

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**TESIS**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pholisma*  
*culiacanum* Y.**

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**ORLANDO OMER LINARES HOLGUÍN**

**DIRECTOR DE TESIS INTERNO  
DR. PEDRO SANCHEZ PEÑA**

**DIRECTOR DE TESIS EXTERNO  
DR. FRANCISCO MOLINA FREANER**

**CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, ABRIL DE 2013**

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **ORLANDO OMER LINARES HOLGUÍN** BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CONSEJO PARTICULAR**

**DIRECTOR DE TESIS INTERNO**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. PEDRO SANCHEZ PEÑA**

**DIRECTOR DE TESIS EXTERNO**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. FRANCISCO MOLINA FREANER**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. SAÚL PARRA TERRAZAS**

**ASESOR**

  
**Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.**

\_\_\_\_\_  
**DR. MANUEL VILLARREAL  
ROMERO**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JOSÉ ÁNGEL  
LÓPEZ VALENZUELA**

**ASESOR**

\_\_\_\_\_  
**DR. DANIEL NICKRENT**

**CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, ABRIL 2013**

## DEDICATORIAS

En forma de tributo dedico este trabajo de tesis a los siguientes seres humanos;

A mi esposa Brenda quien ha sido mi compañera, mi inspiración, mi conciencia, mi aliento y apoyo durante este tiempo, gracias por todo tu amor, la dicha y felicidad que has traído a mi vida y por el hermoso e inquieto hijo que nos regalaste. Te amo

A mi hijo por ser la nueva luz que guía mis pasos y por la inmensa felicidad que has traído a mi vida. Te amo

A mis padres por formarme en los valores familiares, por enseñarme el esfuerzo y el trabajo y su apoyo en todos los años previos a esta etapa y aun en ella. Los amo

A mis hermanos Osvaldo y Olimpia por ser únicos e irremplazables. Los amo

A mi director de tesis Dr. Pedro Sánchez Peña, por su apoyo, por tener fe y creer en mí y sobre todo por su vivo ejemplo del que hacer y de la responsabilidad social del investigador. Gracias Dr. Pedro

A mi director de tesis Dr. Francisco Molina Frenar por cobijarme y aceptarme en su laboratorio y asesorarme, por ser un vivo ejemplo de lo que un investigador y ser humano debe ser. Y por los consejos científicos, morales y espirituales. Mil Gracias Dr. Molina.

A mi director de tesis Dr. Daniel Nickrent por todo lo que me enseñó y compartió antes, durante y después de mi estancia en Carbondale Illinois.

A mi otra familia los Rodríguez-García; Suegros, Gaby, Erwin, Rigo y Rosi por los consejos, palabras de apoyo y sobre todo por cuidar de mi esposa e hijo en mis días de ausencia, sin su apoyo esto tampoco sería posible.

A todos mis amigos de la Maestría en Ciencias Agropecuarias por darme la oportunidad de acompañarlos en este camino y compartir tantas horas juntos. Ha sido un placer.

A mis amigos del ERNO Jechu, Daniel, Anabel, Aidé, Alina, Adán, Sandra, Nora y Hannes por recibirme como uno más de ustedes y permitirme ser parte de su vida durante un par de meses.

A Jechu por ser tan amable y paciente, sin tu ayuda y experiencia esto definitivamente no sería posible.

A la DGIP de la UAS y al Programa PROFAPI 165 por el apoyo económico para la realización de esta tesis de maestría.

A José Fulgencio Martínez Rodríguez técnico de tiempo completo del Laboratorio de Ecología molecular y funcional del Instituto de Ecología de la UNAM por su asistencia en las técnicas moleculares.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa le agradezco con un sentimiento en lo hondo de mi ser, pues no tengo palabras que puedan expresar mi gratitud hacia esta magnífica institución.

Al Colegio de Ciencias Agropecuarias y a quienes lo dirigen por darme la oportunidad de cursar por sus aulas la Maestría en Ciencias Agropecuarias.

Al CONACYT por el reconocimiento a nuestro programa de maestría como un programa de calidad y por el apoyo económico otorgado durante estos dos años.

A la Facultad de Agronomía y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su arduo trabajo en pro de la educación y la formación de alumnos de calidad.

A la DGIP de la UAS y el Programa PROFAPI 165 por el apoyo económico para la realización de esta tesis de maestría.

A José Fulgencio Martínez Rodríguez técnico de tiempo completo del Laboratorio de ecología molecular y funcional del Instituto de Ecología de la UNAM por su asesoría en las técnicas moleculares.

## CONTENIDO

	ÍNDICE DE TABLAS	I
	ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	II
I	RESUMEN	IV
II	ABSTRACT	V
III	INTRODUCCIÓN	1
IV	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	1. <i>Pholisma culiacanum</i>	8
	2. Marcadores moleculares	10
	3. Estudios de diversidad genética en plantas parásitas	14
V	JUSTIFICACIÓN	18
VI	HIPÓTESIS	19
VII	OBJETIVO GENERAL	19
	1.- Objetivos específicos	19
VIII	MATERIALES Y MÉTODOS	20

	1. Selección de los sitios de muestreo	20
	2. Muestreo	20
	3. Extracción de ADN de tejido	21
	4. Amplificación de secuencias de ADN de cloroplasto	22
	5. Edición de secuencias	23
	6. Análisis de variabilidad	24
	7. Distribución de haplotipos	25
	8. Red de haplotipos	26
	9. Filogenia de haplotipos	26
IX	RESULTADOS	27
	1. Muestreo	27
	2. Amplificación de secuencias	27
	3. Análisis de variabilidad	28
	4. Distribución de haplotipos	31
	5. Red de haplotipos	33
	6. Filogenia de haplotipos	35

X	DISCUSIÓN	36
	1. Amplificación de secuencias	36
	2. Análisis de variabilidad	38
	3. Distribución de haplotipos	40
	4. Red y filogenia de haplotipos	40
XI	CONSERVACIÓN	43
XII	CONCLUSIÓN	44
XIII	RECOMENDACIONES	46
XIV	BIBLIOGRAFÍA	48
	APÉNDICE	56

## INDICE DE TABLAS

		PÁGINA
TABLA 1	Especies del genero <i>Pholisma</i> y sus hospederos.	10
TABLA 2	Diversidad genética de <i>Pholisma culiacanum</i> . Numero de haplotipos ( $h$ ), diversidad haplotipica ( $Hd$ ), numero de haplotipos considerando indeles ( $hi$ ), diversidad haplotipica considerando indeles ( $Hdi$ ), diversidad nucleotidica ( $\pi$ ), desviación estándar ( $\pm$ ).	29
TABLA 3	Análisis de la varianza molecular.	30
TABLA 4	Matriz de pares de distancia; sobre la diagonal distancias genéticas y bajo la diagonal distancias geográficas (Km).	30

## INDICE DE ILUSTRACIONES

		PÁGINA
ILUSTRACION 1	Haustorios de <i>Pholisma culiacanum</i> (flechas negras) y raíces del hospedero <i>Jatropha cordata</i> (flechas rojas).	3
ILUSTRACION 2	Ejemplos de plantas hemiparásitas y holoparásitas. Los cuadros amarillos indican las especies que parasitan las raíces y los cuadros verdes indican las especies que parasitan tallo y hoja (Bungard, 2004).	5
ILUSTRACION 3	Genomas y las regiones en ellos estudiadas. En el eje Y se muestra el tipo de genoma, en el eje X se muestran los tipos de análisis y dentro de cada cuadro se muestran las diferentes regiones utilizadas (Nickrent, 2006).	13
ILUSTRACION 4	Geles de electroforesis de los amplificadores del fragmento trnL 5'for - trnF (GAA) del ADN extraído por las diferentes metodologías. A) Marcador de peso molecular (MP), Krizman 2006 (1), Sánchez-Hernández 2006 (2), Amani et al., 2011 (3), Porebski et al., 1997 (4), Sá 2011 (5). B) Todas las muestras son de la metodología desarrollada, Marcador de peso molecular (MP).	22

- ILUSTRACION 5 Regresión lineal. Relación entre las distancias genéticas 31  
y las distancias geográficas entre poblaciones de  
*Pholisma culiacanum*.
- ILUSTRACION 6 Distribución de haplotipos (sin considerar indeles) de 32  
*Pholisma culiacanum*. ALTATA (AL), CULIACAN  
(CU), TOSALIBAMPO (TO), SAN BLAS (SB),  
HERACLIO SB (HS), MASIACA (MA) y CERRO DE  
ALAMOS (CA).
- ILUSTRACION 7 Red de haplotipos. Generada con el programa Networks 34  
(Bandelt et al., 1998).
- ILUSTRACION 8 Filogenia de haplotipos de *Pholisma culiacanum* sin 37  
considerar indeles utilizando el método Neighbor  
Joining con el programa Mega (Tamura et al., 2007).  
Los valores de bootstrap son de 1,000 replicas. El  
marco muestra un acercamiento de las ramas  
superiores.
- ILUSTRACION 9 Región del trn T-L-F de cloroplasto. En rojo se muestra 38  
el tamaño amplificado y los valores esperados de pares  
de bases (Nickrent., 2006).

