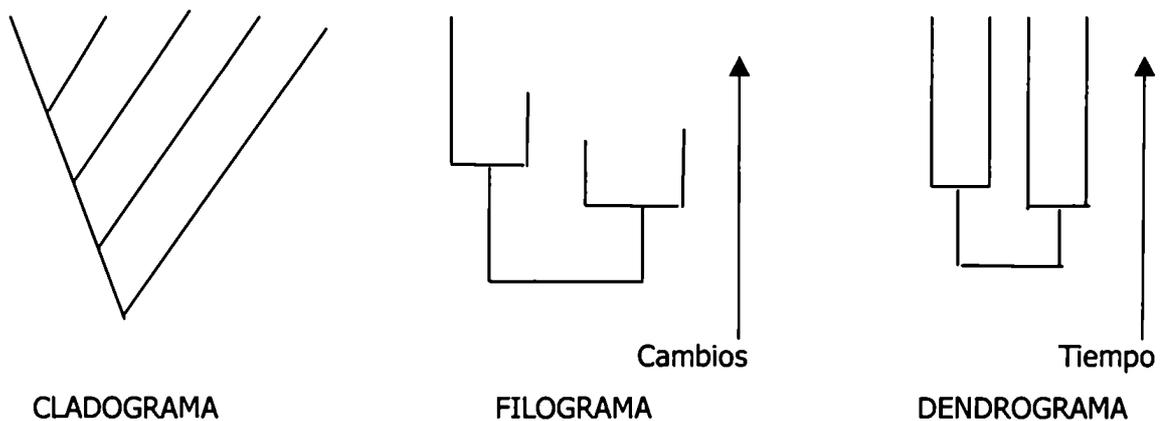


Figura 8. Gráficos de los distintos tipos de árboles. Para el cladograma ninguno de los ejes tiene información, para el filograma el eje vertical indica la cantidad de cambios acumulados entre las secuencias y en el dendrograma, el eje vertical indica el tiempo de divergencia entre las secuencias. El eje horizontal no indica nada en ningún tipo de árbol.

2.8.6.1 Métodos de distancia: *Neighbour-joining* o método del vecino más próximo

Los métodos de distancia están basados en la idea de que si sabemos la distancia evolutiva actual entre todos los miembros de un conjunto de secuencias que tenemos, podríamos reconstruir la historia evolutiva de esas secuencias. El método de *Neighbour-joining* (NJ) o del vecino más próximo es ampliamente usado para construir árboles ya que combina la velocidad computacional con una topología única como resultado. Es un método de agrupamiento (Saitou y Nei 1987) basado en el análisis de las distancias entre pares de taxa y por ello sufre la limitación de no poder optimizar el ajuste entre los datos y el árbol.

La matriz de partida es de distancias entre todos los pares posibles de *OTUs* calculada utilizando alguno de los modelos de evolución molecular (ver 2.8.3). El principio de este método consiste en encontrar "vecinos", es decir pares de taxones unidos por un nodo, de manera que minimicen la longitud total del árbol en términos de distancias. El punto de partida es un árbol con topología de estrella, donde todas las ramas que llevan las *OTUs* se unen en un nodo central (Figura 9.1). Luego se conectan dos taxones cualesquiera y se calcula la longitud total del árbol (Figura 9.2). El proceso se repite, pero ahora este par de *OTUs* unidas se consideran como una única *OTU* y se van incorporando los restantes taxones. Así se van originando *OTUs* compuestas. Este método produce un único árbol con ramas que representan una longitud proporcional al número de cambios acumulados en cada rama (Farris et al., 1996).

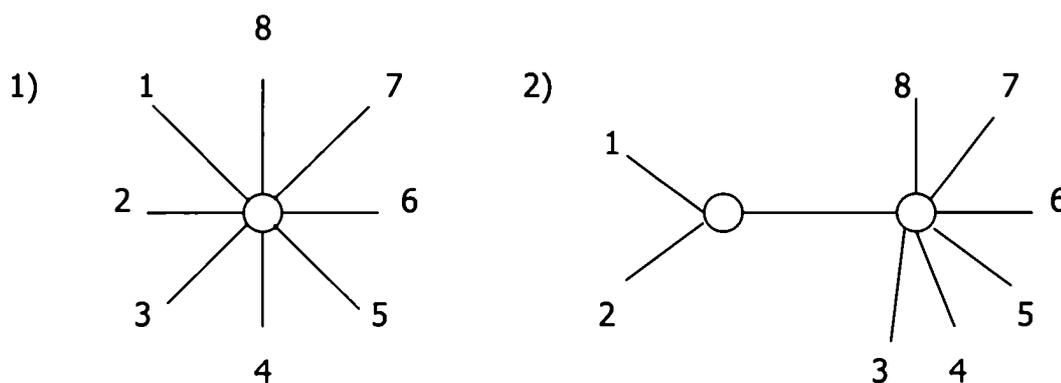


Figura 9. Esquema del algoritmo de construcción de árboles con el método de *Neighbour-joining*. 1) Se parte de un árbol con forma de estrella con todos los taxones unidos al mismo nodo. 2) Se asocian dos *OTUs* cualesquiera y se estima la distancia. Si resulta en la mínima distancia, esas se mantienen unidas y se sigue la agrupación.

Este método no tiene como supuesto la constancia de evolución entre los linajes (reloj molecular), entonces es eficiente cuando se utilizan marcadores que no cumplen con esta condición.

2.8.6.2 Máxima parsimonia

Los que utilizan datos discretos operan directamente sobre las secuencias o sobre modelos que derivan de las secuencias, ya que tratan de evitar la pérdida de información que acontece cuando las secuencias son convertidas en distancias. Los métodos de inferencia filogenética que usan datos discretos son los de máxima parsimonia (MP), basada en la escuela cladista. Para el cladismo la hipótesis filogenética que explicaría la filogenia real es aquella que implica el menor número de cambios (Farris, 1973). Para cada sitio, el objetivo es la reconstrucción de la evolución de ese sitio en un árbol que requiera el menor número de sustituciones necesarias para explicar las diferencias observadas entre las secuencias.

El número total de cambios evolutivos en un árbol es denominado **largo** del mismo, y es simplemente la suma del número de cambios en cada sitio. De todos los caracteres existentes en la secuencia, sólo son considerados aquellos que son informativos filogenéticamente desde el punto de vista cladista; es decir, que tienen variación en al menos dos secuencias. Los caracteres no informativos son aquellos sitios que permanecen invariantes (todas las secuencias tienen el mismo nucleótido en esa posición) o aquellos sitios donde solamente una secuencia tiene un nucleótido distinto al del grupo al que pertenece.

Luego de determinar qué sitios son informativos, se determina el número de pasos mutacionales necesarios para explicar cada topología posible. El número de árboles posibles aumenta de manera exponencial en relación al número de taxones, y en ciertos casos la evaluación de todas las topologías puede llegar a ser irrealizable debida a la cantidad de tiempo requerido. Una solución a esto es realizar una búsqueda heurística (ver 2.8.7), que evita explorar todas las topologías posibles, pero se corre el riesgo de no encontrar el árbol con el menor número de pasos (Hillis et al., 1996).

En general, se obtiene como resultado más de un árbol igualmente parsimonioso. Esto implica que hay varias topologías distintas que cuentan con el mismo número de pasos. Aquí, es común generar un árbol consenso superponiendo todos los árboles más parsimoniosos obtenidos. Aquellos taxones que estaban juntos en los árboles permanecerán también en el consenso, mientras que aquellos que cambian de ubicación, formarán politomías en el consenso.

No todos los caracteres evolucionan a las mismas tasas ni todos los tipos de sustituciones son igualmente frecuentes. Como se vio anteriormente (ver 2.8.2), existen sitios que evolucionan muy rápido y que son propensos a saturarse rápidamente, mientras que otros sitios más conservados, evolucionan más lentamente y son menos proclives a sufrir este efecto. Por ello es posible generar esquemas de pesado de caracteres que

permiten reducir los efectos de la homoplasia en los sitios que evolucionan rápidamente (Hillis et al., 1996). Cuanto menor es la velocidad de evolución de un carácter, mayor es el peso que se le asigna a ese sitio. Un caso donde este pesado tiene sentido es en las tres posiciones de un codón, donde es sabido que la tercera posición evoluciona a una tasa 3 veces más rápida que las dos primeras posiciones (Page y Holmes 1998). También puede otorgarse distinto peso según sea el tipo de sustitución. Por lo general a las transversiones se les asigna un mayor valor que a las transiciones ya que generalmente son menos frecuentes y son una fuente menor de homoplasia.

Existen varios índices que podemos calcular con el método de MP. El índice de consistencia (CI), se calcula como el cociente entre el mínimo número de pasos posibles para la topología obtenida y el número reconstruido de pasos para dicha topología (Farris 1969). El CI sería igual a 1 si no existe homoplasia y de 0,5 si la topología requiere el doble de pasos que los mínimos necesarios. El índice de retención (RI) (Farris 1989) tiene el mismo sentido y se calcula como el cociente entre la diferencia entre el número máximo de pasos posibles menos el número calculado, sobre el número máximo de pasos menos el número mínimo.

Dentro de las ventajas de la parsimonia, se cuenta con que entender el principio en el que se basa es sencillo, aparentemente hace pocos supuestos sobre el proceso, ha sido extensamente estudiado matemáticamente y existen muy buenos programas de computación para realizarlo. Sin embargo, la justificación de elegir el árbol más parsimonioso como el mejor estimador de la filogenia es controvertido. Existen dos grandes cuestionamientos. El primero es que la parsimonia es una convención metodológica que nos lleva a maximizar la cantidad de similitud evolutiva que podemos atribuir a un ancestro común. Cualquier carácter que no se adecue a un dado árbol requiere que se postule que la similitud entre dos secuencias mostrada por ese carácter surgió independientemente en ambas secuencias y que, por lo tanto, la similitud es debida a la homoplasia y no a la homología. La hipótesis de homoplasia es una hipótesis *ad hoc*. No puede ser demostrada, particularmente con caracteres moleculares. El árbol más parsimonioso minimiza el número de hipótesis *ad hoc* requeridas y por ello es el preferido (Farris 1983).

Otro punto importante es que la parsimonia está basada en un supuesto implícito sobre evolución: el cambio evolutivo es raro. Por esto el árbol que minimice los cambios es aquel que mejor estima la filogenia actual. Una objeción importante a la parsimonia es que bajo algunos modelos de evolución no es consistente; esto es, si agregamos más datos es posible obtener árboles de topología diferentes (Page y Holmes 1998).

2.8.6.3 Máxima verosimilitud

La verosimilitud (*likelihood*) es la probabilidad de ajuste entre una dada topología y los datos observados, dado un determinado modelo de evolución molecular. Dependiendo del modelo y de la topología del árbol, los datos pueden ser más o menos probables. El principio de verosimilitud sugiere que el árbol que hace más factible y probables los datos observados (secuencias), debe ser el elegido. Dicho más formalmente, la verosimilitud de un árbol (L) está dada por:

$$L = \Pr (D/H)$$

donde Pr representa la probabilidad de obtener los datos observados (D) debido a una topología particular de árbol filogenético (H). El árbol que hace que L sea máximo es el árbol estimado de máxima verosimilitud de la filogenia.

Máxima verosimilitud no es la probabilidad de que el árbol sea el árbol verdadero, sino que es la probabilidad de que el árbol sea el que ha dado origen a los datos que nosotros hemos coleccionado. El método de MV es un método de inferencia atractivo ya que nos permite incorporar modelos explícitos de evolución de secuencias y también permite realizar pruebas estadísticas de la hipótesis evolutiva (árbol). Los métodos de MV requieren tres elementos: un modelo de evolución de secuencias, árboles (diferentes topologías) y los datos observados. Para encontrar el resultado, el método de construcción de árboles debe resolver dos problemas: encontrar los largos de las ramas que maximicen la verosimilitud de un árbol respecto a los datos observados, y encontrar qué árbol tiene la mayor L entre todos los posibles. En el primer caso, se estiman la longitud de ramas que hacen máximo el valor de L para cada sitio y luego se suman los logaritmos de los L de cada sitio, dando origen al logaritmo de L del árbol.

$$\ln L = \sum_{i=1}^k \ln L_i$$

donde K es el número de sitios.

Para computar L en un sitio determinado, es necesario computar las probabilidades de los estados observados en ese sitio dando todas las combinaciones posibles de los estados ancestrales (nodos internos). Por lo general esta estimación del árbol de MV requiere de mucho tiempo computacional ya que los análisis son muy complejos. Esta es una de las desventajas de este método y por ello se ha limitado su aplicación.

Según vimos previamente, uno de los tres elementos requeridos por MV es un modelo de evolución de secuencias. Este modelo puede incluir parámetros para la relación

transiciones/ transversiones (Ts/Tv), composición de bases y variación en la tasa de sustitución entre sitios, etc. (ver 8.2.3). Los valores de estos parámetros pueden ser estimados a partir de los datos, utilizando el programa MODELTEST (Posada y Crandall, 1998), que nos da el valor de estos parámetros y el modelo que mejor ajusta a los datos observados (secuencias). Este programa calcula el valor de verosimilitud ($\ln L$) de un árbol obtenido por un método rápido como puede ser *Neighbour-joining* (NJ) empleando el modelo de evolución más sencillo (JC). Luego repite el procedimiento utilizando el modelo siguiente en complejidad. Se comparan los valores de verosimilitud. Si el valor del $\ln L$ es mayor que el árbol anterior, se avanza con el siguiente modelo, más complejo. Cuando se obtiene un valor de $\ln L$ que no es significativamente diferente del anterior, entonces se elige al modelo anterior de evolución, más sencillo, que se ajusta a los datos. Este modelo junto con el valor de sus parámetros son los que se utilizan para buscar el árbol de MV.

2.8.7 Métodos de búsqueda de árboles

Cuando contamos con un número pequeño de secuencias encontrar el árbol óptimo mediante el estudio de todos los árboles posibles es una tarea sencilla. A este tipo de búsqueda se la llama exhaustiva. Sin embargo, en la mayor parte de los estudios generalmente se analizan por encima de 10 secuencias y es necesario emplear métodos de búsqueda heurísticos (Swofford 1993). En este caso se analizan subconjuntos de los árboles posibles, esperando encontrar en ese subgrupo al árbol óptimo. El costo que tiene este método es que no se puede asegurar la obtención del árbol con el menor número de cambios posibles (Hillis et al., 1996).

2.8.8 Congruencia y calidad de datos. *Bootstrap*

La congruencia es la concordancia entre las filogenias estimadas a partir de distintos caracteres. Si para los diferentes conjuntos de datos obtenemos árboles similares, esto nos proporciona confiabilidad ya que estarían reflejando la misma historia evolutiva. El poder de los análisis de congruencia se basa en el supuesto de que existe solamente una filogenia verdadera y que los datos que se han analizado reflejan esa historia, ya que es bastante improbable obtener la misma filogenia sólo por azar. La congruencia ha sido utilizada para validar tanto distintos métodos de inferencia filogenética como también para validar la información que contienen conjuntos de datos particulares (Page y Holmes 1998).

Una razón para una pobre estimación de filogenia puede no ser debida al método utilizado sino a los datos en sí mismos. Si los datos contienen muchas homoplasias, diferentes caracteres van a validar distintos árboles. En este caso se habla de falta de señal filogenética. Una manera de medir la proporción de homoplasias, es tomar múltiples

muestras del conjunto de datos y comparar la estimación filogenética, es decir los árboles de los mismos. En 1992, Hillis y Huelsenbeck elaboraron un método para evaluar la señal filogenética que contienen los datos por medio del estadístico **g**, que describe la distribución de las longitudes de un número considerable de árboles construidos por parsimonia. Los datos con fuerte señal filogenética muestran una distribución asimétrica de los árboles ordenados de manera creciente por los cambios totales, mientras que aquellos con pobre señal filogenética producen distribuciones simétricas. Un valor de $g=0$ corresponde a una distribución con señal filogenética pobre, mientras que valores negativos del estadístico corresponden a una distribución asimétrica.

En las filogenias moleculares, el objetivo buscado es encontrar el "único árbol verdadero" para un conjunto de secuencias. A medida que aumenta la cantidad de árboles obtenidos, dependiendo del método utilizado, menor es la precisión que obtenemos para explicar los datos. Por lo tanto, es necesario contar con alguna indicación de límites de confianza para las filogenias estimadas. Uno de los métodos más utilizados para estudiar si las topologías de los árboles obtenidos respaldan los datos es denominado **bootstrap** (Felsenstein 1985a). Este método puede aplicarse a filogenias ya que genera pseudoréplicas (remuestreos). A partir de los datos originales, se elimina al azar un carácter y se duplica al azar otro carácter, de tal manera que el número de caracteres de la matriz original es igual al número de caracteres de la pseudoréplica. A partir de cada pseudoréplica se construye un árbol usando cualquier método de los descritos previamente. Este proceso se repite varias veces (100 a 1000) dando como resultado un conjunto de árboles de **bootstrap**. Este conjunto de árboles contiene la información de los errores de muestreo asociados con nuestra muestra. Para un número reducido de secuencias es fácil mostrar el número de frecuencias del árbol. Sin embargo, para un número mayor de secuencias se hace bastante complicado. Lo más conveniente es generar estos valores en un árbol consenso. Cada nodo en el consenso llevará asociado un valor de **bootstrap**, que no es más que el porcentaje de veces que ese nodo está representado en los árboles obtenidos a partir de las pseudoréplicas. Un nodo que no se vio afectado en las 1000 topologías derivadas de las pseudoréplicas (es decir que reunió en todos los casos a las mismas OTUs) aparecerá en todos los árboles y se le asignará un 100% de valor de **bootstrap**, mientras que un nodo que aparece en 70 árboles, tendrá un valor de **bootstrap** del 70%. En este trabajo hemos considerado un buen soporte de nodo a un valor igual o superior al 75%.

2.9 Coevolución Hospedante-Hospedador

La importancia económica y ecológica de las gramíneas (familia Poaceae) fomentó un amplio interés en su evolución y su sistemática. Los cereales, la caña de azúcar, las cañas de bambú y los forrajes son de prioritaria importancia en la economía humana (GPWG 2001). Las gramíneas, presentes en casi todos los hábitats terrestres, cubren aproximadamente un tercio de la superficie total de la tierra (Shantz 1954), y la mayor parte de la población mundial basa su alimentación en cereales como el arroz, el maíz y el trigo entre otros (Mathews et al., 2000). La familia de las gramíneas incluye aproximadamente 10000 especies distribuidas en 700 géneros (Watson y Dallwitz 1992, Renvoise y Clayton 1992).

Los caracteres morfológicos han sido tradicionalmente el criterio de uso muy extendido en las decisiones taxonómicas. Análisis anatómicos y micromorfológicos son muy útiles, pero los datos para estos caracteres son incompletos para delimitar categorías taxonómicas (Hsiao et al., 1995). Estudios cromosómicos realizados por Kihara (1954), Stebbins (1956) y posteriormente por Dewey (1982, 1984), han provisto información muy importante para entender las diferencias a nivel genómico, el origen de los poliploides y la evolución reticulada de las Poaceae.

Soreng y colaboradores (1990), realizaron una filogenia molecular basada en la variabilidad de sitios de restricción de ADN de cloroplastos. Ellos estudiaron 7 tribus (Meliceae, Stipeae, Poeae, Avenae, Brachypodieae, Bromeae y Triticeae) y concluyeron que las Poideae son un grupo monofilético. Las variaciones en los sitios de restricción así como la secuenciación del genoma de los cloroplastos son herramientas muy poderosas para estudiar las relaciones filogenéticas entre las plantas (Zurawsky y Clegg 1987, Soreng et al., 1990, Kellogg 1992).

Es interesante investigar el origen de las gramíneas para poder estudiar el origen de su coevolución con los endofitos fúngicos.

Las gramíneas podrían haber tenido su origen en Gondwana, en el noreste de Australia (Simon y Jacobs 1990). Los fósiles de las gramíneas de formas modernas son conocidos a partir de floras fósiles del Eoceno (ver Tabla de Apéndice) (Laurenroth y Milchunas 1992). Los registros fósiles del polen y de la fauna que se alimentaba de ellas, revelaron que las gramíneas se establecieron en condiciones de sequía, particularmente en las zonas secas de lo que hoy es Sudamérica y el sur de Australia, luego del deterioro climático que ocurrió en el Eoceno (Bredenkamp et al., 2002). Existió un incremento global de la biomasa de gramíneas C4 durante el Mioceno/Pleioceno (Cerling et al., 1997, Ehlinger et al., 1997). Esto implicó un incremento abrupto y una gran dispersión de la biomasa producida por plantas C4, relativo al descenso de la concentración de CO₂ atmosférico por debajo de lo necesario para el desarrollo de las gramíneas C3 (Bredenkamp et al., 2002). Se

estableció un gradiente florístico bien marcado sobre la línea ecuatorial. Las angiospermas fueron más frecuentes y abundantes a bajas latitudes en zonas secas (tropicales y subtropicales) de Gondwana (Anderson et al., 1999). Las gimnospermas prevalecieron en climas cálidos, en latitudes altas del noreste de Laurasia y sur de Gondwana.

Antes de la separación de Gondwana, el clima era húmedo y caluroso, y además soportaba floresta en el sur de Australia, costa de Antártica y sur de Sudamérica. África e India se separaron antes del Cretácico tardío y desarrollaron sus biotas únicas. La separación total de lo que serían los futuros continentes, causó un mayor aumento en el gradiente de temperaturas desde el polo sur al ecuador (Siesser 1978, Scholtz 1985, Scotese 1997). Durante este período bajaron las lluvias y se desarrolló un patrón de lluvias en varias áreas de los continentes del hemisferio sur. Por el Mioceno, se produjo un enfriamiento en Sudamérica y la vegetación cambió hacia el desarrollo de pastizales abiertos. En Antártica se produjo un cambio climático dramático causando la casi completa extinción de la flora vascular (Anderson et al., 1999).

Durante el cuaternario tardío, las fluctuaciones climáticas producidas por ciclos de glaciaciones e interglaciaciones, influyeron fuertemente en la evolución de las comunidades de plantas y contribuyeron al desarrollo de los modernos biomas de los continentes del hemisferio sur.

Los sistemas hospedante - hospedador son intrínsecamente interesantes para los biólogos evolutivos ya que potencialmente señalan una larga e íntima asociación entre dos o más grupos de organismos que a menudo se encuentran lejanamente relacionados y tienen una biología muy disímil. Estas asociaciones casi siempre promueven adaptaciones en el hospedante y el hospedador (coevolución o coadaptación) y eventualmente eventos cladogenéticos en los dos linajes (coespeciación). El fenómeno de coespeciación es de particular interés para los biólogos comparativos ya que permite identificar eventos de la misma edad en las filogenias del hospedante y del hospedador. Un problema fundamental en el estudio de la coevolución entre ambos organismos es la reconstrucción de la historia de la asociación. Podemos preguntarnos hasta qué extremo el hospedante y el hospedador han coespeciado (asociación por descendencia) o hasta donde el hospedador ha cambiado de hospedante (asociación por colonización o transferencia horizontal).