## I. RESUMEN

*Pholisma culiacanum* es una holoparásita de raíz endémica del los estados de Sinaloa y Sonora. Además de la importancia cultural, alimenticia, biológica y evolutiva dada por su carácter parasitario, representa un buen modelo de interés agrícola como posible fuente de nutrientes y una oportunidad de entender los mecanismos moleculares del proceso de la fotosíntesis posterior al cambio del autotrofismo al parasitismo. Un paso importante en los estudios de cualquier área de las anteriores, es la determinación de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones y como se distribuye geográficamente. Hasta el momento no existen estudios de esta índole para esta planta. El presente trabajo producto de una investigación para la realización de tesis de maestría pretende contribuir a esclarecer esa falta de conocimiento. Se realizó una búsqueda y ubicación de poblaciones y áreas de distribución (7 en total); se analizaron 70 secuencias de una región de ADN de cloroplasto (Trnt-TrnF) para calcular los niveles de variación genética. La mayor parte de la variación se distribuyó dentro de las poblaciones (86.51%) y solo un 13.49% se detectó entre poblaciones. El valor de diversidad haplotípica global fue de 0.85 y el valor de diversidad nucleotídica total fue de 0.27. Se identificaron once haplotipos distribuidos en las 7 poblaciones estudiadas; se generaron la red y la filogenia de haplotipos. Los datos no mostraron evidencia de aislamiento por distancia; y con la información generada se plantearon zonas de explotación in situ y de conservación de recursos genéticos.

## II. ABSTRACT

*Pholisma culiacanum* is a root holoparasitic plant, endemic to the states of Sinaloa and Sonora. In addition to the cultural, food, biological and evolutionary value given by its parasitic nature, this species represents a good model of agricultural interest as a potential source of nutrients and as an opportunity to understand the molecular mechanisms that modified the process of photosynthesis after its change from autotrophy to parasitism. An important step in the study of any of the above themes is the documentation of genetic variability within and among populations and how it is distributed geographically. So far there are no such studies for this plant. This thesis work aims to clarify this lack of knowledge. We searched and located seven populations through the range of distribution, analyzed 70 sequences of a region of chloroplast DNA (TrnT-TrnF) to calculate levels of genetic variation. Most of the variation was distributed within populations (86.51%) and only 13.49% was detected among populations. The overall haplotype diversity value was 0.85 and the value of nucleotide diversity was 0.27. We identified eleven haplotypes distributed among seven populations studied. We generated an haplotype network and phylogeny. The data showed no evidence of isolation by distance, and with the information generated we suggest areas of exploitation in situ and for conservation of genetic resources.

### III. INTRODUCCIÓN

Las plantas parásitas tienen importancia en varios campos: agronómico, alimenticio, económico, cultural, biológico, científico y evolutivo. Juntas representan el 1% de todas las angiospermas con un aproximado de cuatro mil especies en 265 géneros a nivel mundial y 36 para México (Nickrent, comunicación personal). En el estado de Sinaloa existen 6 géneros de plantas parásitas entre ellas el género *Pholisma*.

La distribución del género *Pholisma* se ubica en región noroeste de México desde el centro del estado de Sinaloa hasta la frontera con Estados Unidos en los estados de California y Arizona (Yatskievych et al., 1986). De las 3 especies con que cuenta el género, *Pholisma culiacanum* es endémica de los estados de Sinaloa y Sonora.

El género *Pholisma* al igual que otros géneros de plantas parásitas es comestible, existen registros históricos del consumo por comunidades indígenas como los Papagos, Cocopas y Kawaiisu (Gray 1854; Thackery 1953; Dressler 1968) y aunque para *Pholisma culiacanum* no hay registros históricos se tiene conocimiento de su consumo en algunas comunidades de la región Norte de Sinaloa (observación personal).

Además de la importancia cultural, alimenticia, biológica y evolutiva dada por su carácter parasitario *Pholisma culiacanum* representa un buen modelo de interés agrícola como posible fuente de nutrientes y una oportunidad para entender los mecanismos moleculares involucrados en la modificación del proceso de la fotosíntesis posteriores al cambio hacia el parasitismo.

Un paso importante en los estudios de cualquier área de las anteriores mencionadas es la determinación de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones

de la especie, y como se encuentran distribuidas en el estado de Sinaloa. Sin embargo no existen hasta el momento estudios de esta índole para plantas parásitas del estado.

El presente proyecto pretende contribuir a esclarecer esa falta de conocimiento básico; se realiza una búsqueda y ubicación de nuevas poblaciones y áreas de distribución; se utilizan secuencias de ADN de diferentes regiones del cloroplasto para calcular los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones y así determinar la diversidad genética de *Pholisma culiacanum*, se plantean zonas de explotación in situ y de conservación de recursos genéticos.

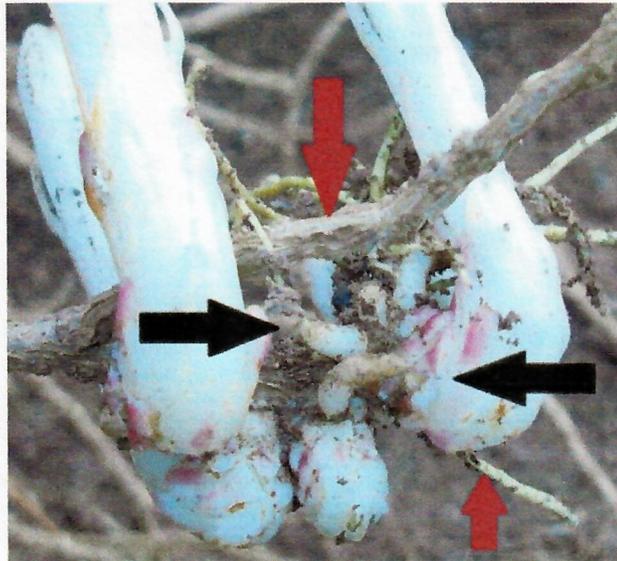
Los resultados de la investigación son de importancia para diferentes instituciones que colaboraron de alguna manera a la realización de este trabajo de investigación; a nivel local (Universidad Autónoma de Sinaloa, Ayuntamiento de Culiacán) estatal (Gobierno del estado de Sinaloa, COECyT), nacional (CONACyT, PROFEPA, SEMARNAT, CONANP, UNAM) e internacional (Global Information of Biodiversity, Missouri Botanical Garden, University of Arizona). Esto permite un intercambio de conocimiento científico entre instituciones, el fortalecimiento de las líneas de investigación, la vinculación académica, la divulgación científica y la formación de recursos humanos especializados en esta área del conocimiento.



Figura 1. Haustorios de *Pholisma culiacanum* (flechas negras) y raíces del hospedero *Crotopha cordata* (flechas rojas).

#### IV. REVISIÓN DE LITERATURA.

Dentro de las angiospermas existe dos grandes grupos desde el punto de vista nutricional: las autótrofas y las heterótrofas. Las primeras son las más comunes, estas producen su propio alimento principalmente a través del proceso de la fotosíntesis que les da su color característico verde. Las segundas son aquellas que carecen de la habilidad de ser autónomas en el proceso de nutrición y recurren a un tipo de relación parasitaria o simbiótica con otro ser vivo para obtener uno o alguno de los nutrientes que necesitan para sobrevivir. En general a las heterótrofas se les divide en micotróficas, y parásitas haustóricas (o simplemente parásitas). Las micotróficas son aquellas que obtienen nutrientes a través de una relación simbiótica por lo general con hongos micorizos. Mientras que las parásitas penetran directamente en el tejido del hospedero mediante una raíz modificada llamada haustorio que utilizan para obtener agua y ó nutrientes (Bungard, 2004) (Ilustración 1).



**Ilustración 1** Haustorios de *Pholisma culiacanum* (flechas negras) y raíces del hospedero *Jatropa cordata* (flechas rojas).

El grado de dependencia nutricional del hospedero varía entre las plantas parásitas clasificándolas en dos grupos: hemiparásitas y holoparásitas. Las hemiparásitas son parásitas fotosintéticas al menos en una fase de su ciclo de vida que obtienen por lo general agua y minerales disueltos de sus hospederos; se dividen en dos tipos de acuerdo a la necesidad estricta de un hospedero o no para completar su ciclo de vida; hemiparásitas obligados y hemiparásitas facultativos (Ilustración 2). Por su parte las holoparásitas carecen de la habilidad para realizar el proceso de la fotosíntesis y deben obtener agua y nutrientes (orgánicos e inorgánicos) de sus hospederos (Nickrent et al., 1998).