Las filogenias moleculares son herramientas poderosas para el estudio de estas asociaciones porque los datos moleculares ofrecen la posibilidad de comparar la divergencia entre el hospedante y el hospedador mediante genes homólogos de ambos organismos. Ante una incongruencia entre el árbol del hospedante y el del hospedador, podemos alegar dos escenarios posibles, muy diferentes, para explicar la incongruencia: por cambio de

hospedante o por la presencia de múltiples linajes del hospedador y luego extinción de algunos. Si contamos con información del tiempo de divergencia, podemos usar esa información para elegir entre ambos escenarios posibles. Los datos del tiempo pueden provenir de dataciones que utilicen reloj molecular.

Schardl y colaboradores (1997) estudiaron las filogenias moleculares tanto de gramíneas del hemisferio norte (hospedantes) como del endofito asociado (hospedador) y plantearon una coevolución entre ambos organismos para la mayoría de las especies de endofitos estudiadas. Para que la coevolución sea posible es necesario que la asociación tenga un cierto grado de especificidad y que la simbiosis persista bajo escalas de tiempo evolutivo. Sin embargo, la condición de persistencia a largo plazo no siempre se encuentra, y tal es el caso de los endofitos asexuales híbridos (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994). Aunque la transmisión vertical por sí sola podría promover la coespeciación de ambos simbioses, ésta no estaría ocurriendo en los organismos asexuales híbridos a pesar de su modo de transmisión, y sí estaría ocurriendo en endofitos sexuales del género *Epichloë* que no son híbridos y que además tienen una asociación específica y producen simbiosis de larga duración.

HIPOTESIS

Antecedentes

Todos los endofitos aislados de gramíneas nativas analizados hasta el momento, pertenecen al género *Neotyphodium*. Se han encontrado estos endofitos en diversos géneros y especies de gramíneas con extensa distribución en Argentina (Cabral y Lugo 1998). Estos endofitos mostraron, entre sí, una similitud mayor al 70% en estudios isoenzimáticos y morfológicos (Gentile 1998). Por el contrario, las similitudes con los endofitos del hemisferio norte no superaron el 30%.

Cabral y colaboradores (1999) determinaron, por metodologías moleculares, una nueva especie de *Neotyphodium* (*N. tembladerae*) para los endofitos aislados de las gramíneas tóxicas encontradas en Argentina.

El fenómeno de hibridación es frecuente en los endofitos de pastos (Schardl et al., 1997, Clay y Schardl 2002). Se encontraron endofitos asexuales híbridos en África y Nueva Zelanda (Moon et al., 2002). También se los ha registrado en gramíneas del hemisferio norte, estableciéndose que su origen evolutivo son especies sexuales del género *Epichloë* (Tsai et al., 1994, Schardl et al., 1994, Schardl et al., 1997, Craven et al., 2001a).

3. HIPOTESIS

Los endofitos aislados de los diferentes hospedantes de gramíneas de Argentina tienen todos un origen común, derivado de formas sexuales del hemisferio norte. Dado que la hibridación ha sido un fenómeno recurrente en la evolución de los endofitos en varios continentes, muchos de los endofitos estudiados aquí, serán de origen híbrido derivados de formas sexuales del género *Epichloë*.

Teniendo como base los resultados previos obtenidos mediante el uso de técnicas isoenzimáticas y la macro y micro morfología de los cultivos, no existirá mucha variabilidad entre los endofitos Argentinos en estudio.

La dispersión de las especies de *Neotyphodium* en gramíneas sudamericanas y en particular Argentinas, implicó la diferenciación de especies en relación a las presentes en el hemisferio norte.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

- ◆ Estudiar las relaciones filogenéticas de los endofitos fúngicos del género *Neotyphodium*, que conforman asociaciones mutualistas con numerosas especies de gramíneas con extensa distribución geográfica en Argentina. Los análisis filogenéticos se harán en base a las secuencias nucleotídicas de los genes β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*).
- ◆ Estudiar la existencia de endofitos de origen híbrido para los genes *tub2* y *tef1* y establecer si son derivadas o no de formas sexuales del hemisferio norte, que se incluyen en los análisis filogenéticos.
- ◆ Identificar, a partir del análisis de los árboles filogenéticos de los endofitos, las variantes inter- poblacionales.
- ◆ Analizar el grado de correlación de estas variantes con características macro y micromorfológicas.

MATERIALES Y METODOS

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Cepas utilizadas en el estudio

Se analizaron un total de 27 cepas de endofitos fúngicos aislados de gramíneas nativas de Argentina. Se tomaron muestras de diferentes poblaciones de 10 géneros de gramíneas, distribuidos en 10 provincias de Argentina. Siete de los aislamientos corresponden a 3 gramíneas autóctonas tóxicas para el ganado: *Festuca hieronymi* Hack., *Festuca argentina* (Speg) Parodi., y *Poa huecu* Parodi. El resto son aislamientos provenientes de 7 gramíneas nativas de las que no se poseen datos de toxicidad: *Festuca magellanica* Lam., *Festuca superba* (Turpe) Parodi, *Poa rigidifolia* Steud., *Melica stuckertii* Hack., *Bromus setifolius* Presl., *Bromus auleticus* Trin. y *Phleumm commutatum* Gaudin.

También fueron incorporadas a este estudio cepas de endofitos provenientes del hemisferio norte que fueron proporcionadas por el Dr. Christopher L. Schardl (University of Kentucky, Kentucky, USA). Entre las cepas estudiadas se encuentran: *Epichloë typhina*, *E. festucae*, *E. bromicola*, *E. sylvatica*, *E. elymi*, *E. clarkii*, *E. glyceriae*, *E. amarillans*, *E. baconii*, *Neotyphodium coenophialum*, *N. aoteroae*, *N. australiense*, *N. uncinatum* y *N. occultans*.

La casi totalidad de las cepas provenientes de gramíneas nativas había sido aislada con anterioridad y se encontraban depositadas en la colección BAFCCult*.

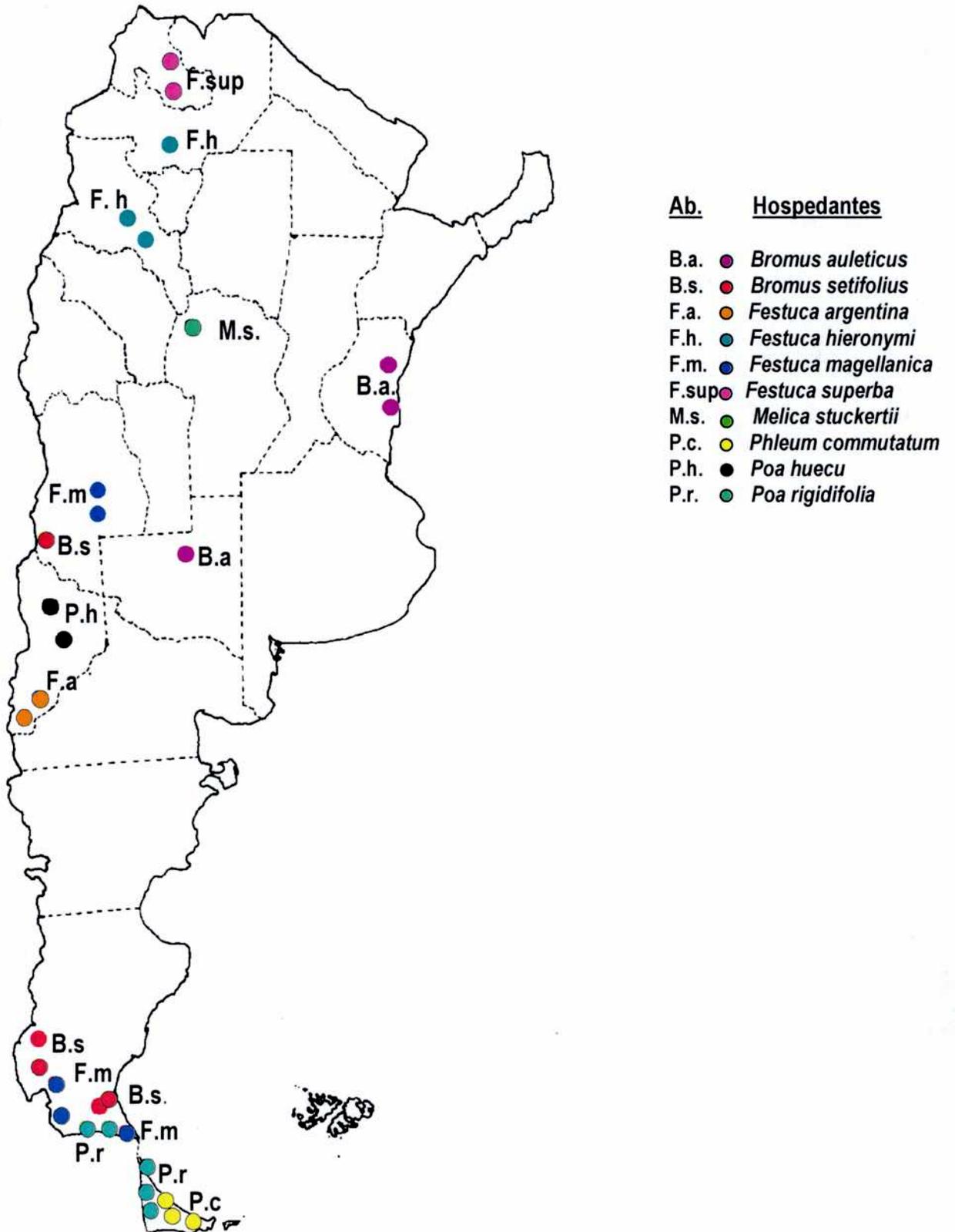
Se colaboró en el aislamiento e identificación del endofito de *Bromus setifolius* y de *Festuca superba* según se detalla a continuación.

* BAFCCult: colección de cultivos de la FCEyN de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Tabla I. Sitios de muestreo de las poblaciones de gramíneas colonizadas por endofitos.**a** BAFCcult N°

Especies hospedantes	Población y origen geográfico	Provincia	Aislamiento a
<i>Phleum commutatum</i>	Cabo Domingo	Tierra del Fuego	Phc682
<i>Phleum commutatum</i>	Ea. María Behety	Tierra del Fuego	Phc755
<i>Poa rigidifolia</i>	Paso Garibaldi	Tierra del Fuego	Pr641
<i>Poa rigidifolia</i>	Río Grande	Tierra del Fuego	Pr345
<i>Poa rigidifolia</i>	Río Grande	Tierra del Fuego	Pr198
<i>Poa rigidifolia</i>	Lago Yehuin	Tierra del Fuego	Pr642
<i>Poa rigidifolia</i>	Cabo Vírgenes	Santa Cruz	Pr219
<i>Festuca magellanica</i>	Las Horquetas, Ruta 5	Santa Cruz	Fm353
<i>Festuca magellanica</i>	Ruta 220 Las Leñas-Valle Hermoso	Mendoza	Fm351
<i>Festuca magellanica</i>	Ruta 220 Las Leñas-Valle Hermoso	Mendoza	Fm745
<i>Melica stuckertii</i>	Capilla del Monte	Córdoba	Ms803
<i>Bromus setifolius</i>	Río Rico (Sitio 18)	Santa Cruz	Bs719
<i>Bromus setifolius</i>	Ea. Alice (Sitio 24)	Santa Cruz	Bs420
<i>Bromus setifolius</i>	Ruta 220 a Las Leñas	Mendoza	Bs649
<i>Bromus setifolius</i>	Ruta 11 a Glaciar P. Moreno (Sitio 16)	Santa Cruz	Bs532
<i>Bromus setifolius</i>	Ruta 11 a Glaciar P. Moreno (Sitio 16)	Santa Cruz	Bs713
<i>Bromus setifolius</i>	Ea. El Condor (Sitio 5)	Santa Cruz	Bs508
<i>Poa huecu</i>	Cajón Almanza	Neuquén	Ph1209
<i>Poa huecu</i>	Cajón Almanza	Neuquén	Ph1213
<i>Festuca hieronymi</i>	Cuesta del obispo	Salta	Fh344
<i>Festuca hieronymi</i>	Cuesta de Capillita	Catamarca	Fh237
<i>Festuca hieronymi</i>	Ruta 42-Desvío a Frías	Catamarca	Fh734
<i>Festuca hieronymi</i>	Cuesta del Portezuelo	Catamarca	Fh737
<i>Festuca argentina</i>	Aluminé	Neuquén	Fa1351
<i>Festuca superba</i>	Yala	Jujuy	Fsu347
<i>Festuca superba</i>	Yala	Jujuy	Fsu349
<i>Bromus auleticus</i>	Van Praett	La Pampa	Ba308
<i>Bromus auleticus</i>	Colón	Entre Ríos	Ba355
<i>Bromus auleticus</i>	Parque San Carlos-Concordia	Entre Ríos	Ba417

Figura 10. Mapa de la República Argentina donde se muestra la distribución geográfica de las poblaciones de las distintas gramíneas hospedantes.



5.2 Relevamiento y colección de las gramíneas

Durante los meses de diciembre a febrero de los años 1996-1999 se realizaron relevamientos en diferentes provincias de la Argentina con el objeto de identificar poblaciones de pastos nativos asociadas a endofitos fúngicos y coleccionar ejemplares vivos. Se relevaron pastos de invierno miembros de la familia Poaceae, de tribus donde se registra el mayor número de asociaciones con endofitos como son las tribus Poeae (*Festuca* y *Poa*), Bromeae (*Bromus*), Meliceae (*Melica*) y Aveneae (*Phleum*).

Cada población se inspeccionó visualmente, con el objeto de detectar la presencia de estromas sexuales y/o estructuras anamórficas.

De varias plantas tomadas al azar se extrajo una caña por planta. El material se inspeccionó microscópicamente, tomándose muestras de tallos y vainas, de las que se tomó tejido parenquimático con ayuda de un bisturí. Se tiñó con una gota de solución acuosa de azul de anilina 0.1% y se observó la presencia de hifas del endofito bajo microscopio óptico (White et al., 1995).

Posteriormente se llevó a cabo el muestreo definitivo en aquellas poblaciones que fueron positivas para la presencia del endofito. Se coleccionaron entre 7-10 plantas de cada población, desenraizándolas con una pala y conservándolas en bolsas de plástico con tierra, hasta su traslado al laboratorio. En los casos en los que se encontraron maduros, se tomaron muestras de cariopses y se mantuvieron en bolsas de papel.

5.3 Aislamiento del endofito

Los tallos, vainas y/o semillas de cada planta se lavaron cuidadosamente en agua corriente. Los cariopses completos y las vainas y cañas en trozos de 1,5 a 2 cm, se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos sucesivamente en una solución de etanol 50% (1 minuto), hipoclorito de sodio 50% (lavandina comercial y agua corriente 1:1) (1 a 3 min.), y etanol 70% (2 min.) (Clark et al., 1983).

Una vez esterilizados, los cariopses se cortaron en fragmentos así como los trozos de vainas y cañas, y se sembraron en cajas de Petri con medio agar-papa-glucosa (APG) (extracto de papa 300g/l, agar 20 g/l, glucosa 10g/l). Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron en cámara de cultivo, en oscuridad, a 23°C hasta que se observó crecimiento hifal emergiendo de los extremos de los trozos sembrados.

De cada planta se seleccionó una sola cepa y, luego de ser repicadas en tubos pico de flauta con medio agarizado, se dejaron desarrollar y se incorporaron al BAFCCult.

Para asegurarnos de poseer un cultivo puro, sin contaminaciones, se realizaron 3 repiques consecutivos en cajas de Petri con medio APG, a partir de colonias provenientes de un único conidio.

5.4 Caracterización morfológica de la colonia y el cultivo.

Para la caracterización e identificación de los cultivos se sembró cada cepa en placas de Petri con medio Agar-Agua (20g/l) y APG. Se analizaron los caracteres macro y micromorfológicos, como el crecimiento del cultivo y el tamaño de los conidios entre otros.

Para sembrar las placas conteniendo agar-agua, se tomo una colonia pequeña proveniente de un cultivo fresco en APG y se la mortereó con un mortero plástico autoclavado en un tubo de microcentrifugación (*eppendorf*) con 100 μ L de agua estéril bajo flujo laminar. Luego se transfirió sobre placas con agar-agua y se utilizó un rastrillo de vidrio para homogeneizar la absorción y la distribución del cultivo sobre la placa.

Los caracteres micromorfológicos de cada cepa, se estudiaron bajo microscopio óptico de fluorescencia (Zeiss, Axioscope) utilizando un taco de agar-agua con crecimiento miceliano de 10 días. Este se colocó directamente bajo el microscopio, cubriendo con un cubre-objetos directamente sobre el taco y evitando burbujas de aire en la interfase. Las cepas, al estar sembradas en un medio pobre, crecen muy poco, de manera mas esparcida y con mucha conidiación. Por consiguiente es mucho mejor para estudiar estos caracteres y para tomar mediciones y fotografías. Se analizaron el tamaño de los conidios, el largo de las fiálides y la morfología de las hifas.

Para registrar la velocidad de crecimiento de cada cepa se tomó, a partir de un cultivo puro, un pequeño rectángulo de 2 mm x 1 mm utilizando un bisturí estéril bajo flujo laminar, se sembró en una caja de Petri con medio APG, y se dejó crecer a 22°C en oscuridad. Se estimó el diámetro de la colonia a los 7, 14 y 21 días de crecimiento así como la textura, borde, elevación y el color. Se hicieron 4 réplicas de cada cepa y se fotografiaron los resultados.

5.5 Extracción del ADN genómico

El ADN genómico total de cada endofito fue aislado utilizando el método de Goodwin y Lee (1993) con algunas modificaciones. Se tomaron de 3 a 15 mg de micelio fresco correspondiente a colonias pequeñas que crecían en cajas de Petri con medio APG. Luego de extraerle el exceso de agar, se mortereó en un tubo de microcentrifugación (*ependorf*) con 100 μ L de buffer de lisis (50mM Tris HCl pH: 7.2, 50mM EDTA, 3% SDS, 1% β -mercapto-etanol), usando un mortero plástico autoclavado, hasta obtener una suspensión homogénea. Luego los tubos se cubrieron de manera laxa con plástico adherente de cocina (*film*) y se colocaron en un horno microondas a máxima potencia (900 watts) por un total de 30 segundos, divididos en tres pulsos de 15, 10 y 5 segundos para evitar ebullición. Inmediatamente después, se agregaron a cada tubo otros 300 μ L de buffer de lisis y se incubaron a 80°C por espacio de 10 minutos.

La extracción del ADN se llevó a cabo adicionando 200 μ L de fenol y 200 μ L de cloroformo a cada muestra, se agitó vigorosamente y luego se centrifugaron a 13000xg durante 15 minutos. El sobrenadante fue removido y trasvasado a un nuevo tubo. Luego se agregaron 400 μ L de cloroformo y se centrifugó nuevamente a 13000xg durante 5 minutos.

El ADN se precipitó agregando 0,5 volúmenes de isopropanol y 15 μ L de acetato de sodio 5M. Luego se centrifugó a 13000xg por 15 minutos. El precipitado se resuspendió en 50 μ L de agua estéril purificada (equipos MilliQ, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts) y se guardó en heladera a 5°C hasta su posterior utilización.

5.6 Cuantificación del ADN genómico

El ADN fue cuantificado por fluorometría, utilizando el colorante bis-benzimidazol, conocido comercialmente como Hoechst33258. Las concentraciones obtenidas se confirmaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en las que se utilizó un marcador de masa conocida para comparar.

5.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las regiones de los genes *tub2* y *tef1* correspondientes a los intrones, fueron amplificadas por PCR (*polymerase chain reaction*) (Foster et al., 1993, Doss et al., 1998), utilizando los cebadores (*primers*) indicados en la Tabla II. El lugar en donde cada uno de estos cebadores híbrida con el ADN está indicado en la Figura 11. El tamaño aproximado de los productos de amplificación fueron de 560 pares de bases (pb) para *tub2* y de 810 pb para *tef1*. Las reacciones se llevaron a cabo en 50 μ L totales, conteniendo 10 mM de buffer Taq (PE Applied Biosystems), 2,5mM MgCl₂, 1,25mM de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos 3 fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 μ M de cada cebador, 0,025 U μ L⁻¹ de

enzima Taq (AmpliTaq Gold Polymerasa, PE Applied Biosystems, Foster City, California) y 10 ng de ADN genómico purificado del endofito.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (PE Applied Biosystems, Foster City, California) programado para una incubación inicial de 9 minutos a 94°C para activar la enzima polimerasa, seguidos por 40 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C y 2 minutos a 72°C. Se incubó al final a 72°C durante 5 minutos para la extensión de las cadenas que pudieran haber quedado incompletas.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1% con buffer TBE 1X (89mM Tris-borato, 2,5mM Na₂ EDTA, pH: 8,3) y revelados por tinción con 0,5 ug/ml de bromuro de etidio, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar el gel con agua para eliminar el exceso de colorante, se analizaron los geles por exposición a un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla II. Denominación, secuencia y aplicación de los cebadores.

Denominación del cebador a	Secuencia del cebador (5´-3´)	Aplicación principal b
Tub2-exon 11140 d	GAG AAA ATG CGT GAG ATT GT	Amp.
Tub2-exon 1214 r	TGG TCA ACC AGC TCA GCA CC	Amp.
Tub2-SelA 614-595 r (C)	AGA AGC CTG TCA CAT AGA TT	Amp. Sel./ sec.
Tub2-SelC 614-595 r (D)	AGA AGC CTG TCA CAT GGA TG	Amp. Sel./ sec.
Tub2-Sel E.fest 110-134 d (A)	CCG CCG AGC CCG GCC ACG AA	Amp. Sel./ sec.
Tub2-SelC 110-134 d (B)	CCG CCG AGC CCG GCC ACG AC	Amp. Sel./ sec.
Tub2-exon 8837 d	CAA ATT GGT GCT GCT TTC TGG	Sec.
Tub2-exon 1215 r	TCG TTG AAG TAG ACA CTC AT	Sec.
Tef1-exon 1d	GGG TAA GGA CGA AAA GAC TCA	Amp.
Tef1-exon 6r	CGG CAG CGA TAA TCA GGA TAG	Amp.
Tef1-SelT 126-146 d (a)	CCG AAA TTC ACG TAC TGA CT	Amp. Sel./ sec.
Tef1-SelA 126-146 d (b)	CCG AAA TTC ACG TAC TGA CA	Amp. Sel./ sec.
Tef1-SelT 881-862 r (e)	GAT GCG CGT TAA TGA TAC AT	Amp. Sel./ sec.
Tef1-SelG 881-862 r (f)	GAT GCG CGT TAA TGA TAC AG	Amp. Sel./ sec.
Tef1-SelC 918-898 r (c)	TCT TGA TGA AAT CAC GGT GC	Amp. Sel./ sec.
Tef1-SelA 918-898 r (d)	TCT TGA TGA AAT CAC GGT GA	Amp. Sel./ sec.
Tef1-SelT 403-452 d (g)	TTC GGT CGC GGG GCT CAG TC	Sec.
Tef1-SelA 403-452 d (g)	TTC GGT CGC GGG GCT CAG TA	Sec.
Tef1-SelT 522-505 r (h)	GAA TGT CAT GTC ATG TC	Sec.
Tef1-SelA 527-501 r (h)	AGA GGT GGG CCA CGC GAA TGT ATG	Sec.
Tef1-exon 4.2 d	ATC GAG AAG TTC GAG AAG GT	Sec.
Tef1-exon 4.2 r	TTG CAG CGA GTG AAC ATC GG	Sec.

a La nomenclatura del cebador describe el gen (*tub2* o *tef1*), región del gen sobre los que hibrida, y orientación (r= reverso, d= directo). En el caso de cebadores utilizados en la amplificación selectiva de las copias del gen y algunos cebadores utilizados sólo en secuenciación, el nombre es seguido por el sufijo "sel" seguido por el nucleótido 3´ y la región en la que hibrida. Finalmente figura la letra que identifica al cebador en la Figura 11.

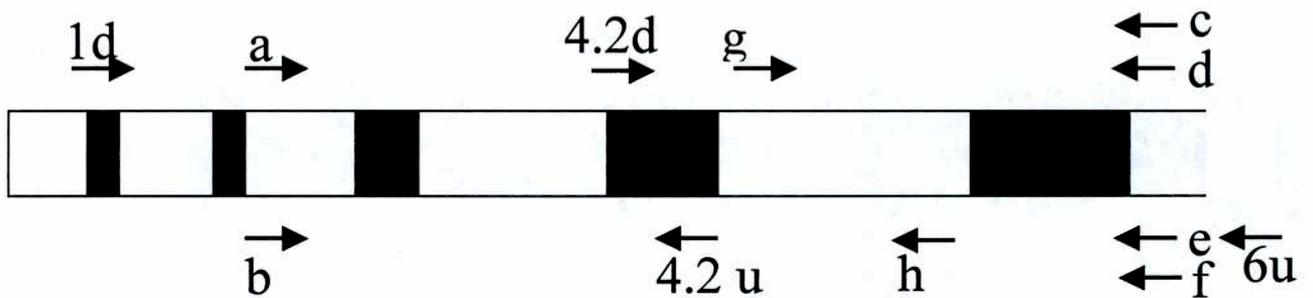
b Amp.= amplificación por PCR, Sec.= secuenciación del ADN, y Amp. Sel.= amplificación selectiva.

Figura 11. Esquema que muestra los dos genes analizados en este estudio, *tub2* y *tef1*, y las regiones en las que los cebadores utilizados hibridan. Las cajas blancas y negras indican intrones y regiones codificantes, respectivamente. Las flechas indican los diferentes cebadores y su dirección. Los cebadores denominados con números son aquellos usados en la amplificación y secuenciación interna, mientras que los denominados con letras son aquellos usados para la secuenciación selectiva de las copias. Todos están listados en la Tabla II.

TUB-2



TEF-1



5.8 Secuenciación de ADN

5.8.1 Preparación y cuantificación de los templados

Los productos de PCR se purificaron utilizando el Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, California) siguiendo el protocolo especificado por los fabricantes. La concentración de los productos amplificados fue estimada como se indicó en el ítem 5.6.

5.8.2 Reacción de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el kit CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman-Coulter, Inc., USA). Fueron secuenciadas ambas hebras del ADN usando los cebadores de la amplificación y cebadores selectivos de secuenciación que se unen a regiones internas de los productos amplificados (Tabla II y Figura 11). Los productos fueron secuenciados por electroforesis en un secuenciador automático CEQ8000 Genetic Analyzer (Beckman-Coulter) y las secuencias obtenidas se analizaron usando CEQ2000 DNA Analysis Software. Utilizando las secuencias obtenidas a partir de los distintos cebadores de la amplificación selectiva de cada copia, se generaron secuencias consenso que fueron creadas por medio del programa BioEdit (T.A. Hall. Software., versión 5.0.9.1).

5.8.3 Híbridos y generación de cebadores selectivos

La obtención de dos productos en una misma reacción de secuenciación fue visualizada por la presencia, en el cromatograma, de 2 picos correspondientes a distintos nucleótidos (visualizado con distintos colores) en una misma posición nucleotídica. Estos productos corresponden a los distintos haplotipos.

Dado que los haplotipos se diferenciaban en más de una posición, se generaron dos cebadores selectivos para separar cada uno, con diferente nucleótido en el extremo 3' final. Los dos productos de amplificación fueron posteriormente secuenciados sin ambigüedades.

Todas las secuencias obtenidas en este trabajo se obtuvieron durante una estancia en el laboratorio del Dr. Christopher L. Schardl, de la University of Kentucky, Kentucky, USA, utilizando los equipos que se detallan en el ítem 5.8.2.

5.9 Análisis de secuencias y filogenéticos

En todos los casos las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX (Thompson et al., 1997). En el caso de presentarse ambigüedades en el alineamiento resultante, fueron chequeadas a ojo y corregidas. Los gaps fueron tratados como información faltante. Las distancias genéticas entre secuencias y la composición de bases se calcularon utilizando el programa PAUP 4.0 beta 10 (Swofford, 1998), así como el estadístico

g1 (Hillis y Huelsenbeck 1992). La construcción de árboles filogenéticos de MP, NJ y MV fue realizada utilizando también el programa PAUP 4.0 y la visualización e impresión de los árboles filogenéticos se realizó con el programa TREEVIEW 1.6.6 (Page 1996).

Para la obtención de los árboles de MP se utilizó una matriz de caracteres no pesados ni ordenados. Se realizó una búsqueda heurística de 10 réplicas con orden de adición de las secuencias aleatoria. El soporte de cada clado fue realizado por medio del análisis de bootstrap con 500 réplicas.

Los árboles de MV se construyeron siguiendo el modelo **GTR, G e I** de evolución nucleotídica (ver ítem 2.8.3 de la introducción), cuyos parámetros fueron estimados con el programa Modeltest 3.06 (Posada y Crandall, 1998). Utilizando el mismo programa se estimaron los valores de la proporción de sitios invariantes (I) y la distribución gamma (G).

Se construyeron árboles de distancias con el algoritmo NJ, utilizando también el modelo **GTR, G e I**. El análisis de soporte por *bootstrap* se realizó con 1000 pseudoreplicas.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Detección de endofitos en el material vegetal

Tanto in situ como en el laboratorio no se registraron formas teleomórficas en las estructuras aéreas de las plantas examinadas. Los endofitos de *Bromus setifolius* y *Festuca superba* se observaron como delgadas hifas endofíticas, intercelulares, paralelas al eje longitudinal de la planta, en el parénquima del hospedante. Se visualizaron mediante la tinción con azul de anilina (White et al., 1995).

6.2 Aislamiento e identificación de los endofitos

Se aislaron a partir de semillas o trozos de cañas y vainas de las gramíneas listadas en la Tabla I (ver materiales y métodos). Durante el aislamiento, el micelio fue visible después de un mes de la siembra. Se aislaron varias poblaciones de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz y 2 de *F. superba* de la misma provincia (solamente una de ellas se encuentra en este estudio por inconvenientes en el aislamiento del ADN de la otra). Las colonias puras se obtuvieron por tres sucesivos repiques en APG de un cultivo monospórico.

6.3 Caracterización de los cultivos aislados

El examen micro y macromorfológico de los cultivos permitió ubicar a todas las cepas aisladas como pertenecientes al género *Neotyphodium*, que es restrictivo a aquellos endofitos relacionados morfológica y genéticamente con especies del género *Epichloë*, pero con ausencia de la fase sexual (Glenn et al., 1996). Durante los aislamientos a partir de cuatro plantas de *Melica stuckertii* de Córdoba y de semillas de una población de la Pampa de *Bromus auleticus*, encontramos aislamientos correspondientes al género *Acremonium* y por lo tanto fueron descartados de este estudio. Se aislaron y guardaron para posibles estudios futuros.

En la tabla III se muestran los resultados del crecimiento de las colonias a los 7, 14 y 21 días. Cada valor corresponde al promedio de 4 réplicas para cada cepa, sembradas de manera simultánea en la misma caja, para evitar distorsiones y diferencias de las distintas cajas de petri, temperatura, medio agarizado, etc. También se analizaron la producción y el largo y morfología de los conidios y de las fiálides (Figuras 12 a 24).

Los resultados nos señalan que existen diferencias entre los aislamientos. Una colonia con características particulares (Tabla III y Figura 12) es la del endofito de *Bromus auleticus* 308 (Ba308), cuyo crecimiento fue muy lento, alcanzando sólo 6.75 x 7.75 mm al cabo de 21 días desde la siembra en medio agarizado. Otras dos cepas, que presentan el crecimiento más rápido de todas las analizadas, (*Poa rigidifolia* 219 (Pr219)(Santa Cruz) y

642 (Pr642)(Tierra del Fuego), mostraron abundante micelio aéreo y color levemente amarillento, una característica que las diferencia de las demás (no se ilustran). Las otras tres cepas de crecimiento rápido (marcadas con color azul en la tabla), corresponden a los tres únicos aislamientos de endofitos que son, aparentemente, no híbridos (*Bromus setifolius* 420, 508 y 719) (ver 6.4.1)(Figuras 14 y 15). El resto de los aislamientos presentan tasas de crecimiento muy similares entre ellos, medianamente rápidas, no exhibiendo diferencias apreciables.

La morfología de la colonia del tipo de *N. tembladerae* aislado a partir de *Poa huecu*, fue consistente con su descripción taxonómica (Figura 23)(Cabral et al., 1999). Entre los aislamientos de *Bromus setifolius* hay cuatro cepas que son muy similares a la descripción de *N. tembladerae* (Figura 14, 15 y 16: Bs420, Bs508, Bs532 y Bs719), como así también los aislamientos de *Festuca magellanica* 353 (Fm353)(Figura 19), *Melica stuckertii* 803 (Ms803)(Figura 21) y *Poa rigidifolia* 198 (Pr198)(Figura 24). Sin embargo, contamos con otros aislamientos que presentan pequeñas diferencias con *N. tembladerae*. Este es el caso de *Festuca magellanica* 351 (Fm351), *Bromus setifolius* 649 (Bs649), *Poa rigidifolia* 345 (Pr345), *Festuca superba* 347 (Fsu347), *Festuca superba* 349 (Fsu349) (Figura 20), *Bromus auleticus* 355 (Ba355)(Figura 13) y *Bromus auleticus* 417 (Ba417), donde la colonia también es blanca pero de crecimiento un poco más lento y sin la presencia de abundante micelio aéreo. Tienen un aspecto cerebroide y ceroso. Otro aislamiento diferente fue el de *Phleum commutatum* 682 (Phc682)(Figura 22), que presentó una colonia amarillenta con bordes irregulares y con cristales en su superficie.

El color del reverso de las colonias, varía desde castaño claro, en la mayoría de los aislamientos, a castaño grisáceo en los aislamientos de *Phleum*. En ningún caso se observó la difusión de pigmentos al medio de cultivo.

En cuanto a la producción de conidios, ningún aislamiento resultó estéril, aunque presentaron diferencias en cuanto a la abundancia. En algunos casos se evidenció una producción muy baja, como en las cepas *Bromus setifolius* 420 (Bs420), *Bromus setifolius* 508 (Bs508) y *Bromus setifolius* 719 (Bs719) (Figuras 14 y 15). En otras, como *Melica stuckertii* 803 (Ms803), *Bromus setifolius* 532 (Bs532), *Bromus setifolius* 713 (Bs713) y *Festuca magellanica* 353 (Fm353)(Figuras 21, 17 y 19) la producción de conidios fue abundante. La mayoría de los conidios respeta la morfología descrita para el género *Neotyphodium* (Glenn et al., 1996), variando su morfología desde lunados a reniformes. En algunos casos, la forma tiene características particulares, alargados y delgados (uncinados), como en *Bromus auleticus* 308 (Ba308)(Figura 12) que presenta conidios semejantes a los de *N. uncinatum*, pero que parecen tener una ontogenia conidial y una separación de la célula conidiógena, diferentes a la que se indica en la bibliografía (Iannone 2003).

Los conidios en general presentaron mayor tamaño (6-10 μm de longitud X 3-4 μm) que los indicados para las especies sexuales del género *Epichloë* (4-6 μm).

El largo de las fiálides resultó variable entre los aislamientos. Algunos organismos presentaron fiálides muy largas y delgadas como en *Poa rigidifolia* 642 (Pr642) y *Bromus setifolius* 719 (Bs719). En otros son mas pequeñas y con protuberancias a lo largo, como en *Festuca magellanica* 351 (Fm351) y *Festuca superba* 349 (Fsu349) (Figura 20)

Tabla III. Características morfológicas de los aislamientos provenientes de diez hospedantes nativos de Argentina

Aislamiento a	Especies hospedantes	Tasa promedio de crecimiento en mm b		
		7 días	14 días	21 días
Ba355	<i>Bromus auleticus</i>	3.75 x 4	7.5 x 7.75	10.25 x 10.5
Ba308	<i>Bromus auleticus</i>	3 x 3	5.5 x 5.25	6.75 x 7.75
Ba417	<i>Bromus auleticus</i>	3 x 4.75	6.25 x 6.25	10.5 x 11.75
Ms803	<i>Melica stuckertii</i>	5.5 x 4	11.25 x 11.25	19.5 x 19
Pr345	<i>Poa rigidifolia</i>	3.5 x 3.75	7.75 x 8.75	15.25 x 16.25
Pr641	<i>Poa rigidifolia</i>	4.25 x 5.25	17 x 17	18.25 x 18.75
Pr642	<i>Poa rigidifolia</i>	6.5 x 3.75	18.5 x 16.5	29.5 x 27.25
Pr219	<i>Poa rigidifolia</i>	8.5 x 6.75	18 x 18.75	29.25 x 27.25
Pr198	<i>Poa rigidifolia</i>	5 x 5	13.25 x 13.5	20 x 20.25
Fsu347	<i>Festuca superba</i>	3 x 4	7 x 7.25	10 x 10.75
Fsu349	<i>Festuca superba</i>	5 x 4.25	8.75 x 9	11 x 11.25
Phc682	<i>Phleum commutatum</i>	6.25 x 6	13.5 x 13	19 x 20
Phc755	<i>Phleum commutatum</i>	7.25 x 7	14 x 14	15.75 x 15.75
Bs420	<i>Bromus setifolius</i>	9.25 x 9	16.25 x 17.25	23.75 x 24
Bs532	<i>Bromus setifolius</i>	4.25 x 4.25	11.25 x 11	20.25 x 19.25
Bs713	<i>Bromus setifolius</i>	4.5 x 4.75	9.75 x 9.75	18.25 x 17.75
Bs508	<i>Bromus setifolius</i>	7.5 x 6	18.25 x 17.5	27.75 x 27.5
Bs649	<i>Bromus setifolius</i>	3.75 x 3.5	5.25 x 6.25	8 x 8.5
Bs719	<i>Bromus setifolius</i>	10.5 x 10	21.5 x 21	28 x 27
Fh237	<i>Festuca hieronymi</i>	6.25 x 5.75	13.25 x 14.25	19.25 x 20
Fh344	<i>Festuca hieronymi</i>	5.25 x 5.75	12.25 x 11.75	18.25 x 17.5
Fh734	<i>Festuca hieronymi</i>	5.5 x 4.5	10.25 x 9.75	17.5 x 17.25
Ph1209	<i>Poa huecu</i>	6.75 x 5.5	10 x 8	12.75 x 9.75
Ph1213	<i>Poa huecu</i>	4 x 4.75	8.5 x 8.75	11.25 x 11.5
Fm351	<i>Festuca magellanica</i>	4.25 x 4.5	7.5 x 7.5	9.75 x 10.75
Fm353	<i>Festuca magellanica</i>	3.75 x 4.25	10.5 x 11	16.75 x 17.75
Fm745	<i>Festuca magellanica</i>	4.75 x 5.25	8 x 9	10 x 10.5
Fa1351	<i>Festuca argentina</i>	5.75 x 6	10 x 10.5	13.5 x 13.75

a El nombre del aislamiento corresponde a la abreviatura del nombre del hospedante seguido por el número del BAFC cult.

b Promedio realizado a partir de cuatro réplicas de cada aislamiento a los 7, 14 y 21 días de crecimiento

Figura 12: *Bromus auleticus* 308

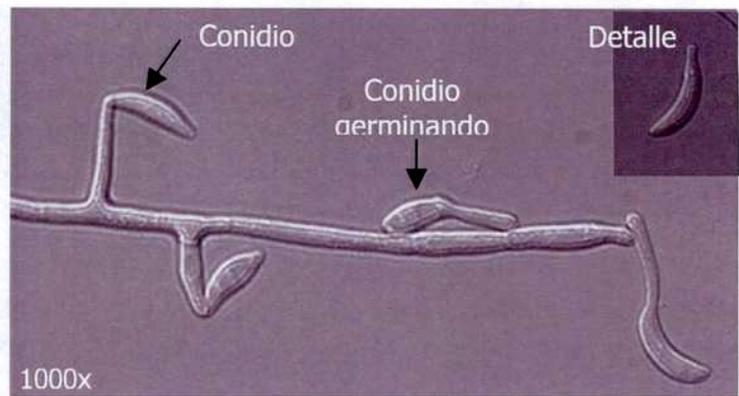


Figura 13: *Bromus auleticus* 355

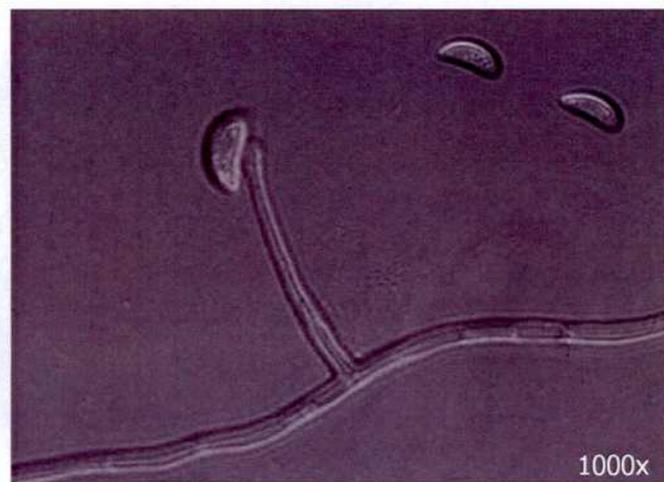


Figura 14: *Bromus setifolius* 420

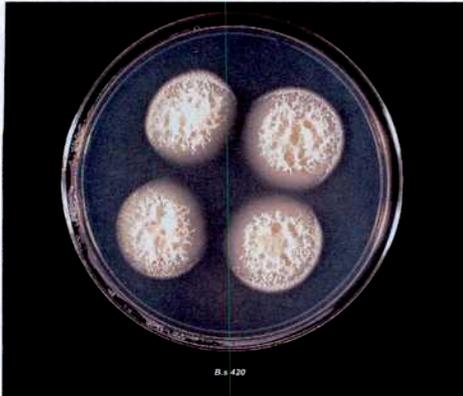


Figura 15: *Bromus setifolius* 508

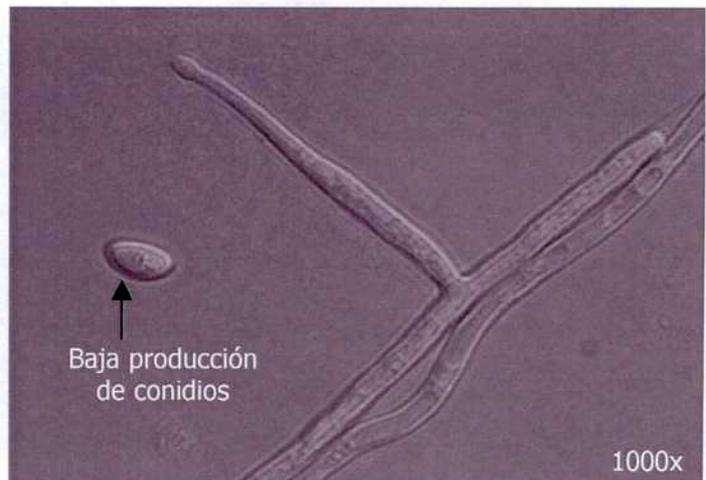
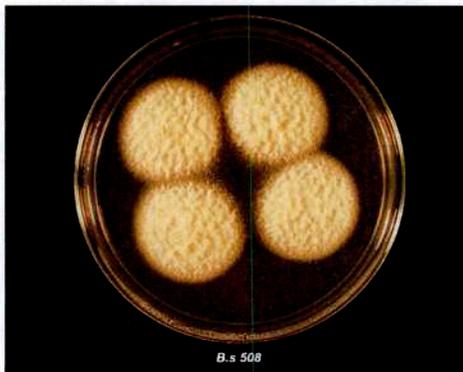