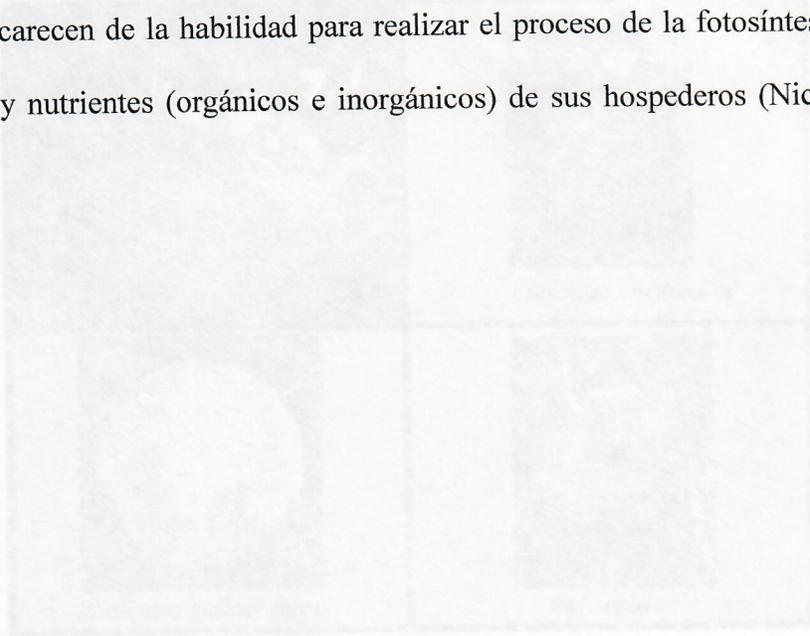


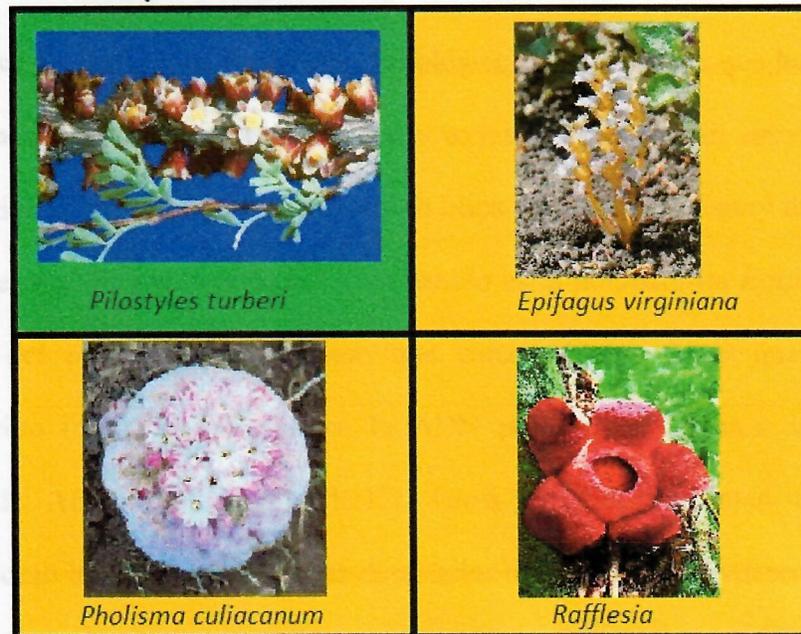
Ilustración 2. Ejemplos de plantas hemiparásitas y holoparásitas. Los cuadros amarillos indican las especies que parasitan las raíces y los cuadros verdes indican las especies que parasitan tallo y hojas (Dungrad, 2004).

El hábito de crecimiento de las parásitas es variable y depende de la especie, mientras que existen algunas que crecen unidas a su hospedero (tallo, tallo y hojas) solamente por su haustorio (*Phallaria*) otras crecen completamente inmersas en los tejidos vegetales del hospedero emergiendo solamente para florecer (*Rafflesia* y *Viscum*).

### Hemiparásitas



### Holoparásitas



**Ilustración 2** Ejemplos de plantas hemiparásitas y holoparásitas. Los cuadros amarillos indican las especies que parasitan las raíces y los cuadros verdes indican las especies que parasitan tallo y hoja (Bungard, 2004).

El hábito de crecimiento de las parásitas es variable y depende de la especie, mientras que existen algunas que crecen unidas a su hospedero (raíz, tallo y hojas) solamente por su haustorio (*Pholisma*) otras crecen completamente inmersas en los tejidos vegetales del hospedero emergiendo solamente para florecer (*Rafflesiaceae* y *Viscum*).

Han ocurrido dos grandes procesos durante la evolución del parasitismo; la reducción (y ó extrema modificación) de las características morfológicas y la convergencia evolutiva. La primera liderada por la modificación o pérdida del proceso de la fotosíntesis, de hojas, de partes florales y sexuales. Y la segunda por la convergencia en el habito parasitario en diferentes grupos de plantas angiospermas al menos 11 veces diferentes en el transcurso de la vida (Nickrent, 1998; Barkman et al., 2007).

A pesar de los grandes cambios morfológicos y fisiológicos que han ocurrido en las plantas parásitas, todas ellas o al menos todas las que se han estudiado hasta el momento retienen plástidos y los genomas en ellos, modificados o muy diferentes a los de sus antecesores o contemporáneos. Un ejemplo es la holoparásita *Epifagus* que tiene un genoma del plástido muy reducido que carece de los genes que controlan la clororespiracion (ndh), la fotosíntesis, la ADN polimerasa y genes del sistema de traducción de ADN (dePhampilis 1997). Otras especies presentan estos y otros fenómenos como las regiones genéticas duplicadas o retenidas y transferencia horizontal de genes (HGT) por mencionar algunos (Barkman et al., 2007; Bungard 2004). Así las plantas parásitas son un excelente modelo que nos permite tratar de entender la evolución y función en ausencia del proceso de la fotosíntesis, que es la principal función del los plástidos en las plantas autótrofas. Por lo tanto los datos moleculares pueden ser utilizados para estudiar la dinámica de la evolución molecular en las plantas parásitas examinando la estructura genética y los procesos bioquímicos subyacentes al cambio de hábitos alimenticios.

La importancia de las plantas parásitas no solo es desde el aspecto evolutivo o científico, también se da en el alimenticio, económico, cultural, biológico y agronómico.

Por ejemplo; *Pholisma* como fuente de nutrientes para los indios del noroeste de Norteamérica (USA y México), *Rafflesia* tiene importancia económica y cultural para sureste de Asia (Filipinas, Sumatra, Tailandia, Borneo y la Península Malaya), *Cuscuta* importancia biológica desde un punto de vista del control de plagas y desarrollo de herbicidas, y *Orobanche* parasitaria de especies con interés agronómico como tomate, berenjena, papas, col, pimientos, girasol, apio y frijol causando pérdidas en la producción.

Todas las características mencionadas anteriormente cobran una gran importancia para la investigación en las ciencias agropecuarias, pues descifrar los mecanismos previos y posteriores al proceso del cambio al parasitismo permitirá eficientar los procesos actuales de producción agrícola mejorando los procesos fotosintéticos de las especies de explotación agrícola. Además es de suma importancia encontrar e incluir nuevas especies comestibles que amplíen la gama de alimentos que son fuente de nutrientes para consumo humano y que tienen potencial de producción agronómico y alimenticio.

Aunque las plantas parásitas se encuentran ampliamente distribuidas ocupando la mayoría de los ecosistemas de la tierra, por lo general se les encuentra en bosques primarios o con un grado mínimo de perturbación. Juntas representan alrededor del 1% de todas las angiospermas contenidas en 22 familias, 265 géneros y 4 mil especies. La mayoría de ellas se encuentran restringidas a las subclases eudicotiledóneas Magnoliidae, Rosidae y Asteridae. Del total de estas plantas existen de 6-8 grupos taxonómicos que están representados completamente por holoparásitas (Balanophorales, Cynomoriaceae, Cytinaceae, Hydnoraceae, Lennoaceae, Rafflesiales, entre otros) (Nickrent et al., 1998; Reville et al., 2004).

México ocupa el 5° lugar mundial en riqueza de especies de plantas y el 6° en endemismos, con un aproximado de 25 mil especies vasculares de las cuales 15 mil son endémicas; es decir, el 50-60% de la flora mexicana no se encuentra en otra parte del mundo y si alguna de estas especies se extingue en México, desaparece del planeta (CONABIO 2008). Para el caso de plantas parasitas, Daniel Nickrent (comunicación directa) reporta para México 36 géneros de plantas parasitas.

En Sinaloa se encuentran de 5 a 6 géneros diferentes de especies de plantas parasitas (*Lennea*, *Orobancha*, *Pholisma*, *Cuscuta*, *Viscum*, entre otros) (Vega-Rito y Beltrán- Adrian, comunicación personal). Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la biología de plantas parásitas es muy pobre. Más aún, no sabemos cómo responde este grupo al disturbio antropogénico de su habitat, sobre todo en un país que tiene una tasa nacional de deforestación de 401 mil has/año (FAO 2005; FRA 2005; FRA 2006), y Sinaloa muestra una tasa de deforestación entre 0.2 y 0.5% atribuida en principalmente a las actividades de agricultura y extracción forestal (Aguilar 2000).

### 1. *Pholisma culiacanum*

*Pholisma culiacanum* es una holoparásita de raíz originaria del estado de Sinaloa, pertenece al género *Pholisma* que junto con el género *Lennea* forman la familia Lennoaceae; ambos géneros con hábitos parasitarios. La familia fue reconocida como tal en 1986 por George Yatskievych quien tras un análisis taxonómico exhaustivo divide al género *Pholisma* en tres especies; *Pholisma arenarium*, *Pholisma sonora* y *Pholisma culiacanum* (Yatskievych et al., 1986). Las tres especies son parásitas de alrededor de 8 especies diferentes de hospederos (Tabla 1).

*Pholisma arenarium* se distribuye al sur de los estados de California y Arizona en Estados Unidos de América; *Pholisma sonora* en el estado de Sonora y la frontera con el estado de Baja California Norte y; la distribución de *Pholisma culiacanum* comienza 15 km al sur de Culiacán y termina en la frontera norte con el estado de Sonora confinando la mayoría del territorio de distribución a el estado de Sinaloa (Yatskievych 1986). En cuanto al estatus del genero *Pholisma*; las dos primeras especies (*Pholisma arenarium* y *Pholisma sonora*) se encuentran bajo protección de la ley federal de protección a especies en peligro de extinción de Estados Unidos, sin embargo para *Pholisma culiacanum* y *Pholisma sonora* no existen estudios sobre su situación actual y mucho menos se les considera bajo protección en la legislación mexicana.

El género *Pholisma* es reportado como una planta comestible consumida por las culturas indígenas de los Papagos, Cocopas, Kawaiisu (Gray 1854; Thackery 1953; Dressler 1968). En Sinaloa se tiene conocimiento del consumo de una especie que concuerda con las características de *Pholisma culiacanum* en algunas comunidades de la región del Fuerte y Los Mochis, pero no existen registros científicos al respecto (observación personal).

Gracias a sus características biológicas parasitarias únicas, *Pholisma culiacanum* es de importancia e interés agrícola y alimenticio como fuente alternativa de nutrientes, posible domesticación y explotación agrícola ecológica sustentable o natural; de importancia cultural, en cuanto a su consumo por diferentes comunidades entre ellas algunas indígenas; de importancia biológica y evolutiva, pues su distribución es casi única del estado de Sinaloa y además Yatskievych en 1986 plantea que el área circundante a Culiacán es el centro de origen de la especie y por lo tanto del género.

## 2. Marcadores moleculares

La diversidad genética es uno de los niveles más básicos de la diversidad biológica, es en este nivel de organización (genes) donde se genera la variación que permite a las poblaciones evolucionar y adaptarse a su ambiente (Molina-Freaner et al 2009). Los genes están constituidos por secuencias de nucleótidos (A, T, G, C) y se definen como unidades

**Tabla 1** Especies del genero *Pholisma* y sus hospederos.

PARASITA	HOSPEDERO							PARASITA		
Especie	División	Clase	Orden	Familia	Genero/ especie	Autor	Fecha	Elevación	Ecología	Flowering time
<i>Pholisma arenarium</i>	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Varios arbustos	*	*	< 1900 m.	No común. arenas, dunas costeras, chaparral, desierto	Abril- Octubre
			Lamiales	Boraginaceae	<i>Eriodictyon</i>	*	*			
			Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	*	*			
<i>Pholisma caliacanum</i>	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia californica</i>	R. L. Dresler	11/08/1957	¿? < 80-300 m	Bosque tropical caducifolio, bosque espinoso	Julio - agosto-¿?
					<i>Jatropha curcas</i>	R. L. Dresler	11/08/1957			
					<i>Jatropha cordata</i>	O. Linares R. L. Dresler	11/07/2009 11/08/1957			

<i>Pholisma a sonorae</i>	<u>Magno liophyt a</u>	<u>Mag nolio psida</u>	<u>Asterales</u>	<u>Astera ceae</u>	<i>Ambrosia dumosa</i>	*	*	< 0– 200 m.	Dunas y suelos arenos os	Abri lMa yo	
					<i>Pluchea sericea</i>	*	*				
			<u>Lamiales</u>	<u>Boragi naceae</u>	<i>Tiquil ia</i>	<i>palmeri</i>	*				*
					<i>Tiquil ia</i>	<i>plicata</i>	*				*
		<u>Gnet ophyta</u>	<u>Gnet opsid a</u>	<u>Gnetales</u>	<u>Ephed raceae</u>	<i>Ephedra</i>	*				*
		<u>Magno liophyt a</u>	<u>Mag nolio psida</u>	<u>Fabales</u>	<u>Fabac eae</u>	<i>Psorothamnus emoryi</i>	*				*
	<u>Caryophy llales</u>			<u>Polyg onace ae</u>	<i>Eriogonum deserticola</i>	*	*				

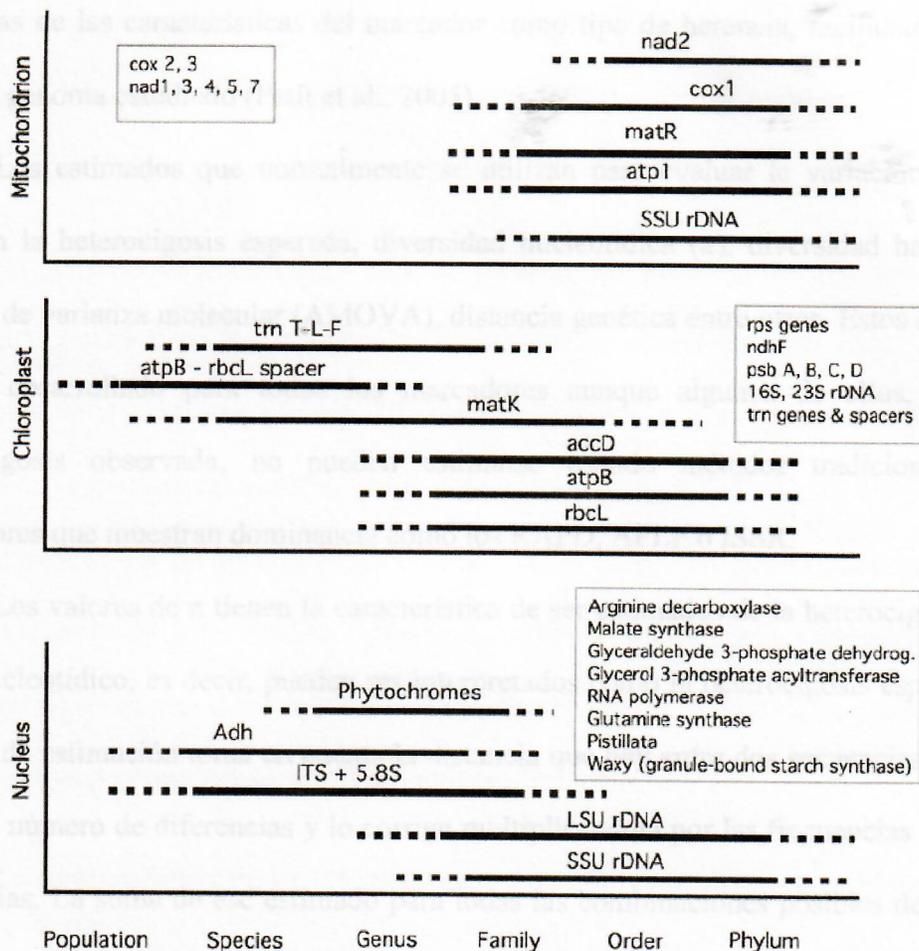
\* Autores, colectas y años diversos; AGFD Plant Abstract, 1998ff. Cothrun 1969. Nabhan 1980. Yatskievych and Mason, 1986. Yatskievych, 1985. Cothrun 1969, Felger 1980

<b>Parásit a</b>	<u>Magnoliophyt a</u>	<u>Magnoliopsid a</u>	<u>Asterale s</u>	Lennoacea e	<i>Pholisma a</i>	<i>culiacan a</i>
						<i>sonorae</i>
						<i>arenaria</i>

de herencia contenidos en el ADN. En los individuos que conforman poblaciones de cualquier especie puede haber variación en la secuencia de los nucleótidos del ADN, estas diferencias o mutaciones pueden ser causadas por procesos de sustitución (transiciones pirimida/pirimida purina/purina y transversiones purina/pirimida), inserción, delección e inversión.