Figura 16: *Bromus setifolius* 532

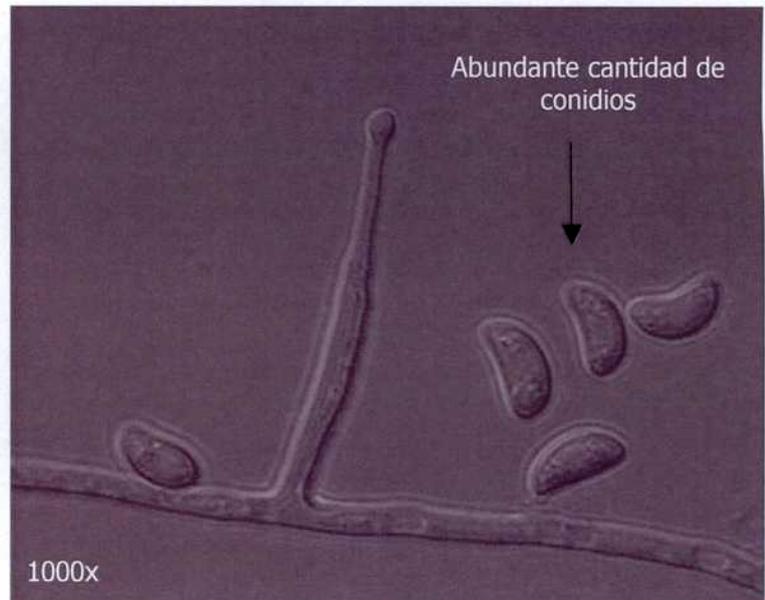


Figura 17: *Bromus setifolius* 713

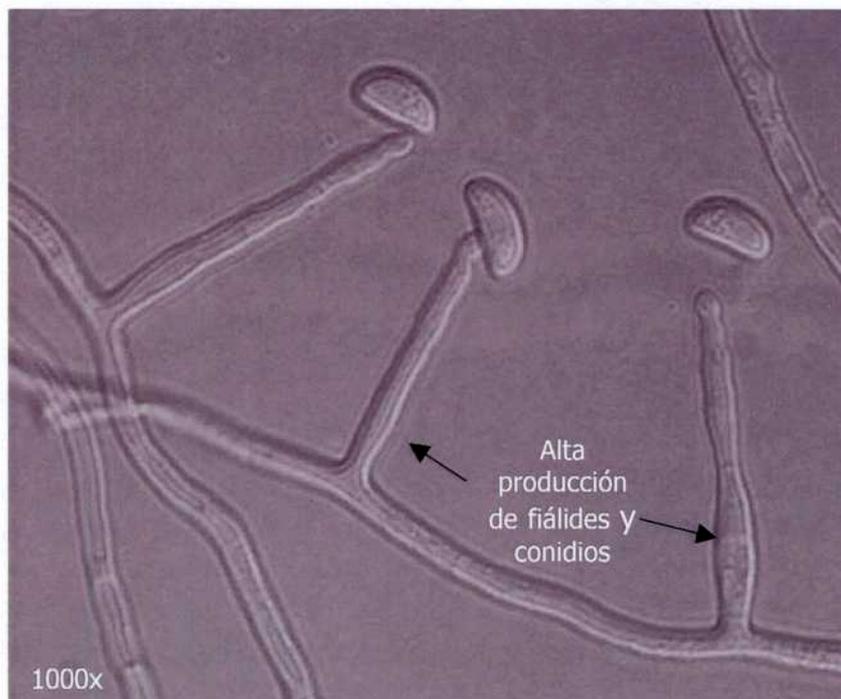


Figura 18: *Festuca hieronymi* 237

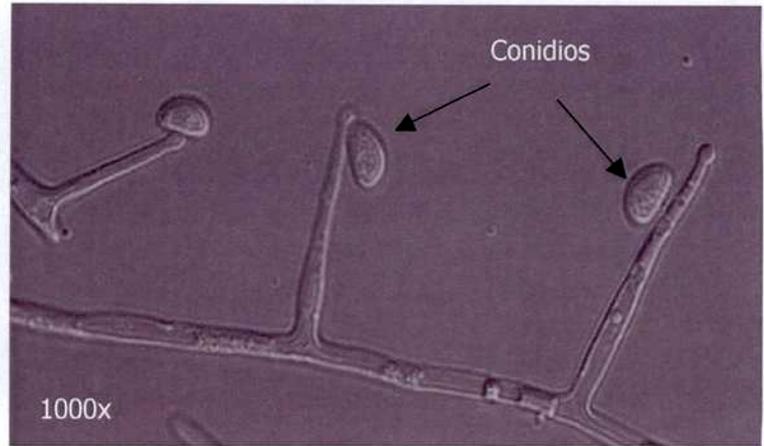


Figura 19: *Festuca magellanica* 353

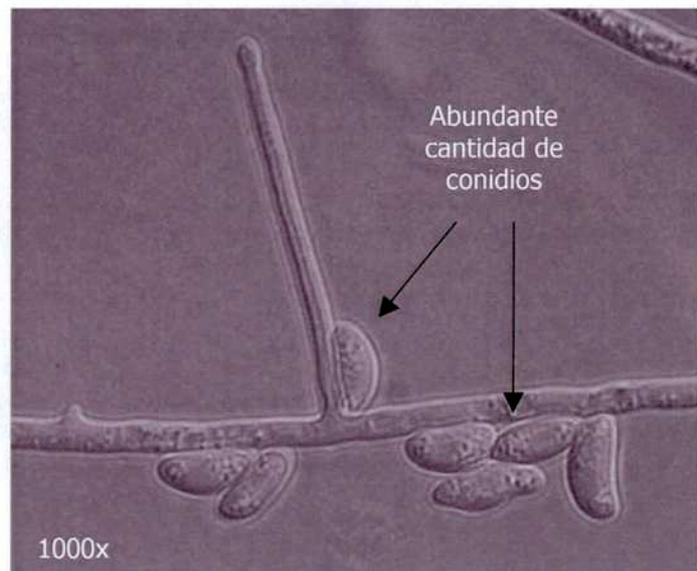


Figura 20: *Festuca superba* 349

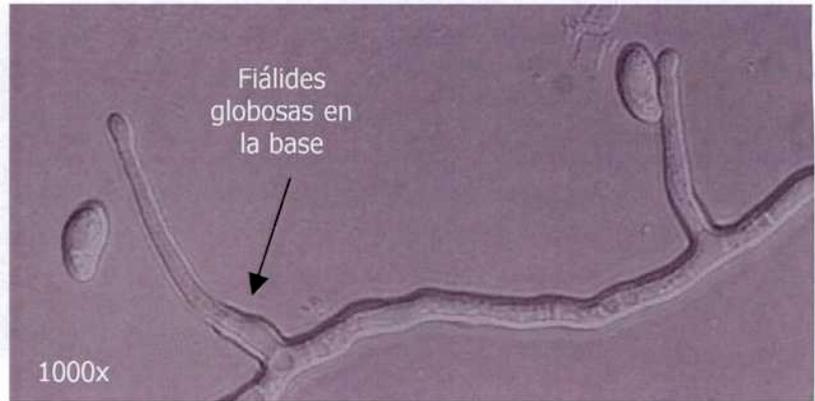


Figura 21: *Melica stuckertii* 803

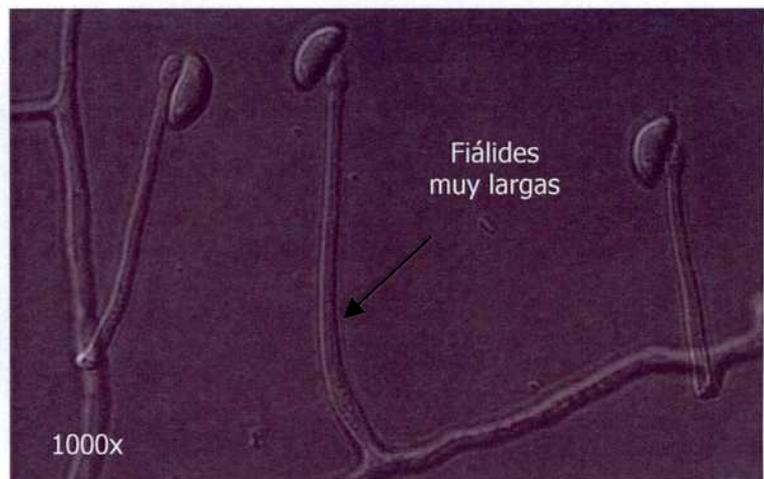


Figura 22: *Phleum commutatum* 682



Figura 23: *Poa huecu* 1213

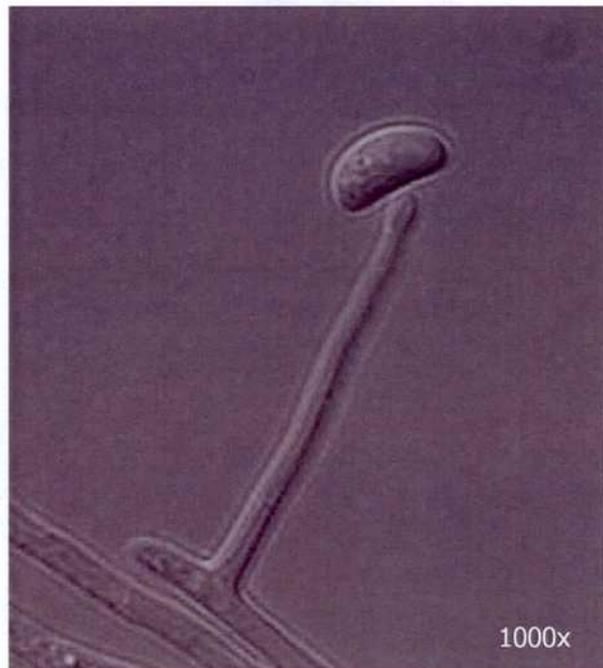
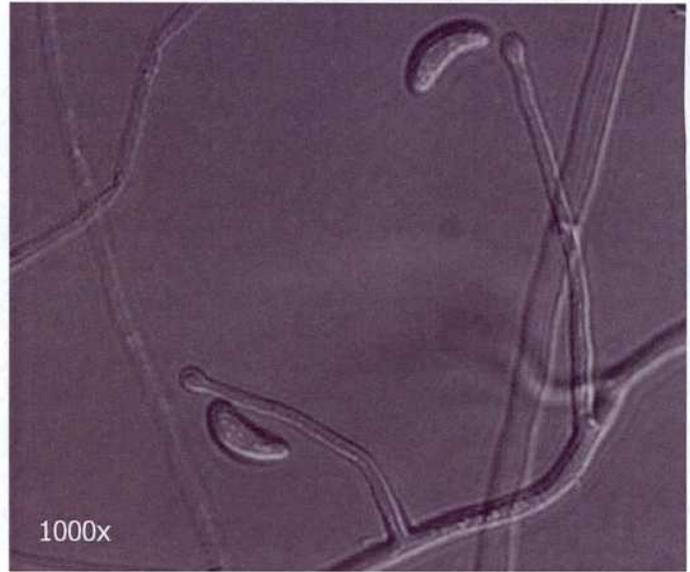
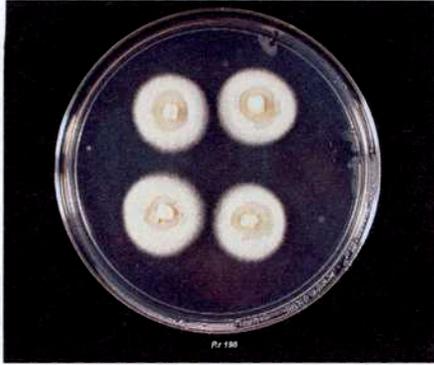


Figura 24: *Poa rigidifolia* 198



6.4 Amplificación y secuenciación de los genes *tub2* y *tef1*

La amplificación por PCR de secuencias parciales de los genes *tub2* y *tef1* utilizando los *primers* 11140 y 1214 (*tub2*) y los 1d y 6u (*tef1*) (ver materiales y métodos, Tabla II), dio como resultado productos del tamaño esperado para los aislamientos del género *Neotyphodium* (Schardl et al., 1997, Moon et al., 2002). La amplificación de la mayoría de los aislamientos dio como resultado la presencia aparente de más de un fragmento de ADN de tamaño similar (Figuras 25 y 26). Dado que, como se mencionó en la introducción (ver ítem 2.3), la hibridación es un fenómeno frecuente en endofitos del hemisferio norte (Schardl et al., 1994, Tsai et al., 1994, Schardl et al., 1997), si ese también fuera el caso de los endofitos que se estudiaron en esta tesis, las diferentes bandas podrían corresponder a haplotipos distintos presentes en el genoma de un mismo organismo híbrido. Cuando esos productos de amplificación fueron secuenciados, estos revelaron la existencia de señal ambigua en varias posiciones, incluyendo sustituciones nucleotídicas e inserciones y deleciones (*indels*) (ver Figura 27b). La presencia de dos o más nucleótidos en una misma posición de la secuencia de un producto de PCR, indica la presencia de más de un templado en dicha mezcla. Estos resultados pueden ser explicados por la existencia de distintos haplotipos en el mismo endofito. Para investigar esta posibilidad, se sometió a cada muestra de ADN a dos amplificaciones de manera independiente usando cebadores (*primers*) selectivos y específicos (ver materiales y métodos, Tabla II) y luego fueron secuenciadas (Figuras 27 a y b).

6.4.1 Identificación de los organismos híbridos

La mayoría de los haplotipos se distribuyeron en dos grupos principales, uno asociado con *Epichloë festucae* (haplotipo 1), y el otro con *E. typhina* (haplotipo 2). Los organismos que presentaron más de dos haplotipos diferentes para alguno o ambos de los genes, serían el resultado de eventos de hibridación. Todos los aislamientos híbridos contaron con un haplotipo en el clado *typhina* y todos, excepto 4 aislamientos, contaron con un haplotipo en el clado *festucae*. Aquellos que no contaban con este último haplotipo fueron los aislamientos provenientes del hospedante *Bromus setifolius* de tres poblaciones de la provincia de Santa Cruz (Bs420, Bs508 y Bs719), y el aislamiento proveniente de *Phleum commutatum* 682 (Phc682). Este último resultó ser un organismo híbrido pero con haplotipos diferentes (ver 6.6.1).

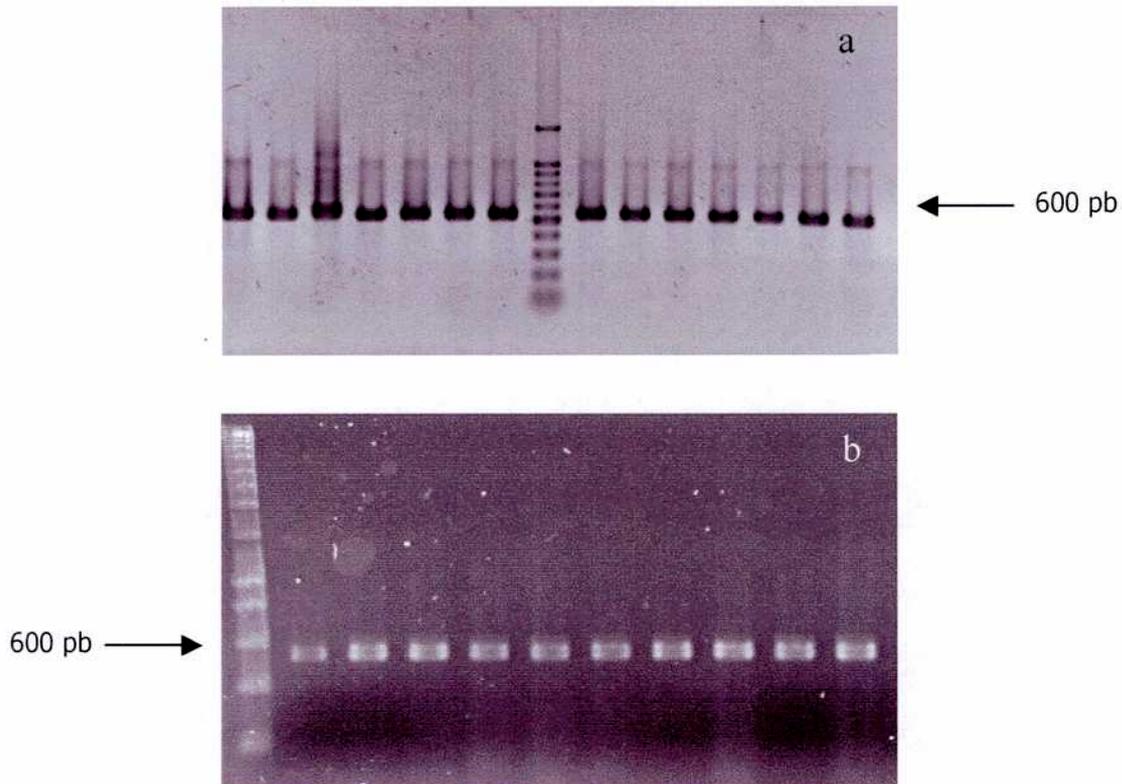


Figura 25: a) Amplificación del gen *tub2*, utilizando los primers 11140 y 1214 (Materiales y métodos, Tabla II) en cepas de diferentes hospedantes argentinos, como por ejemplo *Poa huecu* y *Festuca magellanica*. Aparentemente se visualiza una banda. Marcador de peso molecular: Escalera 100pb. b) Idem a, también del gen *tub2*. Se observan dos bandas de alrededor de 600 pb.

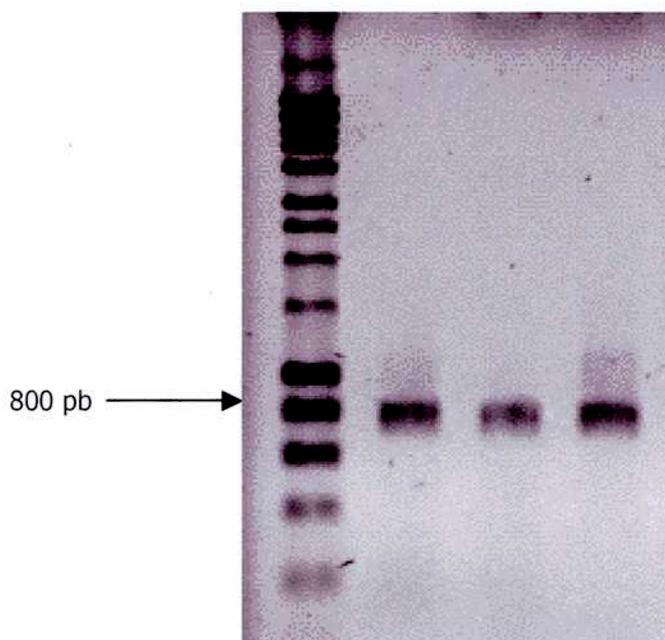


Figura 26: Amplificación del gen *tef1*, utilizando los primers 1d y 6u (Materiales y métodos, Tabla II) en cepas de diferentes hospedantes argentinos. Marcador de peso molecular: Escalera 100 pb. Se observa una banda de alrededor de 800 pb.

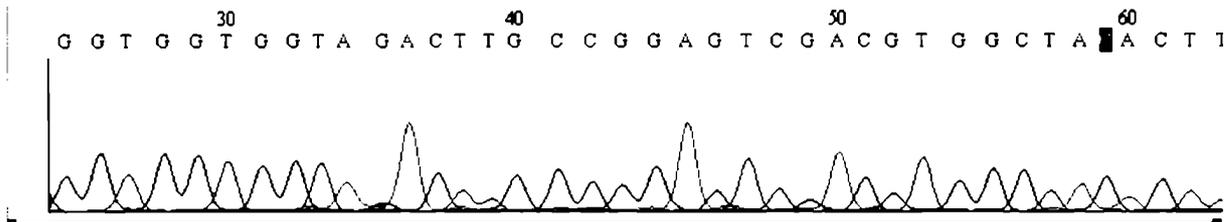


Figura 27a: Cromatograma obtenido de la salida del secuenciador automático de una cepa (*Bromus setifolius* 420 = Bs420) sin ambigüedades nucleotídicas (no híbrida). En todas las posiciones se observa señal correspondiente a una sola base.

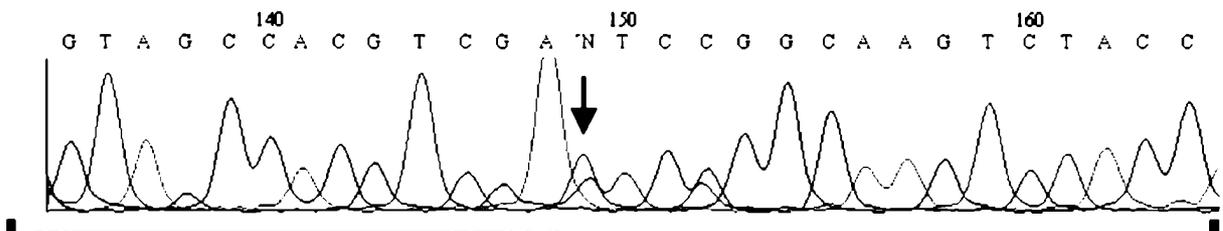


Figura 27b: Cromatograma que muestra una cepa (Ms803) que presenta el sitio 149 ambiguo, donde se superponen las señales correspondientes a T y C.

6.5 Filogenia molecular

6.5.1 Variabilidad a nivel nucleotídico de ambos genes

Con el objetivo de dilucidar la genética y la evolución de los endofitos de gramíneas nativas, se estudiaron las relaciones filogenéticas entre los mismos utilizando las secuencias parciales obtenidas de los genes β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*).

El estudio involucra secuencias previamente obtenidas por Schardl et al. (1997), Craven et al. (2001a) y de Moon et al. (2002) que corresponden a endofitos sexuales y asexuales aislados de gramíneas de ambos hemisferios; y secuencias obtenidas de aislamientos de gramíneas nativas de Argentina (este estudio). Se estudiaron un total de 27 cepas de endofitos, de los cuales se obtuvieron 55 haplotipos provenientes de 21 cepas para el gen *tub2* y 41 haplotipos obtenidos de 15 aislamientos para *tef1*. La longitud de las secuencias para *tub2* fue de 560 pares de bases y para el gen *tef1* fue de 860 pares de bases.

Se utilizó el método de Hillis y Huelsenbeck (1992) para evaluar si la matriz de datos contenía señal filogenética o si por el contrario, los caracteres se distribuían en forma

aleatoria. El estadístico g_1 se calculó a partir de 10000 árboles aleatorios y para *tef1* se obtuvo un valor de -0.329872 , resultando significativo ($p > 0.01$) e indicando que la matriz contiene señal filogenética. En el caso de *tub2*, el valor de g_1 fue de -0.160408 , llegando a la misma conclusión. El test de g_1 fue realizado varias veces y su valor permaneció significativo, aún incluyendo taxones que presentaron secuencia idéntica.

6.6 Análisis filogenéticos

Los distintos métodos (máxima parsimonia, *neighbour-joining* y máxima verosimilitud), arrojaron relaciones filogenéticas coincidentes para muchos de los aislamientos analizados. Algunos resultaron más resolutivos que otros, aunque en general todos los métodos dieron como resultado topologías congruentes.

Dado que existen discusiones acerca de cuál es el mejor criterio de análisis filogenético para evaluar las relaciones evolutivas entre las *otus*, consideraremos más confiables a aquellas topologías que están representadas en la mayoría de los métodos. Aquellas topologías encontradas sólo en uno de los métodos serán analizadas con precaución y se necesitará algún otro enfoque para corroborarla.

En términos generales MV y NJ generaron topologías muy similares (Figuras 28-29 y 30-31) manteniendo los dos grandes clados (*festucae* y *typhina*) bastante conservados en ambos árboles. Con los árboles de MP, sin embargo, no tuvimos los resultados esperados; el análisis de *bootstrap* dio por resultado varias politomías; es decir, una muy pobre resolución de la relación entre los organismos.

Para no crear confusiones entre los endofitos y sus hospedantes hemos denominado a los grupos definidos a partir de los nodos de las topologías de una manera diferente, así es posible distinguirlos y facilitar la comparación entre las topologías de los métodos de NJ y MV. Los nombres de los clados y los miembros de cada uno se detallan en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Clados recuperados por el análisis de MV para el gen *tef1* (Figura 29). Las abreviaturas de los integrantes se encuentran en la Tabla I (materiales y métodos).

CLADO	INTEGRANTES
Clado typhina	Phc682, Fsu349, Fsu347, Etyp667, Bs532, Bs713, Fm353, Nte1169, Ba355, Ms 803, Ph1213, Pr198, Fh734, Bs420, Bs508, Bs719, Pr642, Pr345, Pr219, Bs308, Etyp669, Naust937
Clado festucae	Ms803, Pr198, Fm353, Ba355, Bs713, Fh734, Bs532, Fsu349, Nte1169, Ph1213, Pr642, Fsu347, Pr345, Ba308, Pr219, Naust937, Efest032 y Efest90660
Subclado tembladerae	Ms803, Pr198, Fm353, Ba355, Bs713, Fh734, Bs532, Fsu349, Nte1169, Ph1213, Phc682, Fsu349, Fsu347, Etyp667, Bs532, Bs713, Fm353, Nte1169, Ba355, Ms803, Ph1213, Pr198, Fh734
Clado amarillans	Phc682, Eamar743, Eamar744

Tabla 5. Clados recuperados por el análisis de MV para el gen *tub2* (Figura 28). Las abreviaturas de los integrantes se encuentran en la Tabla I (materiales y métodos).

CLADO	INTEGRANTES
Clado typhina	Idem anterior más: Pr641, Fm745, Fh344, Fh737, Fm351, Bs649, Ph2267, Fa2203, Phc755
Clado festucae	Idem anterior más: Pr641, Fm745, Fh344, Fh737, Fm351, Bs649, Ph2267, Fa2203, Phc755
Subclado tembladerae	Idem anterior más: Pr641, Fm745, Fh344, Fh737, Fm351, Bs649, Ph2267, Fa2203, Phc755, Pr641, Fm745, Fh344, Fh737, Fm351, Bs649, Ph2267, Fa2203, Phc755
Clado baconii I	Phc682, Eba745
Clado baconii II	Eba76552, NocLrr11

6.6.1 Análisis de máxima verosimilitud (MV)

Dado que el análisis de MV es sumamente intensivo en cuanto a los requerimientos computacionales, se seleccionaron para cada gen, al menos un representante de cada hospedante, eliminándose las secuencias idénticas. De esa manera la matriz se redujo de 27 a 21 taxones en *tub2*, y de 24 a 15 taxones en *tef1*.

Para determinar cuál es el modelo de evolución que mejor representa los datos, se utilizó el Modeltest 3.06 (Posada y Crandall, 1998). El modelo seleccionado por este programa fue el **GTR**, **G** e **I**, *general time reversible* (es decir 6 parámetros) además del parámetro *gamma* (parámetro de la distribución G) e I (proporción de sitios invariantes). Los valores estimados de los parámetros fueron:

Frecuencias bases *tub2* = **A**: 0.260767, **C**: 0.262609, **G**: 0.242263, **T**: 0.234361
proporción de sitios invariantes en *tub2* (**I**)= 0.356553
parámetro de distribución **G** en *tub2* = 0.789502

Frecuencias bases *tef1* = **A**: 0.244692, **C**: 0.261947, **G**: 0.222565, **T**: 0.270796
proporción de sitios invariantes en *tef1* (**I**)= 0.381605
parámetro de distribución **G** en *tef1* = 4.242062

El análisis de MV se llevó a cabo empleando la versión beta del programa PAUP 4.0 (Swofford 1998) especificando modelo y valores resultantes del Modeltest (Posada y Crandall, 1998). No fue utilizada la técnica de *bootstrap* en este análisis ya que resulta inmanejable por los tiempos requeridos. Los valores de *bootstrap* presentes en ambos árboles fueron obtenidos a partir de árboles de MP y corresponden a valores superiores al 50%.

En las figuras 28 y 29 se muestran los dos árboles obtenidos por el método de MV para los dos genes.

El endofito *N. tembladeraae*, aislado de *Festuca hieronymi*, *Poa huecu* y *Festuca argentina*, resultó ser un híbrido derivado de dos endofitos sexuales, en concordancia con lo reportado por Moon y colaboradores (2002). Los aislamientos de *Bromus setifolius* 420, 508 y 719 resultaron aparentemente no híbridos, ya que solamente estaba presente una copia de los genes *tub2* y *tef1*. Todo el resto de los aislamientos de endofitos nativos resultó híbrido para ambos genes aunque no todos tienen los mismos haplotipos, es decir, los mismos ancestros.

Ambos árboles mostraron topologías congruentes en la asociación de los taxones en tres clados principales (Figuras 28 y 29). El clado festucae incluye todas los haplotipos

derivados de la forma sexual *E. festucae* (haplotipo 1), con la excepción de los endofitos no híbridos y del aislamiento Phc682. El segundo clado contiene todos los haplotipos derivados de *E. typhina* (clado typhina, haplotipo 2). La topología de los árboles de los haplotipos es compatible con un origen híbrido para los organismos que cuentan con dos haplotipos. Sin embargo, también podría ser válido para aquellos que presentan un solo haplotipo, ya que pudieron haberlo obtenido a partir de parentales idénticos o muy similares.

Por otro lado, es interesante notar que existe una diferencia sustancial entre ambos haplotipos en cuanto a la variabilidad nucleotídica tanto en *tub2* como así también en *tef1*. Mientras que las copias del haplotipo I derivadas de *E. festucae* muestran baja variabilidad, el haplotipo 2 derivado de *E. typhina*, demuestra niveles mayores de variabilidad. Además, como puede observarse en el árbol de *tef1* (Figura 29), la resolución de las relaciones entre los haplotipos 2 es mayor para *tef1* que para el mismo clado en el árbol basado en *tub2* (Figura 28). Este hecho probablemente es el reflejo de mayores niveles de variabilidad nucleotídica en *tef1* en comparación con *tub2*. En el árbol de *tub2*, por ejemplo, es posible distinguir un subclado, dentro del clado typhina, que denominaremos subclado tembladerae (Figura 28, Tabla 5).

El tercer clado que se evidencia en el árbol de *tef1* (Figura 29), es denominado clado amarillans, e incluye uno de los haplotipos presentes en el aislamiento de *Phleum* 682 (Phc682) y los aislamientos que representan a la especie sexual desde donde podría haberse originado, *E. amarillans*. El otro haplotipo de *tef1* está incluido en el clado typhina. En contraposición, en el árbol basado en secuencias de *tub2* (Figura 28), mientras que una de los haplotipos también es derivado de *E. typhina*, el otro haplotipo deriva de *E. baconii*.

Los endofitos sexuales y asexuales del hemisferio norte se dividieron en dos clados en ambos árboles, como fue previamente reportado (Moon et al., 2002). *Neotyphodium uncinatum* (Nu 167) se agrupa en uno de los clados del hemisferio norte en *tef1* mientras que en *tub2* esta relacionado con el clado typhina (Craven et al., 2001a).

Una de las cepas aisladas de hospedantes del hemisferio sur, *N. australiense*, se agrupa con los aislamientos argentinos dentro de los clados typhina y festucae en ambos árboles de MV, compartiendo los mismos ancestros.

Los clados encontrados en los análisis de MV fueron los mismos obtenidos en NJ y MP.

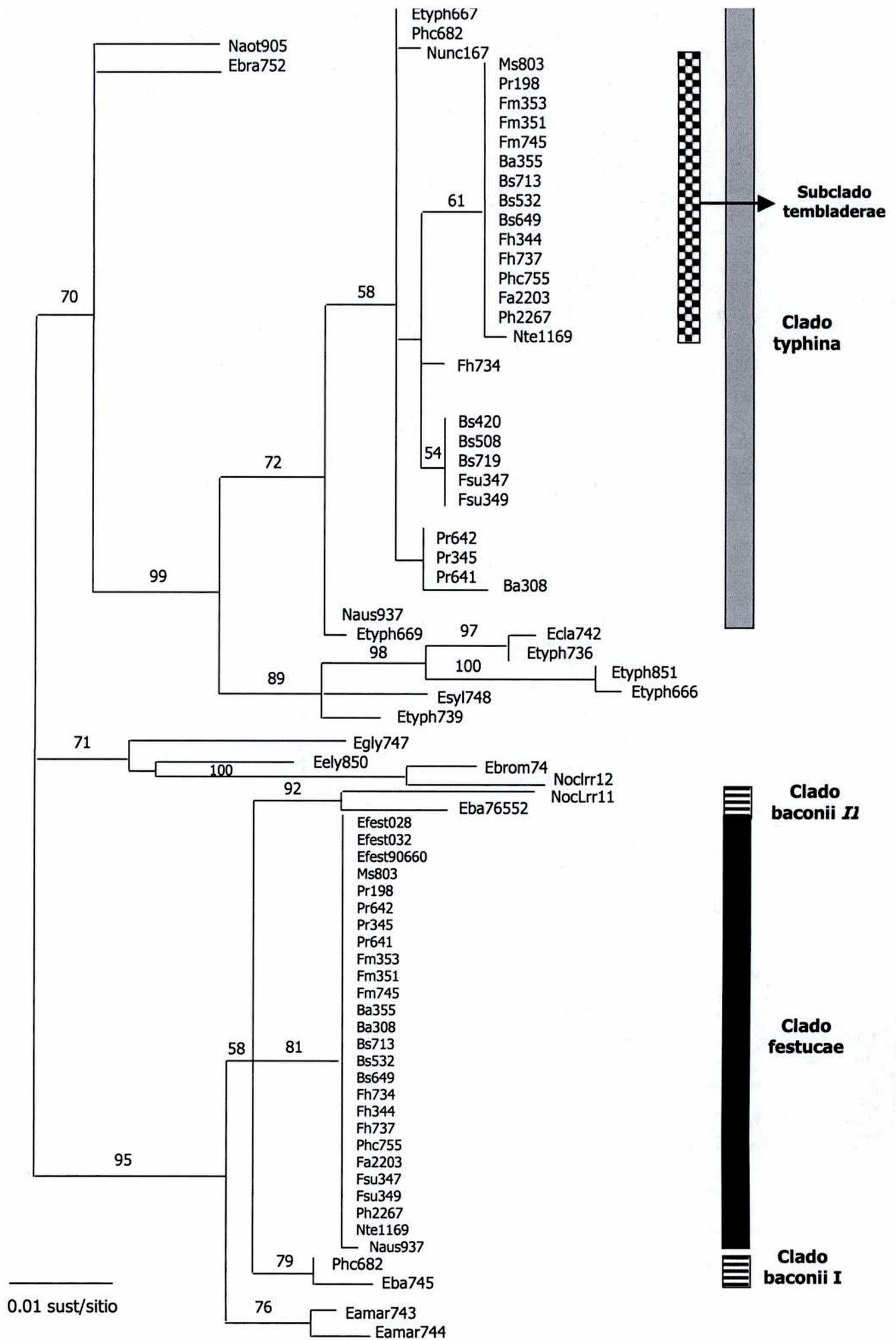


Figura 28: Árbol de máxima verosimilitud (MV) para el gen *tub2* generado usando PAUP 4.0 (Swofford 1998). Los valores de *bootstrap* corresponden a los obtenidos en los árboles de MP.

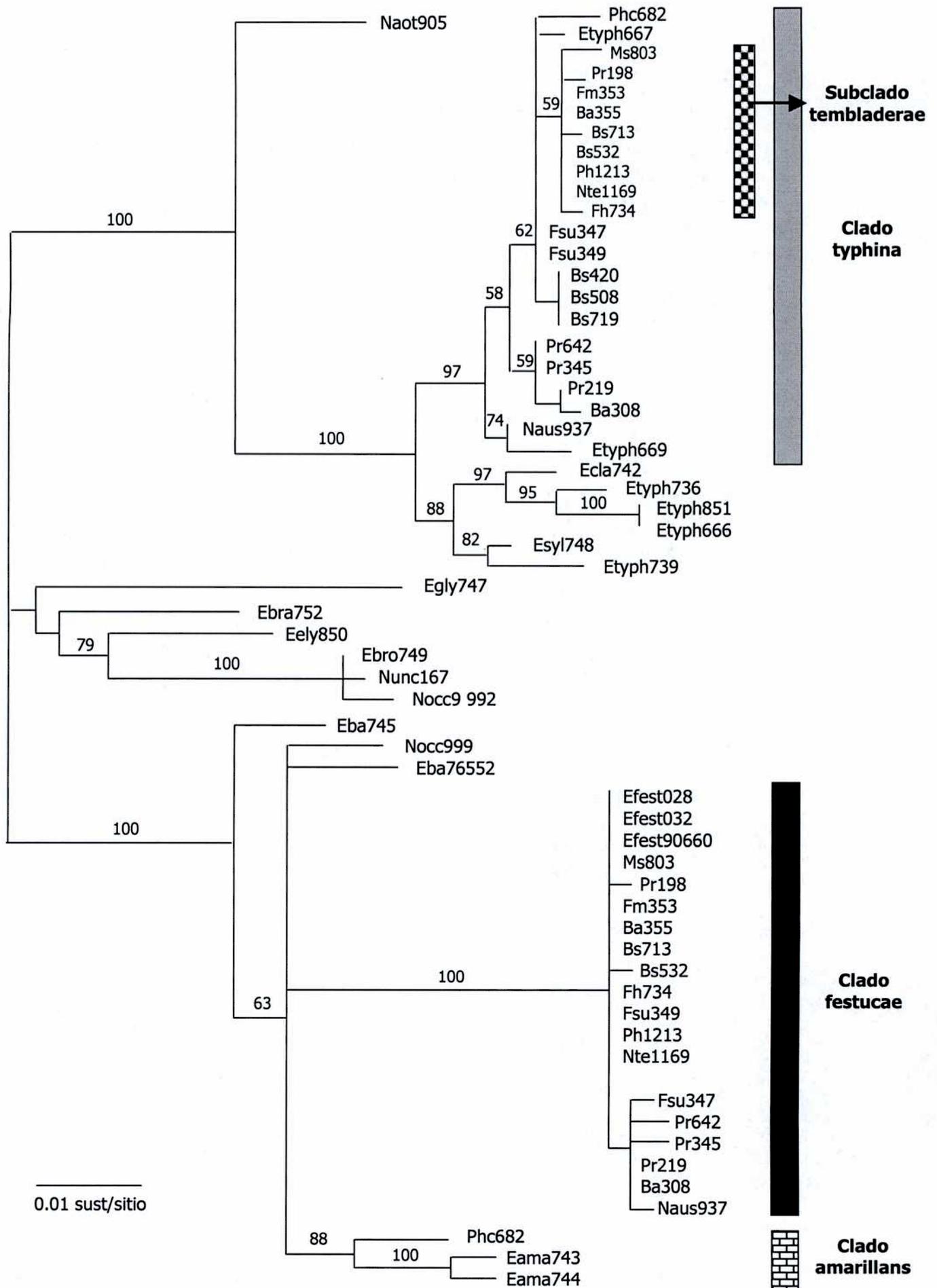


Figura 29: Árbol de máxima verosimilitud (MV) para el gen *tef1* generado usando PAUP 4.0 (Swofford 1998). Los valores de *bootstrap* corresponden a los obtenidos en los árboles de MP.

6.6.2 Método de distancia: *Neighbour-joining*

Para generar la matriz de distancias necesaria para la construcción del árbol, los parámetros y el modelo de evolución utilizados fueron los que obtuvimos mediante el programa Modeltest (Posada y Crandall, 1998). Como se indicó anteriormente (ítem 6.6.1), el modelo de evolución seleccionado fue el **GTR, G e I**.

Las figuras 30 y 31 muestran los árboles obtenidos para *tub2* y *tef1* respectivamente. En general, las topologías de los árboles de NJ resultaron concordantes con los obtenidos en MV. Como podemos observar los tres clados ya mencionados están también bien definidos en los árboles de NJ: el clado typhina, el clado festucae y el clado baconii ó amarillans dependiendo si el gen analizado es *tub2* o *tef1*. Además en el árbol del gen *tub2* (Figura 30), también es posible observar el subclado tembladeraae, incluido en el clado typhina. También es posible distinguir que en ambos árboles, los endofitos provenientes de gramíneas del hemisferio norte quedan separados de los endofitos argentinos. Los aislamientos del hemisferio norte se distribuyen en dos clados bien definidos.

El análisis de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas) mostró que, en el caso del gen *tub2* el clado baconii I tiene un soporte de *bootstrap* del 87% (Figura 30), mientras que en el clado amarillans del árbol de *tef1*, tiene un valor de *bootstrap* del 55% (Figura 31). Tanto el clado festucae como el clado typhina tienen un alto valor de *bootstrap* en ambos genes, siendo de 83% y 81% para *tub2* y 100% y 85% para *tef1*, respectivamente. Dentro de estos dos clados, las relaciones entre los miembros no está bien resuelta, dando origen a una politomía dentro de los mismos. El clado festucae es menos variable que el typhina, y es por ello que dentro de este último las relaciones están más resueltas.

Es interesante la congruencia existente entre las topologías resultantes de estos dos genes, tanto en los árboles de MV como en NJ. La única diferencia entre los árboles de los dos genes, es para la secuencia del aislamiento de *Phleum* 682 donde se asocia al clado baconii I en el árbol basado en *tub2* (Figuras 28 y 30), mientras que en *tef1* (Figuras 29 y 31), se incluye en clado amarillans.

Los endofitos que resultaron ser aparentemente no híbridos (Bs420, Bs508 y Bs719), que contienen sólo una copia de cada gen, se separaron en un subgrupo dentro del clado typhina en el gen *tef1* con un soporte de bootstrap del 54% y en el gen *tub2* también se separaron aunque se sumaron dos aislamientos de *Festuca superba*.

Para ambos genes, los aislamientos provenientes de tres *Poa rigidifolia* (Pr345, Pr642 y Pr641) se separan dentro del clado typhina en un subgrupo con soporte estadístico aceptable en ambos genes. En el caso del gen *tef1* estos aislamientos derivan del mismo nodo que el aislamiento de *Bromus auleticus* 308 (Figura 31).

Con el aislamiento de *N. uncinatum* (Nun167) ocurrió lo mismo que en los árboles de MV, asociándose a dos clados diferentes en cada gen (Craven et al., 2001a). En uno asociado al clado typhina y en el otro asociado al grupo de endofitos del hemisferio norte.

El aislamiento de *N. australiense*, se incluye con los aislamientos argentinos dentro de los clados typhina y festucae en ambos árboles de NJ, al igual que en MV, es decir, comparten los mismos ancestros.

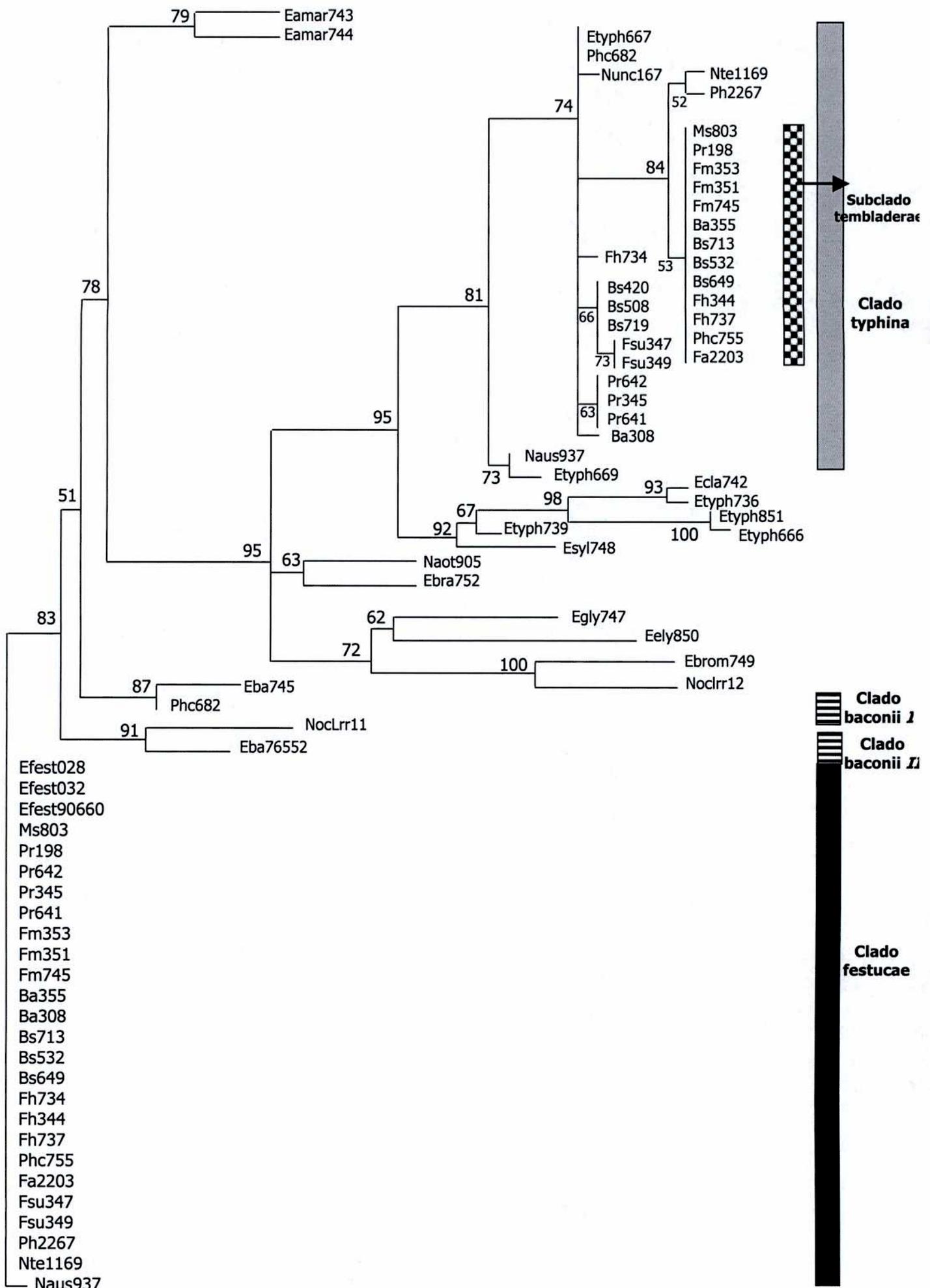


Figura 30: Arbol de *Neighbour-joining* del gen *tub2*. Los valores sobre los nodos representan los valores de *bootstrap* realizado sobre 1000 pseudoréplicas, con el modelo de GTR+G+I, e indican porcentajes. Sólo los valores mayores a 50% se muestran. Los valores menores se colapsan dando politomías.

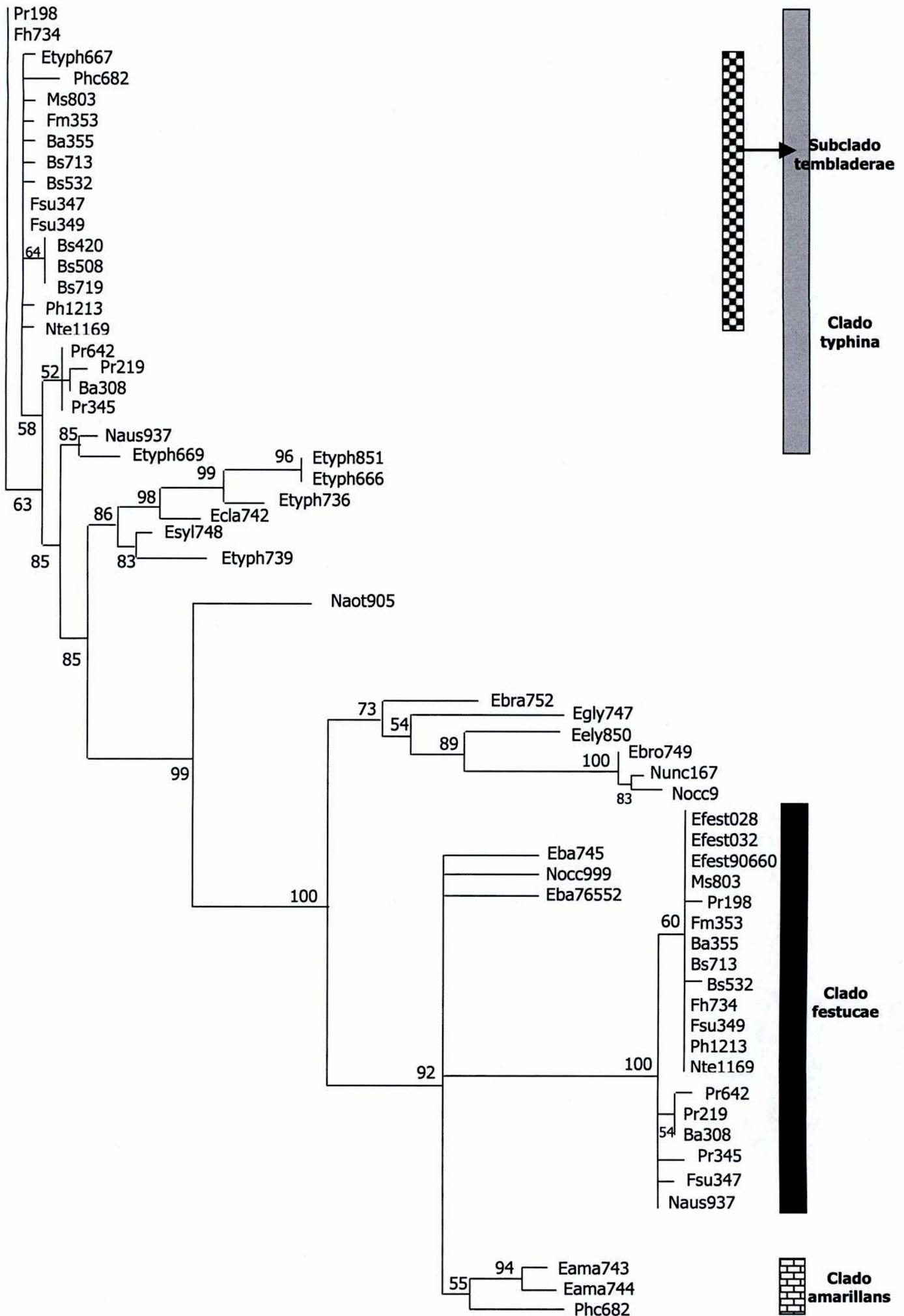


Figura 31: Árbol de *Neighbour-joining* del gen *tef1*. Los valores sobre los nodos representan los valores de *bootstrap* realizado sobre 1000 pseudoréplicas, con el modelo de GTR+G+I, e indican porcentajes. Sólo los valores mayores a 50% se muestran. Los valores menores se colapsan dando politomías.