En las plantas existen tres genomas; el nuclear, mitocondrial y del cloroplasto. El genoma mitocondrial de las plantas evoluciona de manera rápida en el orden de los genes, pero lento en el de secuencias nucleotídicas y es heredado de manera matrilineal. Estas características le hacen limitado en cuanto a la reconstrucción de historias poblacionales ya que los locus estudiados pudieron haber estado sujetos a selección o





**Ilustración 3** Genomas y las regiones en ellos estudiadas. En el eje Y se muestra el tipo de genoma, en el eje X se muestran los tipos de análisis y dentro de cada cuadro se muestran las diferentes regiones utilizadas (Nickrent, 2006).

Los enfoques que se han usado para entender la variación genética de los seres vivos incluyen isoenzimas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Molina-Freaner et al 2009), microsatélites y variación de secuencias polimórficas de ADN (Schlötterer 2004). La elección de los marcadores depende de varios factores, como el tipo de pregunta que se desea resolver (centros de origen, especies en peligro de extinción, conservación, etc.)

y algunas de las características del marcador como tipo de herencia, facilidad de uso y costo, y genoma estudiado (Petit et al., 2005).

Los estimados que normalmente se utilizan para evaluar la variación genética incluyen la heterocigosis esperada, diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplotípica, análisis de varianza molecular (AMOVA), distancia genética entre otros. Estos estimados se han desarrollado para todos los marcadores aunque algunos de ellos, como la heterocigosis observada, no pueden estimarse usando métodos tradicionales con marcadores que muestran dominancia como los RAPD, AFLP o ISSR.

Los valores de  $\pi$  tienen la característica de ser estimados de la heterocigosis en el nivel nucleotídico, es decir, pueden ser interpretados como la heterocigosis esperada. Su método de estimación toma en cuenta la distancia que hay entre dos secuencias de ADN como el número de diferencias y lo corrige multiplicándola por las frecuencias de ambas secuencias. La suma de ese estimado para todas las combinaciones posibles de pares de secuencias es  $\pi$ . Otro estimado de la diversidad genética en el nivel nucleotídico es el número de sitios segregantes  $S$  (Piñero et al 2008).

### **3. Estudios de diversidad genética en plantas parásitas**

La biodiversidad se define comúnmente como la variedad o variabilidad de los seres vivos y de los lugares donde viven, está incluye al menos tres niveles de organización biológica: 1) la diversidad genética de las poblaciones a nivel intraespecífico, 2) la diversidad de especies y, 3) la diversidad ecosistémica. El primer nivel (genes) es donde se genera la variación que permite a las poblaciones evolucionar y adaptarse, para lograr descifrar este nivel nos auxiliamos de la genética de poblaciones y

de la filogeografía que han desarrollado marcadores moleculares que permiten recopilar una enorme cantidad de información sobre los patrones de variación en prácticamente todos los grupos de organismos (Piñero et al 2008).

La genética de poblaciones trata de entender los mecanismos que determinan la diversidad genética y los cambios que ocurren a nivel genético dentro y entre poblaciones, incluyendo aquellos que llevan a la adaptación y la especiación, es decir, el cambio en las frecuencias alélicas en las poblaciones a través del tiempo. Estos cambios son ocasionados por las fuerzas evolutivas (la mutación, el flujo génico, la deriva génica y la selección natural) en conjunto, independientemente y ó con otros factores tales como el sistema reproductivo afectando los niveles de variación y la estructura genética de las poblaciones (sobre uno o más genes) (Hamilton 2009; Hedrick 2005)

La filogeografía estudia los procesos y principios que determinan la distribución espacial dentro y entre poblaciones de las variantes (o alelos) de los que se conocen o deducen sus relaciones filogenéticas, es decir, la distribución espacial de cualquier carácter genético. Estos estudios enfatizan la influencia de factores históricos (dispersión o vicarianza) en la distribución geográfica de linajes (Avice 2009).

Investigar la divergencia genética entre poblaciones es útil para el entendimiento del potencial evolutivo y de los ancestros de una especie, así como para obtener información en cuanto a prácticas de conservación (Thorogood et al., 2009).

El estudio de la diversidad genética y la filogeografía de las plantas parásitas y sus hospederos han empleado una amplia gama de marcadores moleculares, que incluyen isoenzimas (Mutikainen et al., 2002), AFLPs (Staton et al., 2009; Vaz et al., 2007; Huang

et al., 2012; Jerome et al., 2002; deVega et al., 2008), RAPD (Holzapfel et al., 2002), secuencias (Rich et al., 2008; Nickrent et al., 2004) y micro satélites (McLay et al., 2012; Beatty 2011). Sin embargo, pocos son los estudios a nivel mundial cuando se le compara con los análisis realizados en el resto de las plantas. Dadas las diferentes técnicas es difícil hacer comparaciones entre los índices de diversidad genética de las diferentes especies, al hacerlo se deben tomar con cautela estos datos, aunque sirven como un aproximado. Un ejemplo de los análisis que se abordan es la formación de razas, que puede ser consecuencia del aislamiento por distancia y la disminución del flujo genético entre poblaciones conspecíficas; se ha intentado establecer el papel de este fenómeno en las especies parásitas.

Aun cuando en la mayoría de los estudios de genética de poblaciones de plantas parásitas no se han encontrado datos significativos en cuanto al aislamiento por distancia, existen excepciones como el estudio realizado en *Viscum album* (Staton et al., 2009) donde se encontró que el limitado flujo génico entre parches de bosque donde se distribuía esta especie era el responsable del aislamiento por distancia. Otros investigadores reportan a las interacciones hospedero-parasito como importantes en la determinación de la estructura poblacional del hospedero (Jerome et al., 2002<sup>a</sup>; Mutikainen et al., 2002; deVega et al., 2008; Holzapfel et al., 2002). Estas y otras discrepancias al analizar la estructura genética resaltan la necesidad de más estudios a diferentes escalas espaciales y de diferentes especies con el fin de distinguir las influencias ambientales y evolutivas e identificar los patrones en la estructura genética.

En México el conocimiento sobre la genética de poblaciones de las plantas parásitas es muy limitado, solo existe un estudio de genética de poblaciones para una

planta parásita (García-Franco et al., 1998). Otro estudio es sobre la sistemática del género *Bdallophytum* de la familia Cytinaceae (Alvarado-Cárdenas 2009).

A nivel mundial existen pocas especies de plantas parásitas, destacando como las más importantes a las de la familia Loranthaceae (*Epifagus virginiana*, *Conocephala* sp.), Lecythidaceae (*Cassipouira* sp.) y el género *Rafflesia*. Mundialmente pocos son los estudios de genética de poblaciones, filogeografía, y filogenética en plantas parásitas realizadas en distintas especies. En México se han realizado escasos estudios de plantas parásitas y en estos ninguno para especies parásitas de Sinaloa.

Para la familia Lecythaceae incluyendo *Pholisma caliacaman* solo existen algunos estudios taxonómicos, morfológicos y bioquímicos previos (Kujit 1960, Cepeda y Cummings et al., 1998). Para *Pholisma arenarium* existen uno morfológico, uno bioquímico, uno filogenético (Cummings et al., 1998) y uno de etnobotánica donde se plantea el consumo y la importancia de *Pholisma sonora* y *Pholisma arenarium* como parte de la dieta de los indios Papagos, Cocopa y Kawispa (Theckery 1957). Sin embargo no existe ningún estudio ecológico, filogeográfico, filogenético o de genética de poblaciones para *Pholisma caliacaman*.

Dada la importancia agronómica, biológica, evolutiva y cultural de *Pholisma caliacaman*, el determinar la estructura genética poblacional y la distribución geográfica de los linajes genéticos permitirá definir áreas de explotación sustentable (agricultura ecológica o natural) y de conservación de recursos genéticos, pasos importantes para iniciar tanto un proceso de domesticación como un modelo de investigación con fines agrícolas. Con ello se pretende contribuir a esclarecer la falta de conocimiento general y de tipo biológico-evolutivo de la especie.

## V. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial existen pocos modelos de plantas parásitas; algunos de ellos son Orobancheae (*Epifagus virginiana*, *Conopholis* sp.), Convolvulaceae (*Cuscuta* sp.) y el género *Rafflesia*. Mundialmente pocos son los estudios de genética de poblaciones, filogeografía, y filogenética en plantas parásitas realizados en distintas especies. En México se han realizado escasos estudios de plantas parásitas y no existe ninguno para especies parásitas de Sinaloa.