6.6.3 Método de Máxima Parsimonia (MP)

Los análisis filogenéticos de máxima parsimonia (MP) se llevaron a cabo utilizando el programa PAUP 4.0 (Swofford 1998). Se eliminaron del análisis aquellas secuencias que eran exactamente iguales, dejando al menos las secuencias de 2 cepas de cada hospedante. Para el gen *tub2*, del total de posiciones que presentaban variación entre secuencias, 63 resultaron informativas según el criterio de parsimonia, donde cada variante está al menos representada en 2 secuencias (Felsenstein 1993), y 42 posiciones variables fueron no informativas. Para *tef1*, del total de 860 caracteres, 72 fueron variables no informativos y 101 fueron informativos para parsimonia.

Se calcularon los índices de consistencia (CI) y los de retención (RI) para ambos genes, dando como resultado:

$$CI_{tub2} = 0.8276$$

$$RI_{tub2} = 0.9673$$

$$CI_{tef1} = 0.8636$$

$$RI_{tef1} = 0.9774$$

Dada la cantidad de *OTUs* incorporadas en el análisis, resulta imposible utilizar un método exacto para la búsqueda del árbol mas parsimonioso. Por ello se empleó un algoritmo heurístico implementado en PAUP 4.0. Dado que estas metodologías pueden producir resultados que dependen del orden de adición de las secuencias (Hillis et al., 1996), se hicieron 10 búsquedas, en cada una alterando el orden de incorporación de las secuencias de manera aleatoria.

Para determinar el grado de soporte que brindan los datos a cada uno de los clados que surgen del análisis de MP, se realizaron análisis de *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas. Las figuras 32 y 33 muestran los árboles de MP y los valores de *bootstrap* obtenidos para los genes de *tub2* y *tef1* están representados en las figuras 28 y 29 respectivamente. Como puede verse en las figuras, los clados principales están soportados por valores que van desde 95% al 100%. Sin embargo, los árboles obtenidos por MP resultaron no informativos sobre las relaciones filogenéticas de los taxones incluidos dentro de estos clados. Los valores de soporte estadístico son menores al 50%, evidenciándose como politomías.

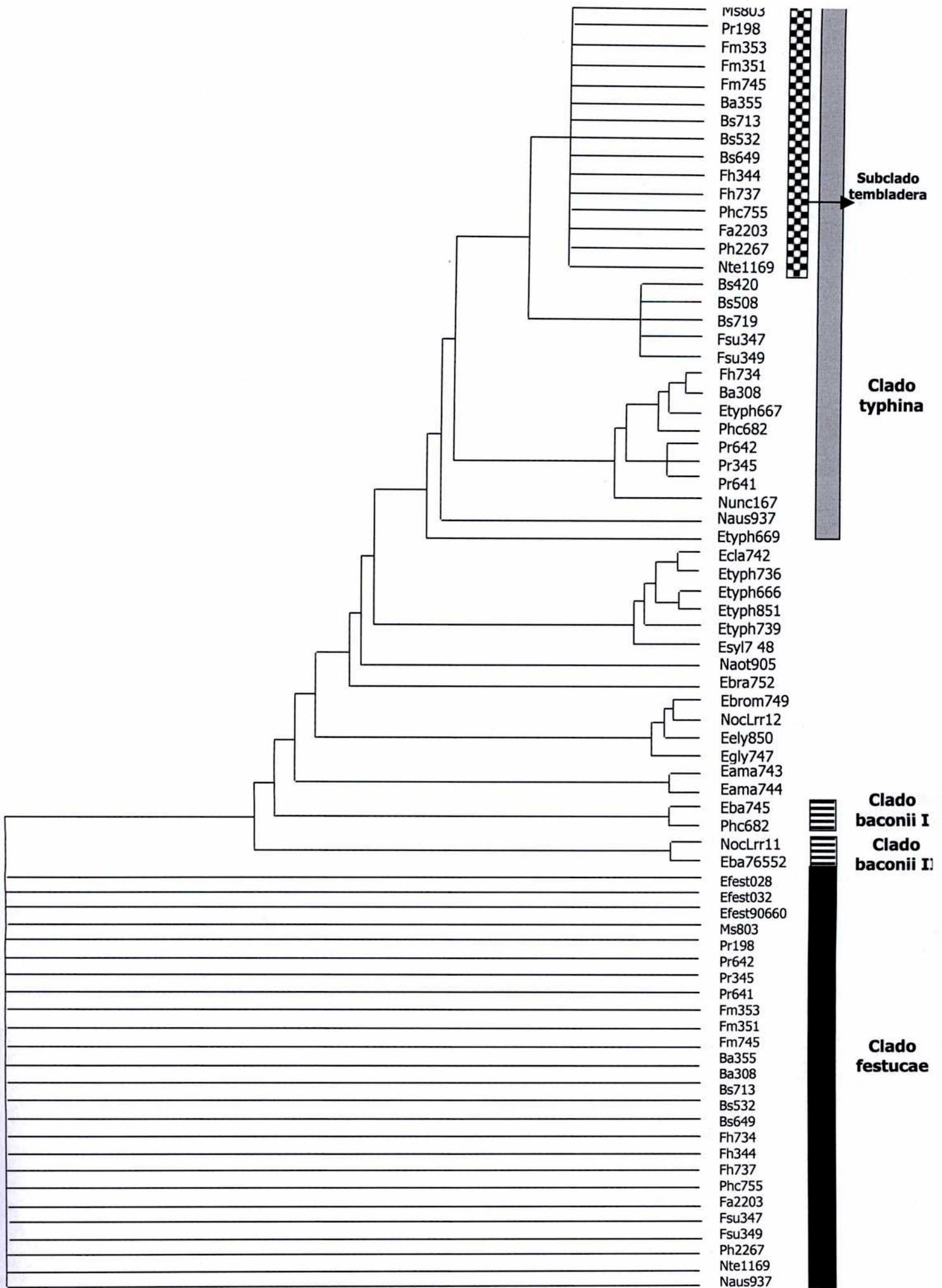


Figura 32: Uno de los árboles más parsimoniosos generados usando PAUP 4.0 * (Swofford 1998) para el gen *tub2*. Se indican con barras los grupos principales detectados por el análisis de MV.

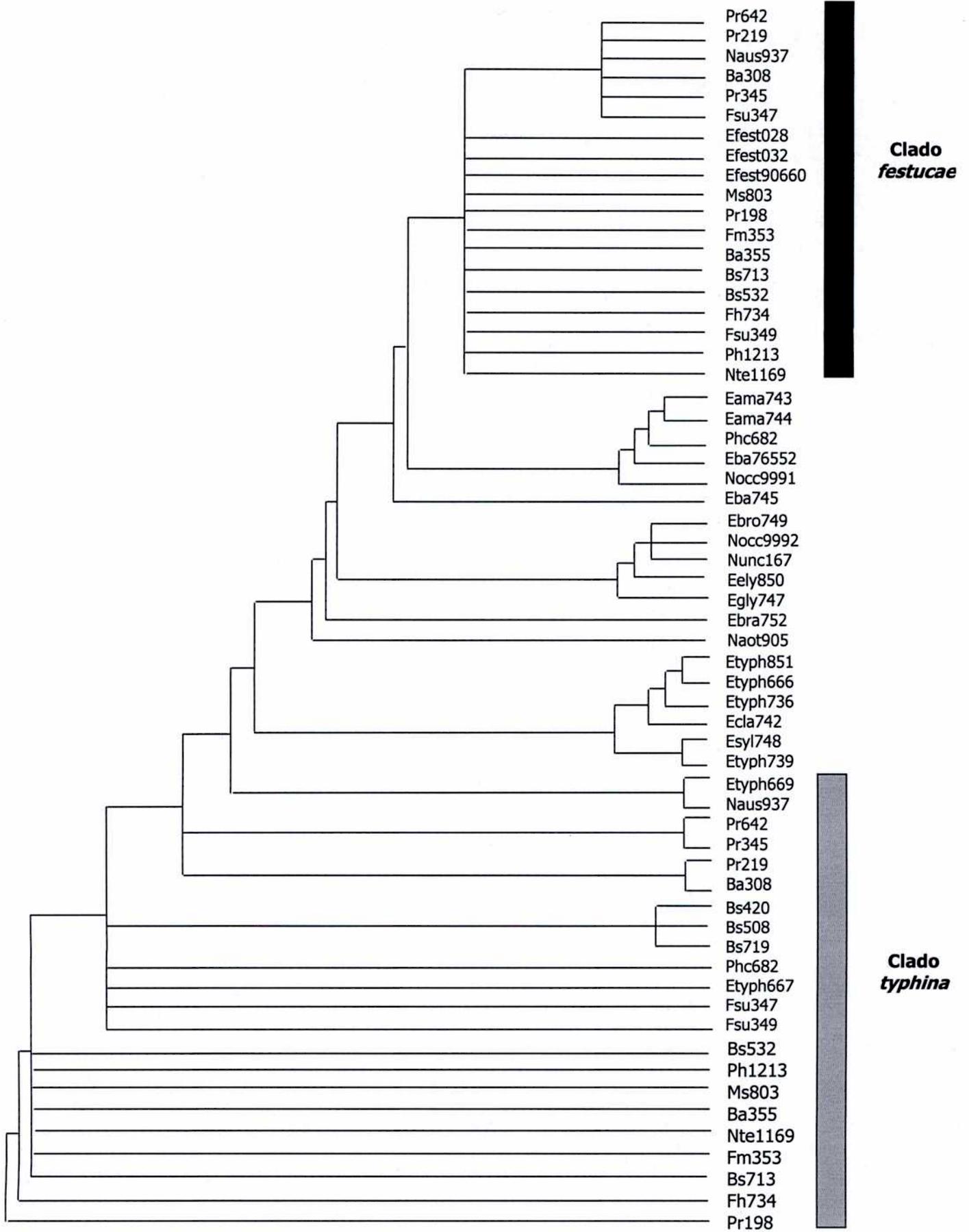


Figura 33: Uno de los árboles más parsimoniosos generados usando PAUP 4.0 * (Swofford 1998) para el gen *tef1*. Se indican con barras los grupos principales detectados por el análisis de MV.

DISCUSSION

7. DISCUSIÓN

7.1 Caracterización morfológica e identificación de los endofitos *Neotyphodium*

Los endofitos asexuales presentan crecimiento lento en cultivo en relación a los sexuales (White et al., 1991b). Todos los endofitos asexuales analizados en este trabajo presentaron menor crecimiento que sus parientes sexuales del género *Epichloë* (Craven, K. D., com. pers.). Se conoce que la mayoría de los derivados aneuploides y poliploides de *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*) crecen lentamente en relación al haploide, que es el estado de ploidía usual de la mayoría de los ascomycetes filamentosos (Kafer y Upshall, 1973, Upshall 1981). Aunque este mecanismo es desconocido, es posible que un fenómeno similar produzca el crecimiento lento de los endofitos híbridos heteroploides en relación a las especies haploides de *Epichloë* (Clay y Schardl 2002).

Entre los asexuales, dos aislamientos de *Poa rigidifolia* mostraron el mayor crecimiento en cultivo al cabo de 21 días, seguidos por los no híbridos. Contrariamente a nuestras observaciones, muchos de los endofitos de crecimiento más lento corresponden a las especies de *Neotyphodium* descritas como no híbridas: *N. aotearoae* (Moon et al., 2002), *N. lolli* (Latch et al., 1984) y *N. typhinum var canariense* (Moon et al., 2000).

El tamaño de los conidios de los aislamientos de Argentina se encuentran en el rango descrito para otros organismos híbridos del género *Neotyphodium*. Los valores resultaron más altos que los descritos para el género *Epichloë*. Se postula una correlación entre el tamaño de los conidios y el contenido genómico para endofitos *Neotyphodium* y *Epichloë* (Kuldau et al., 1999), donde las especies de *Neotyphodium* híbridas tienden a presentar tamaño de conidios mayores que sus parientes del género sexual.

Es importante destacar, que los aislamientos que resultaron no híbridos mostraron baja producción de conidios cuando se hicieron crecer en medio de cultivo agarizado. Comparando con otros endofitos asexuales no híbridos, como *N. aotearoae* donde no han sido observados conidios (Moon et al., 2002) y *N. lolli*, quien raramente produce conidios (Christensen et al., 1993), nuestros resultados están en concordancia con la correlación observada por Moon y colaboradores (2002) entre el origen no híbrido y la baja o nula producción de conidios.

Otros relevamientos realizados en el hemisferio sur fueron los de Nueva Zelanda (Rolston et al., 2002) y Australia (Aldous et al., 1999). En el primer caso, sólo se registraron especies de *Neotyphodium* en *Echinopogon ovatus* (Miles et al., 1998). En Australia también se encontraron endofitos del tipo *Neotyphodium* sólo en especies del género *Echinopogon* (Aldous et al., 1999), lo que sugiere que si los endofitos están presentes, estos ocurren en baja frecuencia. Esto es una diferencia importante con Argentina, ya que encontramos 5

géneros de gramíneas con varias especies, colonizadas por endofitos. Aunque la variabilidad entre los endofitos de Argentina es escasa a nivel molecular y morfológico, es importante destacar la biodiversidad de hospedantes y la amplitud de su distribución en, por ejemplo, enormes extensiones de la Patagonia. A esto se suma el hallazgo de endofitos híbridos y no híbridos dentro del mismo hospedante, como en *Bromus setifolius*. Una explicación posible para la biodiversidad de hospedantes es que existen diferencias genéticas entre los hospedantes y ello podría producir diferentes asociaciones con endofitos genéticamente distintos. La ploidía de la planta podría tener un efecto en el tipo de asociación establecida con el endofito fúngico (Marshall et al., 1999). Según este informe, dependiendo del contenido genómico del hospedante (diploide, hexaploide, etc), la asociación puede producirse con endofitos del tipo *Neotyphodium* o *Acremonium* (Marshall et al., 1999).

Es interesante destacar que en el hemisferio norte y en la región estudiada en este trabajo del cono sur de América, la biodiversidad de hospedantes es muy grande, en tanto que en Nueva Zelanda y Australia se restringe a un solo género.

Se podría postular que la protección mediada por endofitos frente a los herbívoros no es una presión evolutiva decisiva en Nueva Zelanda (White et al., 2001; Moon et al., 2002). En Argentina, podría estar ocurriendo algo similar en ciertas gramíneas que no resultan tóxicas para el ganado. Estos pastos no evolucionaron bajo la presión de pastoreo, por la ausencia o la baja frecuencia de herbívoros nativos. Seguramente existan otras ventajas en la asociación gramínea-endofito, que les permitan una mayor adecuación al ambiente donde se desarrollan o eventualmente, colonizar nuevos ambientes.

Saikkonen y colaboradores (1999) sugieren que los endofitos protegen a sus hospedantes o incrementan su aptitud y adaptabilidad de una manera diferente dependiendo de la población, la diversidad endofítica y/o las condiciones ambientales donde la asociación tiene lugar. Esto podría aplicarse a la diversidad encontrada en Argentina, en contraposición a otras regiones del hemisferio sur. Quizás los climas y suelos encontrados en Argentina, conjuntamente con la variabilidad genética de los hospedantes, incrementan las aptitudes de la asociación, favoreciendo que estas ocurran de manera frecuente en varios géneros de hospedantes y en climas muy diversos.

Tomando en cuenta la condición no híbrida de las tres cepas de *Bromus setifolius* de la provincia de Santa Cruz, Patagonia; su rápido crecimiento en cultivo; su baja producción de conidios característica de endofitos no híbridos (Christensen et al., 1993; Moon et al., 2002) y su agrupamiento en un subclado que se separa del resto, y que se anida bien dentro del clado typhina, proponemos que estos aislamientos sean considerados dentro de la especie *Neotyphodium typhinum* (Morgan-Jones y Gams, 1982).

El endofito aislado de *Phleum commutatum* 682 (Phc682) tiene un origen diferente al resto de los endofitos de Argentina analizados hasta el momento. Debido a sus diferencias de crecimiento en medio agarizado y a que sus 3 parentales son especies de *Epichloë* cuya combinación no está presente en ningún otro endofito conocido, podríamos establecerlo como un nuevo taxón. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios sobre otros aislamientos y/o secuenciación de nuevos genes para determinar si se trata de una nueva especie de *Neotyphodium*, o puede ser considerada una variedad de alguna de las especies ya existentes.

7.2 Árboles filogenéticos: Origen y divergencia de los híbridos de *Neotyphodium*

En grupos taxonómicamente difíciles debido a escasas diferencias morfológicas, los caracteres moleculares son imprescindibles para elucidar relaciones evolutivas entre especies o variedades. La secuenciación de genes ortólogos adecuadamente elegidos y la utilización de diferentes metodologías de análisis filogenético permiten responder interrogantes tanto sistemáticos como evolutivos. Los análisis filogenéticos nos permiten elaborar hipótesis plausibles y fundadas acerca del origen evolutivo de los organismos y de sus relaciones filogenéticas. En este trabajo hemos utilizado este enfoque para estudiar el origen y las relaciones entre cepas de endofitos fúngicos del género *Neotyphodium* aislados de distintas especies de gramíneas de Argentina. Los análisis filogenéticos se hicieron en base a las secuencias nucleotídicas, principalmente intrones, de los genes nucleares β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*).

En este trabajo de tesis se analizaron 27 aislamientos de endofitos provenientes de 10 especies, incluidas en 5 géneros de gramíneas de Argentina y 22 aislamientos de diferentes pastos del hemisferio norte. Los pastos hospedantes de Argentina, fueron obtenidos de poblaciones localizadas en 10 provincias (ver Figura 10).

Todos los endofitos estudiados en este trabajo se incluyeron dentro del género *Neotyphodium*. Muchos de los aislamientos analizados, tanto por los caracteres morfológicos como por los haplotipos encontrados mediante los análisis filogenéticos, resultaron pertenecer a la especie *N. tembladerae*, descrita previamente sobre gramíneas tóxicas de esta región (Cabral et al., 1999). Es interesante destacar que el mismo endofito fue encontrado tanto en hospedantes tóxicos (3 especies de gramíneas) como en aquellos sin registro de toxicidad para el ganado (6 especies), y en poblaciones muy alejadas unas de otras en el territorio argentino. Esto podría indicar que la presencia de metabolitos tóxicos estaría relacionada, no exclusivamente con la especie de endofito infectante, sino con la interacción entre este y el hospedante.

Un endofito del tipo *N. tembladeraae* se encontró recientemente en *Festuca arizonica* en los Estados Unidos (Moon et al., 2004). Tomando en cuenta que no se han encontrado formas sexuales en América de Sur y que estas existen en América del Norte, este hallazgo estaría indicando que, por lo menos en el caso de *Festuca*, la hibridación pudo haber ocurrido en el hemisferio norte desplazándose luego al hemisferio sur. Con respecto a la presencia del mismo anamorfo en 9 especies de pastos en Sudamérica y en un pasto de América del Norte podríamos plantear la posibilidad de transferencia horizontal; es decir, conidios formados sobre una planta podrían ser dispersados e infectar plantas de otras especies. Existen antecedentes en *Poa rigidifolia* en Tierra del Fuego (White et al., 1996), en *Bromus auleticus* de la pampa húmeda y en *B. setifolius* en la Patagonia, donde se observaron fiálides y conidios en el interior de la caña y en el filoplano de la hoja (Iannone y Cabral, com. pers.).

El análisis detallado de las secuencias de los genes *tub2* y *tef1* reveló que gran parte de los endofitos estudiados se originaron por eventos de hibridación entre especies sexuales del género *Epichloë*. Los parentales más frecuentes resultaron ser *E. typhina* y *E. festucae*. La hibridación inter-específica no es conocida en otros hongos, aunque ha sido poco estudiada. Sin embargo, este trabajo muestra que es un fenómeno frecuente en los endofitos que pertenecen al género *Neotyphodium* de amplia distribución en el cono sur de América. Dado que la condición híbrida de las especies de *Neotyphodium* está presente en otras regiones del mundo como Estados Unidos y Europa, la hibridación sería recurrente y/o muy antigua en la evolución de estos endofitos (Clay y Schardl 2002).

En este trabajo se utilizaron tres métodos filogenéticos: máxima parsimonia (MP), *Neighbour-joining* (NJ) y máxima verosimilitud (MV)), los cuales arrojaron relaciones filogenéticas coincidentes para muchos de los aislamientos analizados. Los análisis de MV y NJ fueron más resolutivos que los de MP, aunque en general todos los métodos dieron como resultado topologías no contradictorias.

Los tres clados obtenidos por los árboles de MV (Figuras 28 y 29) están bien definidos también en los árboles de NJ (Figuras 30 y 31): el clado *typhina*, el clado *festucae* y el clado *baconii* ó *amarillans*, dependiendo de si el gen analizado es *tub2* o *tef1*. Esto último está relacionado con el origen híbrido de un aislamiento de *Phleum commutatum*.

Los árboles obtenidos por MP (Figuras 32 y 33) separaron con valores de *bootstrap* mayores al 50% los clados *festucae* y *typhina*. Sin embargo, no resolvieron con buen soporte las relaciones filogenéticas dentro de los mismos, evidenciándose como politomías.

Los árboles derivados de MV basados en las secuencias de ambos genes, apoyan el origen híbrido en 23 de los 27 aislamientos nativos analizados, a partir de las formas sexuales encontradas hasta ahora en el hemisferio norte: *Epichloë festucae* y *E. typhina*

(Figuras 28 y 29). El presente trabajo de tesis demuestra, por primera vez, que la mayoría de los endofitos fúngicos de la Argentina son organismos originados por eventos de hibridación. El único registro previo de un organismo híbrido de Argentina es el de un único aislamiento de *N. tembladerae* a partir de *Poa huecu* (Cabral et al., 1999), también derivada de *E. festucae* y *E. typhina* (Moon et al., 2002). La distribución de los endofitos híbridos es sin duda ubicua, ya que los aislamientos provienen de diversas especies y géneros de gramíneas distribuidas en un amplio rango geográfico, que abarca desde Jujuy hasta Tierra del Fuego.