Para la familia Lennoaceae incluyendo *Pholisma culiacanum* solo existen algunos estudios taxonómicos, morfológicos y bioquímicos previos (Kujit 1966; Copeland 1933; Cummings et al., 1998). Para *Pholisma arenarium* existen uno morfológico, uno bioquímico, uno filogenético (Cummings et al., 1998) y uno de etnobotánica donde se plantea el consumo y la importancia de *Pholisma sonora* y *Pholisma arenarium* como parte de la dieta de los indios Papagos, Cocopas y Kawaiisu (Thackery 1957). Sin embargo no existe ningún estudio ecológico, filogeográfico, filogenético o de genética de poblaciones para *Pholisma culiacanum*.

Dada la importancia agronómica, biológica, evolutiva y cultural de *Pholisma culiacanum*, el determinar la estructura genética poblacional y la distribución geográfica de los linajes genéticos permitirá delimitar áreas de explotación sustentable (agricultura ecológica o natural) y de conservación de recursos genéticos, pasos importantes para iniciar tanto un proceso de domesticación como un modelo de investigación con fines agrícolas. Con ello se pretende contribuir a esclarecer la falta de conocimiento general y de tipo biológico-evolutivo de la especie.

## VI. HIPÓTESIS Y MÉTODOS

Las poblaciones de *Pholisma culiacanum* no difieren en los niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones.

## VII. OBJETIVO GENERAL

Conocer el estado de la diversidad genética de *Pholisma culiacanum*.

### 1. Objetivos específicos.

- Determinar la variación genética dentro y entre poblaciones de *Pholisma culiacanum* analizando secuencias de ADN de cloroplasto.
- Identificar secuencias intergénicas de ADN de cloroplasto que muestren variabilidad genética en *Pholisma culiacanum*.
- Hacer una colección genética de especímenes de *Pholisma culiacanum*.
- Estandarizar una metodología efectiva de la extracción de ADN para *Pholisma culiacanum*.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Selección de los sitios de muestreo.

La información para determinar la ubicación geográfica las poblaciones fue obtenida de 5 diferentes fuentes; 1) Bases de datos del GIFB (Global Information of Biodiversity), 2) datos de colecta de diferentes jardines botánicos y herbarios de USA (Missouri Botanical Garden, Universidad de Arizona), 3) registros de los herbarios de Sinaloa, 4) comunicación directa con los investigadores de los estados de Sinaloa (Escuela de Biología y Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa) y Sonora (UNAM) y 5) exploración de áreas nuevas que cumplieran con las características de las de la distribución de la especie.

### 2. Muestreo.

Los estudios de diversidad genética en plantas parásitas son muy escasos; sin embargo, se recomienda hacer muestreos de al menos 10 individuos por población y máximo 30, con una separación entre individuos de al menos 10 metros de distancia.

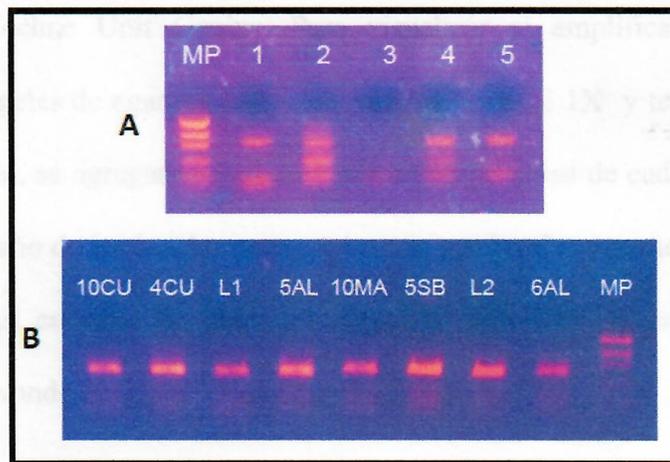
Al localizar la población se procedió a extraer los individuos con la ayuda una pala jardinera de mano, una espátula y una navaja. Una vez extraída la muestra, se lavó con agua destilada estéril contenida en una pizeta con la finalidad de retirar la máxima cantidad de partículas de suelo. Posteriormente se colocaron las plantas en bolsas de plástico nilón y se registraron los datos correspondientes a; población, fecha, número de individuo y las coordenadas geográficas del punto de colecta.

Las bolsitas con las muestras se depositaron en un contenedor de nitrógeno líquido con el objetivo de preservar el tejido en congelamiento y trasladarlo al Laboratorio de Ecología, ubicado en la Estación Regional Noroeste del Instituto de Ecología de la UNAM, en Hermosillo, Sonora, México, donde se guardaron en una ultra congeladora a -80 °C hasta el proceso de extracción del ADN.

Como grupo externo se utilizó un espécimen de herbario de *Lennea madreporoides* proporcionado amablemente por el Dr. Oscar Dorado de la Universidad Autónoma del estado de Morelos.

### 3. Extracción de ADN de tejido.

La metodología planteada inicialmente fue la del CTAB (Doyle 1991); sin embargo, la calidad del ADN extraído no era buena, esto obstruía la obtención de amplificadores y la estandarización de PCR para todos los individuos. Se probaron diferentes metodologías de extracción (Krizman 2006; Sánchez-Hernández 2006; Amani et al., 2011; Porebski et al., 1997; Sá et al., 2011, Cota-Sánchez et al., 2006) sin éxito, para finalmente desarrollar una correcta (Apéndice 1) basándonos en la propuesta por Azmat et al 2012. Las muestras de ADN fueron guardadas en una ultra congeladora a -80°C para su posterior amplificación (Ilustración 4).



**Ilustración 4** Geles de electroforesis de los amplificadores del fragmento trnL 5'for - trnF (GAA) del ADN extraído por las diferentes metodologías. A) Marcador de peso molecular (MP), Krizman 2006 (1), Sánchez-Hernández 2006 (2), Amani et al., 2011 (3), Porebski et al., 1997 (4), Sá 2011 (5). B) Todas las muestras son de la metodología desarrollada, Marcador de peso molecular (MP).

#### 4. Amplificación de secuencias de ADN de cloroplasto.

Se probaron diferentes regiones de ADN de cloroplasto que han mostrado variabilidad genética con anterioridad y que han sido utilizados con éxito en otros estudios (Amico et al., 2009; Taberlet et al., 1991; Heinze 2007; Nickrent et al 2009; Zuber et al., 2000; dePamphilis 1997) y fue la región intergénica del Trn L-F la que arrojó los niveles de variación necesarios para realizar nuestro estudio. Los primers utilizados (c-Tab F y f-Tab R) fueron los propuestos por Taberlet et al., 1991 conocidos también como trnL 5'-for y trnF-rev (Ilustración 9).

El protocolo de amplificación de PCR tipo touch-down de las regiones de cloroplasto fue el propuesto por Amico et al., (2007) para la amplificación de la región Trn L-F con una ligera modificación de temperaturas de alineación de 48°C a 50°C y de 52°C a 54°C respectivamente. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un

Termociclador Techne Unit Genius. Para visualizar el amplificado se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en TAE 1X y teñidos con Bromuro de etidio (0.003%), se agregaron 3  $\mu$ l de búfer de carga y 4  $\mu$ l de cada amplificado. Para identificar el tamaño de las bandas se agregó un marcador de peso molecular (Low Mass DNA Ladder) 3  $\mu$ l con 3  $\mu$ l de búfer de carga. Se corroboró la amplificación de los fragmentos observando el gel en un transluminador de luz UV.

## 5. Edición de secuencias

Los amplificados se enviaron a secuenciar a High-Throughput Sequencing Solutions, que pertenece al Departamento de Ciencias Genómicas de la Universidad de Washington en Seattle, Washington, Estados Unidos. Este laboratorio utiliza el método de secuenciación Dye-terminator sequencing, que consiste en teñir cada dNTP con un colorante fluorescente distinto que emite una longitud de onda particular y la secuencia resulta en un cromatograma producido por electroforesis capilar. La secuenciación fue en ambos sentidos, 5'-3' y 3'-5', utilizando los dos primers que se requirieron para amplificar cada muestra.

Para la edición de las secuencias se tomaron ambas secuencias para cada individuo (forward y reverse) y se ensambló el contig para cada muestra utilizando el programa Informático CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, 2009). Se realizaron los consensos de cada individuo tomando como criterio la calidad en cada sitio en los cromatogramas del "contig". Las secuencias fueron acotadas a los extremos para evitar la presencia de sitios variables debido a artefactos del proceso de secuenciación, ya que estos sitios mostraron muy baja calidad y son poco confiables. Donde hubiese alguna

discrepancia se utilizó el programa Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc., 2004-2006) para verificar la calidad de los nucleótidos secuenciados en cada una de las secuencias de los primers forward y reverse. Para la alineación de las secuencias se utilizó el programa ClustalW múltiple alignment del paquete informático BioEdit (Hall 1999).

## 6. Análisis de variabilidad

Para los análisis de variabilidad se estimaron los siguientes índices de diversidad genética auxiliándonos del programa DnaSP v. 5.10.01 (Rozas et al. 2010);

1.- Diversidad nucleotídica “ $\pi$ ”, que es la heterocigocidad a nivel de nucleótidos (Hartl y Clark, 2007), es decir, determina la proporción de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, para luego ponderar dichas diferencias con las frecuencias de las secuencias. Este parámetro equivale a la proporción de sitios nucleotídicos que son diferentes cuando se toman dos secuencias al azar (Hedrick 2005) y que se han acumulado en los dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original, se calcula con la siguiente ecuación (Nei 1987):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

donde  $n$  es el número total de alelos,  $x_i$  es la frecuencia de la secuencia  $i$ ,  $x_j$  es la frecuencia de la secuencia  $j$  y  $\pi_{ij}$  es la proporción de diferencias nucleotídicas entre las secuencias  $i$  y  $j$ .

2.- Se calculo la diversidad haplotípica  $Hd$  con la siguiente ecuación (Nei 1987):

$$Hd = \frac{2n(1 - \sum x_i^2)}{(2n - 1)}$$

donde  $x_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$ . La varianza de  $Hd$  fue calculada como (Nei 1987):

$$S_{Hd}^2 = \frac{2}{2n(2n-1)} \left\{ 2n(2n-1) \left[ \sum x_i^4 - (\sum x_i^2)^2 \right] + \sum x_i^2 - (\sum x_i^2)^2 \right\}$$

3.- Se realizó el mismo análisis, pero esta vez considerando la presencia de indeles como sitios informativos.

4.- Se realizó un análisis de la varianza molecular (por sus siglas en inglés AMOVA) para determinar cómo se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones, utilizando el programa Arlequín 3.1 (Laurent Excoffier 1998-2006).

5.- Se evaluó si las poblaciones de *P. culiacana* se ajustan al modelo de aislamiento por distancia (flujo génico entre poblaciones cercanas), mediante un análisis de correlación y regresión lineal entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones. Las distancias geográficas fueron calculadas con el Google Earth 6.1.0.5001, los análisis de regresión y correlación con Excel, (Microsoft 2007), y las distancias génicas fueron calculadas con el programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) y se utilizó el modelo de Maximum Composite Likelihood con la opción de complete deletion para no considerar indeles.

## 7. Distribución de haplotipos

Se utilizaron los programas Google Earth 6.1.0.5001, Paint 6.1 y Adobe Photoshop 12.0 para generar la ubicación geográfica de los haplotipos.

## 8. Red de haplotipos

Para construir la red de haplotipos primero se generó un archivo de haplotipos con terminación Roehl (\*.rdf) utilizando el programa DnaSP, en éste no se consideraron sitios alineados con gaps o datos perdidos ni sitios invariables (monomorficos). Este archivo está diseñado para ser utilizado por el software Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology 2004-2012) escrito por Arne Röhl que permite reconstruir filogenias intraespecificas (análisis de redes). El programa utiliza el método de “median Joining” (MJ) para construir redes de datos de poblaciones libres de recombinación genética; este programa combina las características del algoritmo de Kruskal para encontrar los arboles expandidos mínimos favorecidos por las conexiones más cortas, y el algoritmo heurístico de máxima parsimonia de Farris (MP) el cual secuencialmente agrega nuevos vértices llamados “vectores medios” (Bandelt et al 1999; Polzin et al., 2003). Se utilizaron las secuencias del grupo externo *Lennoa* como raíz de la red de haplotipos.

## 9. Filogenia de haplotipos

Para construir el árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) con el método Neighbor-Joining, con bootstrap de 1,000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Maximum Composite Likelihood con la opción Complete deletion para no considerar indeles. Se utilizaron las secuencias de *Lennoa* como grupo externo.

## **IX. RESULTADOS**

### **1. Muestreo**

Se localizaron 7 poblaciones diferentes de *Pholisma culiacanum* distribuidas en los estados de Sinaloa y Sonora separados al menos por una distancia de 30 km entre ellos (Tabla 4). Siguiendo las recomendaciones de la metodología se colectaron un promedio de 30 individuos por población. Se seleccionaron 10 individuos al azar por población y se les extrajo ADN con la técnica antes descrita.

### **2. Amplificación de secuencias**

El tamaño del producto amplificado de la región intergénica de cloroplasto trnT-L al trnT-F fue de aproximadamente 600pb de longitud.

Se amplificaron y se mandaron secuenciar 70 muestras de ADN de *Pholisma culiacanum* y 2 de *Lennea madreporoides*. De las 70, tres muestras presentaron bajos niveles de calidad de secuenciación por lo que se les clasificó como inapropiada y se descartaron del análisis para finalizar con un total de 67 muestras de *Pholisma culiacanum* analizadas. De las 2 de *Lennea*, se generaron las secuencias consenso, se les alineó para corroborar que no hubiera errores y se seleccionó una de ellas para utilizarla en el estudio.

Se analizaron las secuencias alineadas de *Pholisma culiacanum* y se generó una región compuesta por 735 nucleótidos, de éstos 261 sitios presentaron gaps o datos perdidos. De los 474 sitios restantes que excluían aquellos con gaps y datos perdidos, 151 fueron sitios invariables (monomórficos) y 323 sitios variables (polimórficos) con un

total de 398 mutaciones. Los 323 sitios polimórficos fueron sitios informativos de parsimonia; 251 con dos sustituciones, 69 con tres sustituciones y 3 con cuatro sustituciones (Apéndice 2), entendiendo por sustitución los cambios de un nucleótido por otro, por ejemplo: sitio 29 con dos sustituciones (g/c), sitio 89 con 3 sustituciones (a/g/t), sitio 282 con cuatro (a/c/g/t).

### 3. Análisis de variabilidad

Todas las poblaciones son polimórficas. Se encontraron 11 diferentes haplotipos en las 7 poblaciones de *Pholisoma culiacanum* sin considerar indeles como caracteres informativos. El número de haplotipos por población (h) varía de dos a cuatro (Ilustración 5). El haplotipo 5 fue el más frecuente con una frecuencia de 19 secuencias y se le puede encontrar en 4 poblaciones diferentes mientras que el haplotipo menos frecuente fue el 9 con una frecuencia de 1 secuencia (Apéndice 3).

La diversidad nucleotídica total ( $\pi$ ) sin considerar indeles fue de  $0.27366 \pm 0.02425$ , donde la población con mayor diversidad nucleotídica fue Masiaca con  $0.2990$  y la menor Tosalibampo con  $0.00069$ . La diversidad haplotípica global sin considerar indeles ( $H_d$ ) fue de  $0.855 \pm 0.024$  donde los valores más altos se compartieron entre dos poblaciones (Altata y Cerro de Álamos) con  $0.7330$  y la población con el valor más bajo fue Tosalibampo con  $0.4670$  (Tabla 2).

**Tabla 2** Diversidad genética de *Pholisoma culiacanum*. Numero de haplotipos ( $h$ ), diversidad haplotípica ( $Hd$ ), numero de haplotipos considerando indeles ( $hi$ ), diversidad haplotípica considerando indeles ( $Hdi$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), desviación estándar ( $\pm$ ).

Localidad	$h$	$Hd$	$hi$	$Hdi$	$\pi$
ALTATA	3	0.73300	10	1.00000	0.25957
CULIACÁN	4	0.72200	8	0.97222	0.12660
TOSALIBAMPO	2	0.46700	9	0.97778	0.00069
SAN BLAS	3	0.60000	9	0.97778	0.28244
HERACLIO	3	0.66700	6	0.84444	0.26463
SANB	2	0.53600	8	1.00000	0.29903
MASIACA	2	0.53600	8	1.00000	0.29903
CERRO DE ALAMOS	4	0.73300	10	1.00000	0.29605
TOTAL	11	0.855 ± 0.024	57	0.99367	0.27366 ± 0.02425

El análisis de variabilidad molecular se muestra en la tabla 3. El análisis de AMOVA muestra que la mayoría de las diferencias genéticas de acuerdo al modelo estudiado se debe más a las diferencias dentro de las poblaciones (86.51%) que a las que se presentan entre poblaciones (13.49%).

	CU	TO	SB	HS	MA	CA
ALTATA (AL)	*	0.554	0.515	0.596	0.467	0.639
CULIACAN (CU)	59.93	*	0.119	0.39	0.534	0.424
TOSALIBAMPO (TO)	189.27	227.15	*	0.344	0.517	0.392
SAN BLAS (SB)	172.61	202.95	36.59	*	0.59	0.493
HERACLIO SB (HS)	201.54	220.59	74.87	47.2	*	0.632
MASIACA (MA)	264.66	293.17	84.2	92.07	79.98	*
CERRO DE ALAMOS (CA)	297.34	232.63	118.14	124.83	105.46	34.3

El coeficiente de correlación de Pearson entre las distancias genéticas y las distancias geográficas no es significativo ( $p=0.825$ ) y su valor es negativo de  $-0.051368$ .