Las únicas tres cepas aparentemente no híbridas fueron aisladas de *Bromus setifolius*. Es interesante destacar que en el mismo hospedante, en la misma región geográfica, hemos encontrado también dos aislamientos híbridos. Dos de los no híbridos (Bs420 y Bs719) fueron aislados de dos poblaciones distantes 20 Km. una de otra, y alejadas 300 Km. de la población de la cual se aisló el tercer no híbrido (Bs508), todas ellas en la Patagonia. Hasta el momento, sólo tres cepas de *Neotyphodium* han sido citadas como no híbridas cuando se amplificaron los genes *tub2*, *tef1* y actina: *N. aotearoae*, *N. typhinum* y *N. lolii* (Christensen et al., 1993; Moon et al., 2002).

Entre los endofitos híbridos con características particulares se encuentra uno de los aislamientos de *Phleum commutatum* (Phc682), que presenta un genotipo único que no se encuentra en otros híbridos. El aislamiento Phc682 tiene haplotipos de *tub2* y *tef1* asociados al clado typhina, pero también posee un segundo haplotipo para cada gen que, en contraposición con los restantes de *N. tembladerae*, no está incluido en el clado festucae. En el caso de *tub2* ese segundo haplotipo se asocia a *E. baconii* (Figura 28). En el caso de *tef1*, en cambio, se asocia al clado amarillans (Figura 29). Dada la cercana relación filogenética entre *E. amarillans* y *E. baconii*, no es posible distinguir si el aislamiento tuvo dos contribuciones independientes, una de un parental relacionado a *E. amarillans* y la otra a *E. baconii*, o bien, si existió un único ancestro que tenía estos haplotipos particulares.

Existen trabajos previos en los que se describen especies del género *Neotyphodium* derivados de tres ancestros. Los endofitos *N. coenophialum* (Tsai et al., 1994) y *N. chisosum* (Moon et al., 2004) claramente exhiben contribuciones genómicas provenientes de 3 especies de *Epichloë*. Es interesante señalar que los tres ancestros que encontramos para el aislamiento de *Phleum commutatum* 682 (Phc682) están asociados con especies de la tribu Aveneae, tribu a la que pertenece *Phleum commutatum*. La asociación exclusiva de estos endofitos a hospedantes de la tribu Aveneae, nos permite suponer que en este caso, no existiría transferencia horizontal a pastos de otras tribus. Por otro lado, mientras *E. amarillans* ha sido encontrada solamente en Norte América, *E. baconii* parece estar restringida a Europa. Por lo tanto, este componente en el genoma de Phc682 podría haberse

originado de una relación muy antigua con un ancestro común de *E. amarillans* y *E. baconii*, posiblemente en otro continente, que luego fue seguida por migración hacia nuestro continente, en el curso de la cual hibridó con *E. typhina*. El otro aislamiento de *Phleum commutatum* (Phc755) se comporta como el resto de los híbridos del tipo *N. tembladeraae*. Como en el caso de *Bromus setifolius*, en *Phleum commutatum* un mismo hospedante está asociado a endofitos de origen diferente.

La formación de un organismo híbrido es el resultado de la unión sexual de dos especies relacionadas pero diferentes. Pero por otro lado, particularmente en el caso de los hongos, la vía más factible parecería ser mediante la anastomosis entre hifas de endofitos diferentes, tipo *Epichloë*, que infectan la misma planta y que conducen a los eventos de heterocariosis y parasexualidad (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994). Los híbridos producidos de esta manera segregan a cada macollo de la planta, y de ese modo se dispersan en forma independiente (Meijer y Leuchtman 1999, Christensen et al., 2000).

El descubrimiento de especies híbridas de *Neotyphodium* en América del Sur permite establecer posibles escenarios sobre su origen. La hibridación es un mecanismo frecuente en la evolución de los endofitos asexuales del hemisferio norte (Schardl et al., 1994; Tsai et al., 1994; Wilkinson y Schardl 1997; Moon et al., 2000; Craven et al., 2001a, Moon et al., 2004), y este trabajo muestra que también lo es en el hemisferio sur. La frecuente ocurrencia de endofitos asexuales híbridos sugiere que estos podrían tener una ventaja selectiva frente a los no híbridos. Los efectos negativos del *Muller's ratchet* (Muller 1964) actuarían en los endofitos asexuales por la acumulación de mutaciones deletéreas (Lynch et al., 1993, Moran 1996, Schardl 1996, Bidochka y De Koning 2001) que podrían causar una reducción de la adecuación darwiniana (*fitness*). La hibridación tanto entre endofitos asexuales, como entre endofitos asexuales con sexuales emparentados, reemplazaría aquellos genes esenciales que podrían haber sufrido mutaciones perjudiciales con una consecuente reducción funcional de las proteínas (Gentile et al., en prensa). Cuando un organismo es híbrido presenta más de una copia de algunos genes. Si se produce alguna mutación en un gen esencial siempre queda la segunda copia funcional del mismo para reemplazar la copia mutada. En cambio, en los organismos no híbridos, la presencia de una sola copia de cada gen no les permite esta posibilidad. Como consecuencia los organismos híbridos tendrían una mayor adecuación darwiniana (*fitness*) frente a los no híbridos (Gentile et al., en prensa). En los endofitos asexuales, este proceso podría tener lugar por medio de la heterocariosis, la parasexualidad y la hibridación inter-específica.

A pesar de que 24 de los 27 aislamientos resultaron híbridos y de que se encontró variación dentro de los haplotipos derivados de *E. typhina*, la secuenciación y los análisis filogenéticos no mostraron ninguna evidencia de la presencia de más de un haplotipo de una

misma especie. Una hibridación de *E. typhina* X *E. typhina* hubiera sido fácil de detectar en este estudio dado que las dos copias quedarían incluidas en el mismo clado typhina. Hasta el momento no ha sido encontrado ningún híbrido intra-específico, sugiriendo que si ocurre la hibridación parasexual intra-específica, estaría seguida por la pérdida de un complemento cromosómico que lleva a la haploidización. En cambio, los híbridos inter-específicos tienden a conservar las dos copias en núcleos diferentes o en un único núcleo.

Podemos proponer diferentes escenarios evolutivos para explicar la presencia de los endofitos híbridos *Neotyphodium* en el cono sur de América. Si asumimos que los endofitos sexuales *E. typhina* y *E. festucae* no existen en esta región, los híbridos de estas especies podrían haberse originado en el hemisferio norte y luego haber seguido la migración de sus hospedantes hacia el extremo sur del continente. La presencia del endofito híbrido *Neotyphodium tembladerae* en *Festuca arizonica*, un pasto del hemisferio norte, apoya este escenario.

Un escenario diferente resultaría si se postulara que las especies sexuales que hibridaron están presentes en Sudamérica, a pesar de que no han sido encontradas hasta ahora. En ese caso, desde un área de distribución original reducida de las formas sexuales, los endofitos tipo *Neotyphodium* podrían haberse dispersado hacia áreas más extensas, diversificándose durante ese proceso. Las variables ambientales como tipo de suelo, pH, humedad ambiental, temperatura ó precipitaciones, también podrían limitar la distribución de los organismos sexuales.

Otra posibilidad es que las formas sexuales existieron en Sudamérica algún tiempo atrás pero luego se extinguieron. Esto nos permite pensar que la hibridación podría haber ocurrido en el pasado en el cono sur de América, después o durante la migración de los pastos hacia el sur.

La co-divergencia implica que la evolución del simbiote sigue la evolución del hospedante, y la evolución del hospedante a la del endofito (Janzen 1980). Es sabido que los endofitos proveen componentes críticos de diversidad y adaptación dentro de las Pooideae. De acuerdo a Schardl y colaboradores (1997), en la filogenia inferida a partir de la porción intrónica del gen *tub2*, el clado principal de las especies de *Epichloë* es congruente con la filogenia inferida de las tribus de gramíneas a la que pertenecen las especies hospedantes, con la excepción de *E. glyceriae*. En cambio, en el árbol obtenido a partir de secuencias de *tef1* que obtuvieron esos autores, pareciera que hubiese ocurrido una duplicación de las especies de endofitos, dando origen a dos linajes que han evolucionado independientemente, coevolucionando cada uno con diferentes pastos. Uno de estos linajes dio origen a *E. festucae*, *E. amarillans* y *E. baconii*, mientras que el otro dio origen a *E. glyceriae*, *E. elymi* y *E. bromicola* (Craven et al, 2001b). En los endofitos estrictamente

transmitidos por semilla, no existen evidencias de co-divergencia (Hafner y Nadler 1988, Chapela et al., 1994) y estudios filogenéticos de varios sistemas han demostrado que el mutualismo altamente específico no necesariamente evolucionó por co-divergencia, sino que también podría haberse originado por transferencia horizontal (Chapela et al., 1994, Gast y Caron 1996, Wilkinson et al., 1996, Janz y Nylin 1998, Van Hoek et al., 2000). La evidencia con el género *Festuca* sugiere que en los mutualistas, la especiación fue posterior al establecimiento de la simbiosis entre el stock ancestral de estas especies y las especies del género *Neotyphodium* (Schardl y Siegel 1993). En el caso de los endofitos anamórficos sudamericanos, no es posible analizar la congruencia entre las topologías de los árboles de los endofitos y el de las tribus de sus hospedantes, porque todavía no se han hecho estudios filogenéticos en estas últimas. Sin embargo, hemos observado el mismo endofito en pastos de distintas tribus, como en el caso del endofito *Neotyphodium tembladerae* presente en 4 tribus, lo que podría explicarse por eventos de transferencia horizontal durante o después de la migración de los pastos.

El aislamiento geográfico parece promover la especiación entre los endofitos sexuales. Por ejemplo, existe esterilidad entre especies cercanas desde el punto de vista filogenético como *E. baconii* y *E. amarillans* que viven en alopatría, aunque ambas estén asociadas al mismo género de pasto o a géneros muy relacionados (Leuchtman y Schardl 1998). *E. baconii*, se ha encontrado exclusivamente en Europa mientras que *E. amarillans* sólo en Norteamérica. No existen referencias de lo que ocurre con los endofitos asexuales en el hemisferio norte. En los endofitos del cono sur de América, las distancias geográficas no parecen actuar como barreras de aislamiento. Hemos encontrado endofitos indistinguibles por sus secuencias de *tef1* y *tub2* y con escasas o nulas diferencias morfológicas, en un hospedante de Salta (*Festuca hieronymi*) y en otro hospedante en Tierra del Fuego (*Poa rigidifolia*), aproximadamente a 3000 km de distancia uno de otro.

Los resultados presentados en este trabajo reflejan las complejas relaciones involucradas entre gramíneas y endofitos del tipo *Neotyphodium*. Es difícil determinar cuál de los escenarios evolutivos posibles es más probable, y es necesario ampliar las regiones geográficas intermedias entre las formas sexuales y asexuales a ser relevadas, para tener un panorama más completo de las relaciones y la evolución de estos dos organismos.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- Los endofitos tipo *Neotyphodium* analizados en este estudio son, en su mayoría, híbridos derivados de dos especies sexuales de *Epichloë*: *E. festucae* y *E. typhina*. Esto concuerda con lo observado previamente para el endofito *N. tembladeraae* Cabral et White que presenta los mismos ancestros.
- No se registraron durante el transcurso de este estudio ni existen registros anteriores de estadios sexuales de los endofitos en toda el área estudiada, que comprende una gran parte del territorio Argentino.
- La hibridación parece ser un fenómeno común y frecuente en el origen y evolución de los endofitos asexuales de Argentina. La variabilidad necesaria para que el proceso de adaptación de estos organismos tenga lugar, estaría dada por eventos de hibridación, tanto en las formas sexuales del hemisferio norte, como en las asexuales en ambos hemisferios. Esta podría ser uno de los motivos que explica la abundancia de numerosas formas asexuales en esta región.
- La presencia de endofitos similares en muy diversas gramíneas, podría estar reflejando eventos de colonización independiente de varios linajes sexuales, o bien transferencia horizontal del mismo endofito entre géneros distintos de gramíneas que coexisten en simpatría.
- El endofito aislado de *Phleum commutatum* 682 (Phc682) demostró ser un híbrido derivado de tres especies parentales; es decir, involucra al menos dos eventos de hibridación. Deben realizarse estudios sobre nuevos aislamientos para establecer su ubicación taxonómica.
- Las tres cepas de endofitos aparentemente no híbridas, aisladas de *Bromus setifolius*, derivan de *E. typhina* y tienen características particulares como la baja producción de conidios y el crecimiento rápido en cultivo, que claramente las diferencia de las formas híbridas. Fueron incluidas en la especie *Neotyphodium typhinum*.

PERSPECTIVAS

La asociación endofito-gramínea constituye un modelo fascinante para el estudio de los sistemas simbióticos y su implicancia en la evolución. La ausencia de formas sexuales en toda esta región de América del Sur, la presencia de un número importante de formas exclusivamente asexuales y, en su mayoría híbridos derivados de formas sexuales conocidas solo para el hemisferio norte, nos abre el camino para indagar sobre el origen y los procesos de coevolución, migración, divergencia y coadaptación de los integrantes de esta simbiosis.

El conocimiento de la biodiversidad de los endofitos de pastos nativos en Argentina, constituye una importante herramienta para su eventual manejo biotecnológico. La inoculación de gramíneas de interés económico con endofitos no tóxicos, pero que podrían aumentar su rendimiento como pastura, no ha resultado exitosa hasta el momento debido a la dificultad de vencer las barreras del reconocimiento hospedante – endofito. El conocimiento de la afinidad filogenética podría ser un camino importante para el logro de estos fines.


LIC. AGUSTINA GENTILE




Daniel Cabral

BIBLIOGRAFIA

9. Bibliografía

- ACHER, A. 1995. *Aislamiento e identificación del hongo endofítico de Poa huecu y búsqueda de sus metabolitos tóxicos*. Tesis de Licenciatura. Dir. D. Cabral. DBBE, FCEyN, UBA.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. 1992. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- ALDOUS, D. E., ISAACS, S. & MEBALDS, M. I. 1999. *Endophytes in the genus Neotyphodium are not found in Australian native grasses*. Australasian Plant Pathology **28**: 183-186.
- ANDERSON, J. M., ANDERSON, H. M., ARCHANGELSHY, S., BAMFORD, M., CHANDRA, S., DETTMAN, M., HILL, R., McLOUGHLIN, S. & ROSSLER, O. 1999. *Patterns of Gondwana plant colonization and diversification*. Journal of African Earth Science **28**: 145-167.
- ARACHEVALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND, C. S. & RADCLIFFE, D. E. 1989. *Effect of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress*. Agronomy Journal **81**: 83-90.
- ARACHEVALETA, M.; BACON, C. W.; PLATTNER, R.D.; HOVELAND, C. S & RADCLIFFE, D. E. 1992. *Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer*. Applied and Environmental Microbiology **58**: 857-861.
- ATKINS, P. W. 1988. *Bioquímica*. Tercera edición. Eds Liverte.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; ROBBINS, J. D. & LUTTRELL, E. S. 1977. *Epichloë typhina from toxic tall fescue grasses*. Applied and Environmental Microbiology **34**: 576-581.
- BACON, C. W. & HILL, N. 1996. *Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbiosis and their role in the ecological adaptations of grasses*. En: Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, Ecology and Evolution, pp: 155-178. REDLIN, S.C. & CARRIS, L.M. (eds). APS Press.
- BELESKY, D. P.; STUEDEMANN, J. A.; PLATTNER, R. D. & WILKINSON, S. R. 1988. *Ergopeptine alkaloids in grazed tall fescue*. Agronomy Journal **80**: 209-212.
- BERTONI, M. D.; CABRAL, D.; ROMERO, N. & DUBCOVSKY, J. 1993. *Endofitos fúngicos en especies sudamericanas de Festuca (Poaceae)*. Bol. Soc. Argent. Bot. **29**: 25-34.
- BIDOCHKA, M. J. & DE KONING, J. 2001. *Are teleomorphs really necessary? Modelling the potential effects of Muller's ratchet on deuteromycetous entomopathogenic fungi*. Mycological Research **105**: 1014-1019.
- BREDENKAMP, G. J., SPADA, F. & KAZMIERCZAK, E. 2002. *On the origin of northern and southern hemisphere grasslands*. Plant Ecology **163**: 209-229.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J. & TAYLOR, J. W. 1991. *Fungal Molecular Systematics*. Ann. Rev. Ecol. Syst. **22**: 525-564.
- BULMER, M. 1991. *Strand symmetry of mutation rates in the beta globin region*. Journal of Molecular Evolution **33**: 305-310.

- BULTMAN, T. L. & WHITE, J. F. Jr. 1988. *Pollination of a fungus by a fly*. *Oecologia* **75**: 317-319.
- BULTMAN, T. L., WHITE, J. F. Jr, BOWDISH, T. I., WELCH, A. M. & JOHNSTON, J. 1995. *Mutualistic transfer of Epichloë spermatia by Phorbia flies*. *Mycologia* **87**: 182-189.
- BYRD, A. D.; SCHARDL, C. L.; SONGLIN, P. J.; MOGEN, K. L. & SIEGEL, M. R. 1990. *The B-tubulin gene of Epichloë typhina from perennial ryegrass (Lolium perenne)*. *Curr. Genet.* **18**: 347-354.
- CABRAL, D. & LUGO, M. A. 1993. *Los endofitos de Festuca hieronymy y Poa huecu, dos plantas tóxicas para el ganado*. Resúmenes del VI Congreso Argentino de Micología.
- CABRAL, D. & LUGO, M. A. 1994. *Los endofitos fúngicos en gramíneas de Argentina*. Resúmenes del VI Congreso Latinoamericano de Botánica.
- CABRAL, D.; CAFARO, M. J.; SAIDMAN, B.; LUGO, M.; REDDY, P. V. & WHITE, J. F. Jr. 1999. *Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American Grasses*. *Mycologia* **91** (2): 315-325.
- CARROLL, G. C. 1988. *Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont*. *Ecology* **69**: 2-9.
- CERLING, T. E., HARRIS, J. M., MACFADDEN, B. J., LEAKEY, M. G., QUADE, J., EISENMANN, V. & EHLERINGER, J. R. 1997. *Global vegetation change through the Mioceno/Plioceno boundary*. *Nature* **389**: 153-158.
- CHAPELA, I. H., REHNER, S. A., SCHULTZ, T. R. & MUELLER, U. G. 1994. *Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi*. *Science* **266**: 1691-1694.
- CHEPLICK, G. & CLAY, K. 1988. *Acquired chemical defenses in grasses: the role of fungal endophytes*. *Oikos* **52**: 309-318.
- CHRISTENSEN, M. J., LEUCHTMANN, A., ROWAN, D. D. & B.A TAPPER. 1993. *Taxonomy of Acremonium endophytes of tall fescue (Festuca arundinacea), meadow fescue (F. pratensis) and perennial rye-grass (Lolium perenne)*. *Mycol. Res* **97**: 1083-1092.
- CHRISTENSEN, M. J., SIMPSON, W. R. & T. SAMARRAI. 2000. *Infection of tall fescue and perennial ryegrass plants by combinations of different Neotyphodium endophytes*. *Mycol. Res* **104**: 974-978.
- CLARK, E. H.; WHITE, J. F. & PATERSON, R. M. 1983. *Improved histochemical techniques for the detection of A. coenophialum in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus*. *J. Microbiol. Methods* **1**: 149-155.
- CLAY, K. 1988. *Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism*. En: *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic Press Limited, pp: 79-105.
- CLAY, K. 1990. *Fungal endophytes of grasses*. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **21**: 275-297.

- CLAY, K. & SCHARDL, C. L. 2002. *Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with grasses*. The American Naturalist **160**: 99-127.
- CRAVEN, K. D.; BLANKENSHIP, J. D.; LEUCHTMANN, A.; HIGNIGHT, K. & SCHARDL, C. L. 2001a. *Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass Lolium pratense*. Sydowia: **53**: 44-73.
- CRAVEN, K. D., HSIAU, P. T. W., LECHTMANN, A., HOLLIN, W. & SCHARDL, C. L. 2001b. *Multigene phylogeny of Epichloë species, fungal symbionts of grasses*. Annals of the Missouri Botanical Garden **88**: 14-34.
- CURTIS, H. & BARNES, N. S. 1993. Biología. Quinta edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- DEWEY, D. R. 1982. *Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae grasses*. En: Grasses and grasslands-systematic and ecology, Estes, J. R., Tyrl, R. J. & Brunken, J. N. (eds). University of Oklahoma Press, Oklahoma, Pp. 51-80.
- DEWEY, D. R. 1984. *The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae*. En: Gene manipulation in plant improvement, Gustafson, J. P ed. Plenum Publishing Corporation, New York, Pp. 209-279.
- DOSS, R. P., CLEMENT, S. L., KUY, S. & WELTY, R. E. 1998. *A PCR-based technique for detection of Neotyphodium endophytes in diverse accessions of tall fescue*. Plant Disease **82** (7): 738-740.
- EHLERINGER, J. R., CERLING, T. E. & HELLIKER, B. R. 1997. *Photosynthesis, atmospheric CO₂ and climate*. Oecologia **112**: 285-299.
- FAETH, S. H., BUSH, L. P. & SULLIVAN, T. J. 2002. *Peramine alkaloid, variation in Neotyphodium-infected arizona fescue: Effects of endophyte and host genotype and environment*. Journal of Chemical Ecology **28**: 1511-1526.
- FARRIS, J. S. 1969. *A successive approximations approach to character weighting*. Systematic Zoology **18**: 374-385.
- FARRIS, J. S. 1973. *On the use of the parsimony criterion to inferring evolutionary trees*. Systematic Zoology **22**: 250-256.
- FARRIS, J. S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. En: Advances in cladistics, Vol 2. N. I. Platnick and V. A. Funk (eds). Columbia Univ. Press, New York, pp. 7-36.
- FARRIS, J. S. 1989. *The retention index and the rescaled consistency index*. Cladistics **5**: 417-419.
- FARRIS, J. S.; ALBERT, V. A. KALLERSJO, M.; LIPSCOMB, D. & KLUGE, A. G. 1996. *Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining*. Cladistics **12**: 99-124.
- FELSENSTEIN, J. 1981. *Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach*. Journal of Molecular Evolution **17**: 368-376.

- FELSENSTEIN, J. 1985a. *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution **39**: 783-791.
- FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). University of Washington, Seattle.
- FLETCHER, L. R. & HARVEY, I. C. 1981. *An association of a Lolium endophyte with ryegrass stager*. N. Z. Vet. J. **29**: 185-186.
- FOSTER, L. M., KOZAK, K. R., LOFTUS, M. G., STEVENS, J. J. & ROSS, I. K. 1993. *The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi*. Mycol. Res **97** (7): 769-781.
- FREEMAN, E. M. 1904. *The seed fungus of Lolium temulentum, the darnel*. Philosophical transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences **214**: 1-28.
- GAST, R. J. & CARON, D. A. 1996. *Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates from plankton foraminifera and radiolaria*. Molecular Biology and Evolution **13**: 1192-1197.
- GENTILE, A. 1998. *Caracterización isoenzimática de los endofitos fúngicos aislados de gramíneas autóctonas no tóxicas de la República Argentina*. Tesis de Licenciatura. Dir. D. Cabral. DBBE, FCEyN, UBA.
- GENTILE, A.; ROSSI, M. S.; CABRAL, D.; CRAVEN, K. D. & SCHARDL, C. L. *Origin, divergence and molecular phylogeny of Epichloë endophytes of native Argentine grasses*. Molecular Phylogenetics and Evolution. En prensa.
- GLENN, A.; BACON, C. W.; PRICE, R. & HANLIN, R. 1996. *Molecular phylogeny of Acremonium and its taxonomy implications*. Mycologia **88** (3): 369-383.
- GOODWIN, D. C. & LEE, S. B. 1993. *Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR*. Biotechniques **15**: 438-444.
- GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP. 2001. *Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae)*. Annals of the Missouri Botanical Garden **88**: 373-457.
- GROGER, D. 1972. *Ergot*. En Microbial Toxins, S. KADIS, CIEGLER, A. & AJL, S.J. eds, pp: 321-373, Academic Press, NY.
- GWINN, K. D. & GAVIN, A. M. 1992. *Relationship between endophyte infection level of tall fescue seed lots and Rhizoctonia zeae seedlings disease*. Plant Disease **76**: 911-914.
- HAFNER, M. S. & NADLER, S. A. 1988. *Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts*. Nature **332**: 258-259.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H. & YANO, T. 1985. *Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA*. Journal of Molecular Evolution **22**: 160-174.
- HASHIMOTO, T.; NAKAMURA, Y.; KAMAISHI, T.; NAKAMURA, E.; ADACHI, J.; OKAMOTO, K. & HASEGAWA, M. 1995. *Phylogenetic place of mitochondrion-lacking protozoa Giardia lamblia, inferred from amino-acid sequences of elongation factor 2*. Mol. Biol. Evol. **12**: 782-793.

- HASHIMOTO, T. & HASEGAWA, M. 1996. *Origin and early evolution of eukaryotes inferred from the amino-acid sequences of translation elongation factor alpha/Tu and 2/G*. Adv. Biophys. **32**: 73-120.
- HILLIS, D. M. & HUELSENBECK, J. P. 1992. *Signal, noise and reliability in molecular phylogenetic analysis*. Journal of Heredity **83**: 189-195.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C. & MABLE, B. K. 1996. *Molecular systematics*, Sinauer, Sunderland, MA.
- HIRT, R. P.; LOGSDON, J. M. Jr.; HEALY, B.; DOREY, M. W.; DOOLITTLE, W. F. & EMBLEY, T. M. 1999. *Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 580-585.
- HSIAO, C., CHATTERTON, N. J., ASAY, K. H. & JENSEN K. B. 1995. *Molecular phylogeny of the Pooideae (poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences*. Theoretical and Applied Genetics **90**: 389-398.
- IANNONE, L. J. 2003. Caracterización del endofito de *Bromus auleticus* y sus efectos sobre la biología del hospedante. Tesis de Licenciatura. FCEyN, UBA.
- IRWIN, D. M. & WILSON, A. C. 1991. *Limitations of molecular methods for establishing the phylogeny of mammals, with special reference to the position of elephants*. En American Museum of Natural History Symposium on Mammalian Phylogeny, eds. SZALAY, F. S.; NOVACEK, M. J. & MCKENNA, M. C. New York: Springer Verlag.
- JANZ, N. & NYLIN, S. 1998. *Butterflies and plants: a phylogenetic study*. Evolution **52**: 486-502.
- JANZEN, D. 1980. *When is it coevolution?* Evolution **34**: 611-612.
- JUKES, T. H. & CANTOR, C. R. 1969. *Evolution of protein molecules*. Mammalian protein metabolism III, eds. Munro, H. N., pp. 79-95. Springer-Verlag, Tokyo.
- KAFER, E. & UPSHALL, A. 1973. *The phenotypes of the eight disomics and trisomics of Aspergillus nidulans*. Journal of Heredity **64**: 35-38.
- KELLOGG, E. A. 1992. *Tools for studying the chloroplast genome in the Triticeae (Gramineae): an EcoRI map, a diagnostic deletion, and support for Bromus as an outgroup*. American Journal of botany **79**: 186-197.
- KIHARA, H. 1954. *Considerations on the evolution and distribution of Aegilops species based on the analyzer method*. Cytologia **19**: 336-357.
- KIMURA, M. 1980. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of Molecular Evolution **16**: 111-120.
- KIMURA, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KOCHER, T. D. & WHITE, T. J. 1989. *Evolutionary analysis via PCR*. En: PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, ed. H. A. Erlich, pp. 137-151. Stockton University Press, New York.

- KOGA, H.; CHRISTENSEN, M. J. & BENNETT, R. J. 1993. *Cellular interactions of some grass Acremonium endophyte associations*. Mycol. Res. **97**: 1237-1244.
- KOHLMEYER, J. & KOHLMEYER, E. 1974. *Distribution of Epichloë typhina (Ascomycetes) and its parasitic fly*. Mycologia **66**: 77-86.
- KOVER, P. X.; DOLAN, T. & CLAY, K. 1997. *Potential versus actual contribution of vertical transmission to pathogen fitness*. Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences **264**: 903-909.
- KULDAU, G. A., TSAI, H. F. and C. L. SCHARDL. 1999. *Genome sizes of Epichloë species and anamorphic hybrids*. Mycologia **91**: 776-782.
- KWOK, S. & SNINSKY, J. J. 1989. *Application of PCR to the detection of human infectious diseases*. En: PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, ed. H. A. Erlich, pp. 235-250. Stockton University Press, New York.
- LATCH, G. C. M., CHRISTENSEN, M. J. & SAMUELS, G. J. 1984. *Five endophytes of Lolium and Festuca in New Zealand*. Mycotaxon **20**: 535-550.
- LAUENROTH, W. K. & MILCHUNAS, D. G. 1992. *Short-grass steppe*. En: Natural grasslands introduction and western hemisphere. Coupland, R. T ed. Ecosystems of the World 8A, Elsevier, Amsterdam.
- LEUCHTMANN, A. 1994. *Isozyme relationships of Acremonium endophytes from twelve Festuca species*. Mycol. Res. **98**: 25-33.
- LEUCHTMANN, A. & CLAY, K. 1990. *Isozyme variation in the Acremonium/ Epichloë fungal endophyte complex*. Phytopathology **80**: 1133-1139.
- LEUCHTMANN, A.; SCHARDL, C. L. & SIEGEL, M. R. 1994. *Sexual compatibility and taxonomy of a new species of Epichloë symbiotic with the fine fescue grasses*. Mycologia **86**: 802-812.
- LEUCHTMANN, A. & SCHARDL, C. L. 1998. *Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of Epichloë and other congeneric European species*. Mycological Research **102**: 1169-1182.
- LI, W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.
- LI, W. H. & GRAUR, D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- LINDSTROM, J. T. & BELANGER, F. C. 1994. *Purification and characterisation of an endophytic fungal proteinase that is abundantly expressed in the infected host grass*. Plant. Physiol. **106**: 7-16.
- LINNEO, C. 1758. *Sistema naturae*. Reimpreso en 1964 por Wheldon and Wesley. Ltd., New York.
- LUGO, M. A; ANTON, A. M. & CABRAL, D. 1998. *Presencia y distribución de micofilas en gramíneas de Argentina*. Ann. Jar. Bot. Madrid **56**: 15-22.

- LYNCH, M., BURGER, R., BUTCHER, D. & GABRIEL, W. 1993. *The mutational meltdown in asexual populations*. Journal of Heredity **84**: 339-344.
- LYONS, P. C., PLATTNER, R. D. & BACON, C. W. 1986. *Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass*. Science **232**: 487-489.
- MARGULIS, L. & SAGAN, C. 1995. *Microcosmos*. Ed. Metafísica.
- MARSHALL, D., TUNALI, B. & NELSON, L. R. 1999. *Occurrence of fungal endophytes in species of wild Triticum*. Crop Science **39**: 1507-1512.
- MARTIN, A. P. 1995. *Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA*. Molecular Biology and Evolution **12**: 1124-1131.
- MATHEWS, S., TSAI, R. C. & KELLOGG, E. A. 2000. *Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae): evidence from the nuclear gene phytochrome B*. American Journal of Botany **87**: 96-107.
- MEIJER, G. & LEUCHTMANN, A. 1999. *Multistrain infections of the grass Brachypodium sylvaticum by its fungal endophyte Epichloë sylvatica*. New Phytologist **141**: 355-368.
- MILES, C. O., DI MENNA, M. E., JACOBS, S. W. L., GARTHWAITE, I., LANE, G. A., PRESTIDGE, R. A., MARSHALL, S. L., WILKINSON, H. H., SCHARDL, C. L., BALL, O. J. P. & LATCH, G. C. M. 1998. *Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity in livestock*. Applied and Environmental Microbiology **64**: 601-606.
- MOON, C. D.; TAPPER, B. A. & SCOTT, B. 1999. *Identification of Epichloë endophytes in planta by a microsatellite-based PCR fingerprinting assay with automated analysis*. Applied and Environmental Microbiology **65**: 1268-1279.
- MOON, C. D.; SCOTT, B.; SCHARDL, C. L. & CHRISTENSEN, M. J. 2000. *The evolutionary origins of Epichloë endophytes from annual ryegrasses*. Mycologia **92**: 1103-1118.
- MOON, C. D.; MILES, C. O.; JARLFORS, U. & SCHARDL, C. L. 2002. *The evolutionary origins of three new Neotyphodium endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere*. Mycologia **94**: 694-711.
- MOON, C. D., K. D. CRAVEN, A. LEUCHTMANN, S. L. CLEMENT & C. L. SCHARDL. 2004. *Prevalence of interspecific hybrids among asexual fungal endophytes of grasses*. Molecular Ecology. In press
- MORAN, N. A. 1996. *Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **93**: 2873-2878.
- MORGAN-JONES, G. & GAMS, W. 1982. *Notes of Hyphomycetes. XLI. An endophyte of Festuca arundinacea and the anamorph of Epichloë typhina, new taxa in one of two new sections of Acremonium*. Mycotaxon **15**: 311-318.
- MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F. Jr. & PIONTELLI, E. L. 1990. *Endophyte-Host association in forage grasses. XIII. Acremonium chilense, an undescribed endophyte occurring in Dactylis glomerata*. Mycotaxon **39**: 441-454.

- MULLER, H. J. 1964. *The relation of recombination to mutational advance*. Mutation Research **1**: 2-9.
- NEILL, J. C. 1940. *The endophyte of ryegrass (Lolium perenne L.)*. N. Z. J. Sci. Technol. Sec. A. **21**: 280-291.
- NEILL, J. C. 1941. *The endophytes of Lolium and Festuca*. N. Z. J. Sci. Technol. Sec. A. **23**: 185-193.
- NOVAS, M. V. 2004. *Interacción de los endofitos fúngicos de gramíneas con el hospedante, las micorrizas y el medio ambiente*. Tesis doctoral. Dir: Dr. Daniel Cabral y Dra. Alicia Godeas.
- NOVAS, M. V., GENTILE, A. & CABRAL, D. 2003. *Comparative study of growth parameters on diaspores and seedlings between populations of Bromus setifolius from Patagonia, differing in Neotyphodium endophyte infection*. Flora **198** (6): 421-426.
- OHTA, T. 1992. *The nearly neutral theory of molecular evolution*. Annual Reviews of ecology and Systematics **23**: 263-286.
- OHTA, T. 1995. *Synonymous and nonsynonymous substitutions in mammalian genes and the nearly neutral theory*. Journal of Molecular Evolution **40**: 56-63.
- PAGE, R. D. M. 1996. *TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers*. Computer Applications in the Biosciences **12**: 357-358.
- PAGE, R. D. M. & CHARLESTON, M. A. 1998. *Trees within trees: phylogeny and historical associations*. Trends in Ecology and Evolution **13**: 356-359.
- PAGE, R. D. M. & HOLMES, E. C. 1998. *Molecular Evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford.
- PARODI, L. R. 1950. *Las gramíneas tóxicas para el ganado en la República Argentina*. Rev. Arg. Agron. **17**(3): 163-228.
- POMILIO, A. B.; ROFI, R. D.; GAMBINO, M. P.; MAZZINI, C. A. & DEBENEDETTI DE LANGENHEIM, R. T. 1989. *The lethal principle of Poa huecu (coirón blanco): a plant indigenous to Argentina*. Toxicon **27**: 1251.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 1998. *MODELTEST: testing the model of DNA substitution*. Bioinformatics **14**: 817-818.
- RAISBECK, M. F.; ROTTINGHAUS, G. E. & KENDALL, J. D. 1991. *Effects of naturally occurring mycotoxins on ruminants*. En Mycotoxins and Animals Foods, ed. J.E. Smith, R.S. Henderson, pp: 647-677. Boca Raton, FL: CRC Press.
- RENVOISE, S. A. & CLAYTON, W. D. 1992. *Classification and evolution of the grasses*. En: Grass evolution and domestication, Chapman, G. P. ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- RIVAS, H. & ZANOLLI, C. 1909. *La tembladera. Enfermedad propia de los animales herbívoros de las regiones andinas*. Rev. Fac. Agr. Vet. La Plata **5**: 5-35.

- RODRIGUEZ, F.; OLIVER, J. L.; MARÍN, A. & MEDINA, J. R. 1990. *The general stochastic model of nucleotide substitution*. J. Theor. Physiol. **30**: 665-672.
- ROGER, A. J.; SANDBLOM, O.; DOOLITTLE, W. F. & PHILIPPE, H. 1999. *An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes*. Molecular Biology and Evolution **16**: 218-233.
- ROLSTON, M. P., STEWART, A. V., LATCH, G. C. M. & HUME, D. E. 2002. *Endophytes in New Zeland grass seeds: occurrence and implications for conservation of grass species*. New Zeland Journal of Botany **40**: 365-372.
- SAIKKONEN, K., HELANDER, M. L., FAETH, S. H., SCHULTNESS, F. & WILSON, D. 1999. *Endophyte-grass-herbivore interactions: The case of Neotyphodium endophytes in Arizona fescue populations*. Oecologia **121**: 411-420.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. *The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology and Evolution **12**: 391-404.
- SAMPSON, K. 1933. *The systematic infection of grasses by Epichloë typhina* (Pers.) Tul. Transactions of the British Mycological Society **18**: 30-47.
- SCHARDL, C. L. 1996. *Epichloë species: fungal symbionts of grasses*. Annual Review of Phytopathology **34**: 109-130.
- SCHARDL, C. L.; LIU, J.; WHITE, J. F. Jr.; FINKEL, R. & SIEGEL, M. 1991. *Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens*. Pl. Syst. Evol. **178**: 27-41.
- SCHARDL, C. L. & SIEGEL, M. R. 1993. *Molecular genetics of Epichloë typhina and Acremonium coenophialum*. Agric. Ecosyst. Environ. **44**:169-185
- SCHARDL, C. L., LEUCHTMANN, A., TSAI, H. F., COLLET, M. A., WATT, D. M. & SCOTT, D. B. 1994. *Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen Epichloë typhina*. Genetics **136**: 1307-1317.
- SCHARDL, C. L. & CLAY, K. 1997. *Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens*. En: The Mycota V, part B. Plant Relationships, eds. Carroll, G. & Tudzynsky. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; CHUNG, K. R.; PENNY, D. & SIEGEL, M. R. 1997. *Coevolution by common descent of fungal symbionts (Epichloë spp) and grass hosts*. Molecular Biology and Evolution **14**: 133-143.
- SCHARDL, C. L. & PHILLIPS, T. D. 1997. *Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going?* Plant disease: **81**(5): 430-438.
- SCHARDL, C. L. & LEUCHTAMNN, A. 1999. *Three new species of Epichloë symbiotic with North American Grasses*. Mycologia **91**: 95-107.
- SCHOLTZ, A. 1985. *Palynology of the upper Cretaceous lacustrine sediments of the Arnot pipe, Banke, namaqualand*. Ann. SA Mus **95**: 1-109.

- SCOTESE, C. R. 1997. *Palaeogeographic Atlas: Palaeomap Project. Report 90-0497*. University of Texas at Arlington, Texas.
- SHANTZ, H. L. 1954. *The place of grasslands in the earth's cover of vegetation*. Ecology **35**: 143-145.
- SHARP, P. M. & LI, W. S. 1987. *The rate of synonymous substitutions in enterobacterial genes is inversely related to codon usage bias*. Molecular Biology and Evolution **4**: 222-230.
- SIEGEL, M. R.; JOHNSON, M. C.; VARNEY, D. R.; NESMITH, W. C. & BUCKNER, R. C. 1984. *A fungal endophyte in tall fescue: incidence and dissemination*. Phytopathology **74**: 932-937.
- SIEGEL, M. R.; LATCH, G. C. M.; BUSH, L. P.; FANNIN, N. F.; ROWAN, D. D.; TAPPER, B. A.; BACON, C. W. & JOHNSON, M. C. 1990. *Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response*. Journal of Chemical Ecology **16**: 3301-3315.
- SIESSER, W. G. 1978. *Aridification of the Namib Desert: Evidence from ocean cores*. En: Antarctic glacial history and world palaeoenvironments. Van Zinderen Bakker, E. M ed. Balkema, Rotterdam.
- SIMON, B. K. & JACOBS, S. W. 1990. *Gondwanan grasses in the Australian flora*. Austrobaileya **3**: 239-260.
- SORENG, R. J., DAVIS, J. I & DOYLE, J. J. 1990. *A phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation in Poaceae subfam. Pooideae*. Plant Systematic and Evolution **172**: 83-97.
- SPIERING, M. J., WILKINSON, H. H., BLANKENSHIP, J. D. & SCHARDL, C. L. 2002. *Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte Neotyphodium uncinatum*. Fungal Genetics and Biology **36**: 242-254.
- STEBBINS, G. L. 1956. *Cytogenetics and evolution of the grass family*. American Journal of Botany **43**: 890-905.
- STERWART, C. B., SCHILLING, J. W. & WILSON, A. C. 1987. *Adaptative evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters*. Nature **330**: 401-404.
- SWOFFORD, D. L. 1993. PAUP, *Phylogenetics Analysis Using Parsimony, version 3.1. Program and documentation*. Laboratory of Molecular Systematics, Smithsonian Institution, Washington.
- SWOFFORD, D. L. 1998. *PAUP*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* an other methods)*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. 1997. *The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. Nucleic Acids Research **24**: 4876-4882.
- TSAI, H. F., LIU, J. S., STABEN, C., CHRISTENSEN, M. J., LATCH, G. C. M., SIEGEL, M. R. & SCHARDL, C. L. 1994. *Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with Epichloë species*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA **91**: 2542-2546.

- USPHALL, A. 1981. *Naturally occurring diploid isolates of Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology **122**: 7-10.
- VAN HOEK, A., VAN ALEN, T. A., SPRAKEL, V. S. I., LEUNISSEN, J. A. M., BRIGGE, T., VOGELS, G. D. & HACKSTEIN, J. H. P. 2000. *Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates*. Molecular Biology and Evolution **17**: 251-258.
- VON BEROLDINGEN BLAKE, E. T., HIGUCHI, R., SENSABAUGH, G. F. & ERLICH, H. A. 1989. *Applications of PCR to the analysis of biological evidence*. En: PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, ed. H. A. Erlich, pp. 209-223. Stockton University Press, New York.
- WATSON, L. & DALLWITZ. 1992. *The grass genera of the world*. CAB International, Wallingford, UK.
- WHITE, J. F. Jr. 1987. Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. Plant disease **71**: 340-342.
- WHITE, J. F. Jr. 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. Mycologia **80**: 442-446.
- WHITE, J. F. Jr. 1994. Endophyte-host association in grass. XX. Structural and reproductive studies of *Epichloë amarillans* sp. nov. Mycologia **86**: 571-580.
- WHITE, J. F. Jr., BREEN, J. P. & MORGAN-JONES, G. 1991b. *Substrate utilization in selected Acremonium, Atkinsonella and Balansia species*. Mycologia **83**: 601-610.
- WHITE J.F., MORGAN-JONES G. & MORROW A. C. 1993. *Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of Acremonium endophytes*. Agric. Ecosyst. Environ. **44**:13-37
- WHITE, J. F. Jr., SHARP, L. T., MARTIN, T. I. & GLENN, A. E. 1995. *Endophyte-host associations in forage grasses. XXI. Studies on the structure and development of Balansia obtecta*. Mycologia **87** (2): 172-181.
- WHITE, J. F. Jr.; MARTIN, T. I. & CABRAL, D. 1996. *Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by Acremonium endophytes on the phylloplanes of Agrostis hiemalis and Poa rigidifolia*. Mycologia **88** (2): 174-178.
- WHITE, J. F. Jr, MEYER, W., SULLIVAN, R., MOY, M., BALADY, G. & CABRAL, D. 2001. *Evolution of Epichloë /Neotyphodium endophytes*. En: Paul, V. H., Dapprich, P. D. ed. The Grassland Conference 2000. Proceedings of the 4th International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium. Pp. 17-29.
- WHITE, J. F. Jr.; SULLIVAN, R. F.; BALADY, G. A.; GIANFAGNA, T. J.; YUE, Q.; MEYER, W. A. & CABRAL, D. 2001. *A fungal endosymbiont of the grass Bromus setifolius: Distribution in some Andean populations, identification and examination of beneficial properties*. Symbiosis **31**: 241-257.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1989. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. En: PCR Protocols: A guide to methods and applications, ed. M. A. Innis, D. h. Gelfand, J. J. Sninsky & t. J. White, pp. 315-322. Academic Press, New York.

- WILKINSON, H. H., SPOERKE, J. M. & PARKER, M. A. 1996. *Divergence in symbiotic compatibility in a legume Bradyrhizobium mutualism*. *Evolution* **50**: 1470-1477.
- WILKINSON, H. H. & SCHARDL, C. L. 1997. *The evolution of mutualism in grass-endophyte associations*. En: Bacon, C. W., Hill, N. S. ed Neotyphodium/Grass interactions. Proceedings of the Third International Symposium on Acremonium/Grass Interactions. Pp. 13-25.
- WILKINSON, H. H., SIEGEL, M. R., BLANKENSHIP, J. D., MALLORY, A. C., BUSH, L. P. & SCHARDL, C. L. 2000. *Contribution of fungal loline production to protection from aphids in a grass-fungus mutualism*. *Mol. Plant-Microbe Interact* **13**: 1027-1033.
- YANG, Z.; KUMAR, S. & NEI, M. 1995. *A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences*. *Genetics* **141**: 1641-50.
- YEN, T. J.; GAY, D. A.; PACHTER, J. S. & CLEVELAND, D. W. 1988. *Mol. Cell Biol.* **8**: 1224-1235.
- ZUCKERKANDL, E. & PAULING, L. 1965. *Evolutionary divergence and convergence in proteins*. En: *Evolving genes and proteins*, eds. V. Bryson and Vogel, H.J., pp. 97, Academic Press.
- ZURAWSKI, G. & CLEGG, M. T. 1987. *Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies*. *Annu. Rev Plant Physiology* **38**: 391-418.