**Tabla 3** Análisis de la varianza molecular.

AMOVA				
Método de distancia: Tajima & Nei				
Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de varianza
Entre poblaciones	6	2247.257	23.44503 Va	13.49
Dentro de poblaciones	60	9021.418	150.3569 Vb	86.51
Total	66	11268.675	173.80201	

Incidencia de diferenciación genética  $F_{st} = 0.13490$

Test de significancia 1023 permutaciones

Va and  $F_{st}$  :  $P(\text{Valor rand.} > \text{valor obs.}) = 0.01173$

$P(\text{Valor rand.} = \text{valor obs.}) = 0.00000$

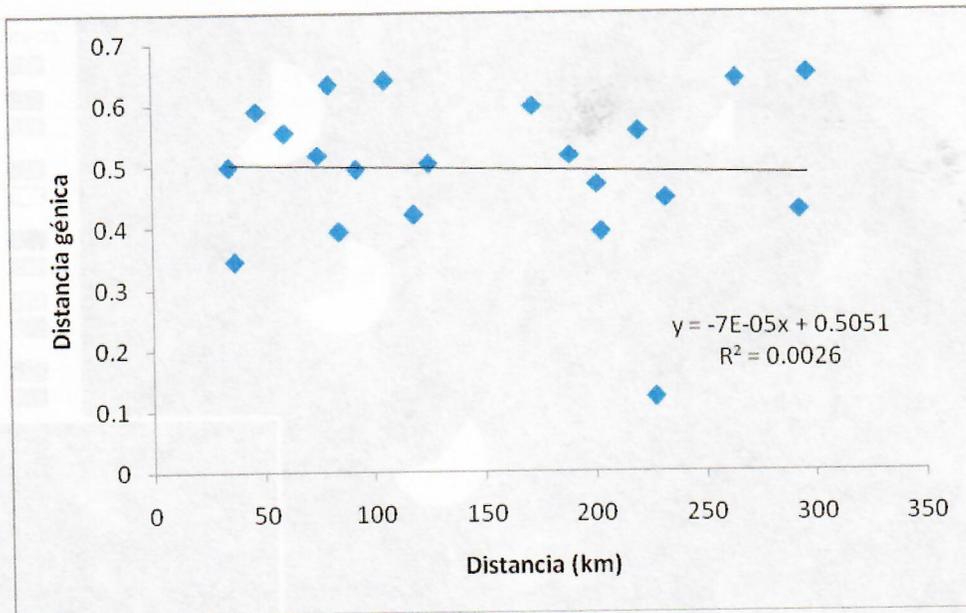
Valor de  $P = 0.01173 + -0.00304$

Referencia: Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992. Weir, B. S., 1996.

**Tabla 4** Matriz de pares de distancias; sobre la diagonal distancias genéticas y bajo la diagonal distancias geográficas (Km).

POBLACION	AL	CU	TO	SB	HS	MA	CA
ALTATA (AL)	*	0.554	0.515	0.596	0.467	0.639	0.647
CULIACAN (CU)	59.93	*	0.119	0.39	0.554	0.424	0.443
TOSALIBAMPO (TO)	189.27	227.15	*	0.344	0.517	0.392	0.418
SAN BLAS (SB)	172.61	202.95	36.59	*	0.59	0.493	0.501
HERACLIO SB (HS)	201.54	220.59	74.87	47.2	*	0.632	0.639
MASIACA (MA)	264.66	293.17	84.2	92.07	79.98	*	0.497
CERRO DE ALAMOS (CA)	297.34	232.63	118.14	124.83	105.46	34.3	*

El coeficiente de correlación de Pearson entre las distancias genéticas y las distancias (Tabla 4) geográficas no es significativo ( $p=0.825$ ) y su valor es negativo de  $-0.051268$ .

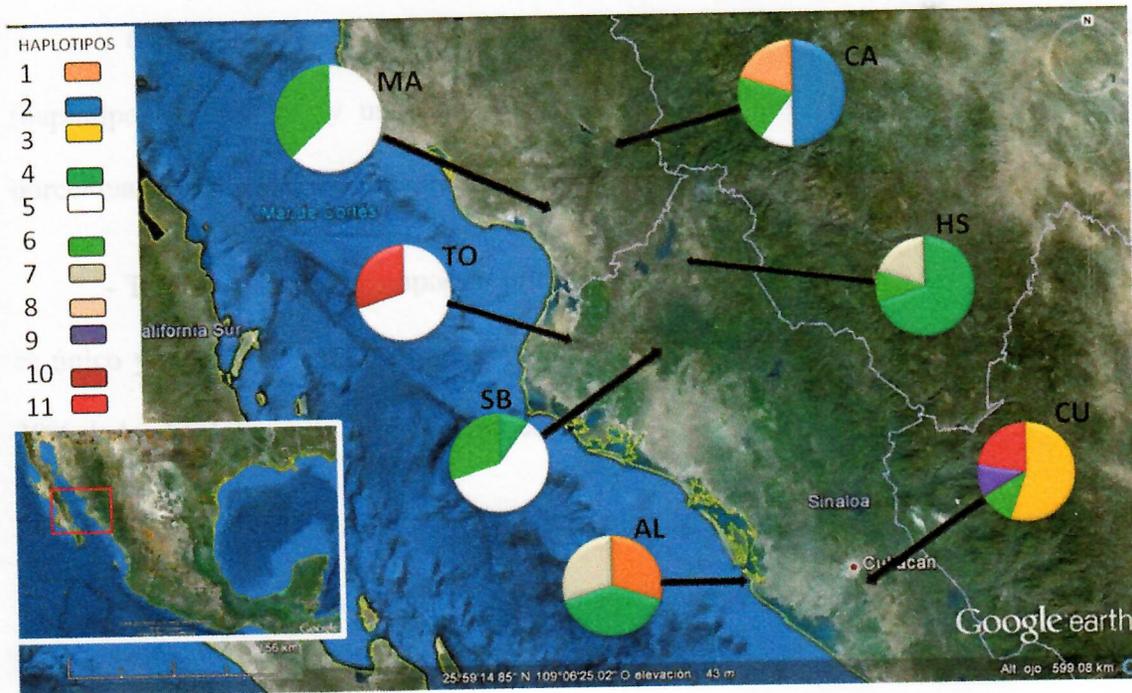


**Ilustración 5** Regresión lineal. Relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre poblaciones de *Pholisoma culiacanum*.

El modelo de regresión lineal simple sobre las mismas variables no es significativo ( $p=0.825$ ) y el valor del coeficiente de  $r$  cuadrada también es bajo  $= 0.0026$ . Los valores anteriores indican que no existe evidencia del aislamiento por distancia, con un flujo génico principalmente entre poblaciones cercanas.

#### 4. Distribución de haplotipos

La Ilustración 6 muestra la distribución geográfica de los haplotipos sin considerar indeles de la región trnL 5' for – trnF (GAA) en las poblaciones de *Pholisoma culiacanum*.



**Ilustración 6** Distribución de haplotipos (sin considerar indeles) de *Pholisma culiacanum*. ALTATA (AL), CULIACAN (CU), TOSALIBAMPO (TO), SAN BLAS (SB), HERACLIO SB (HS), MASIACA (MA) y CERRO DE ALAMOS (CA).

El haplotipo 5 se encuentra presente en las poblaciones norteñas de Tosalibampo, Masiaca, San Blas y Cerro de Álamos, sin embargo aunque es el de mayor frecuencia (19), no es el haplotipo más distribuido ó que se presenta en más poblaciones, ese puesto corresponde al haplotipo 6 presente en cinco de las 7 poblaciones (Culiacán, San Blas, Heraclío Sb, Masiaca y Cerro de Álamos).

Existen cuatro poblaciones que cuentan con haplotipos únicos que no se presentan en otras poblaciones;

- Altata está compuesta por tres haplotipos de los cuales uno (haplotipo 1) es único, los otros dos están compartidos con tres poblaciones más. En términos porcentuales el 30% de los haplotipos de Altata es único.

- Culiacán está compuesta por cuatro haplotipos de los cuales tres son únicos (haplotipos 3, 9 y 11) y uno compartido con otras cuatro poblaciones. En términos porcentuales el 88.9% de los haplotipos de Culiacán son únicos.

- Tosalibampo está compuesto por dos haplotipos de los cuales uno (haplotipo 10) es único y el otro es compartido por tres poblaciones más. En términos porcentuales el 30% de los haplotipos de Tosalibampo es único.

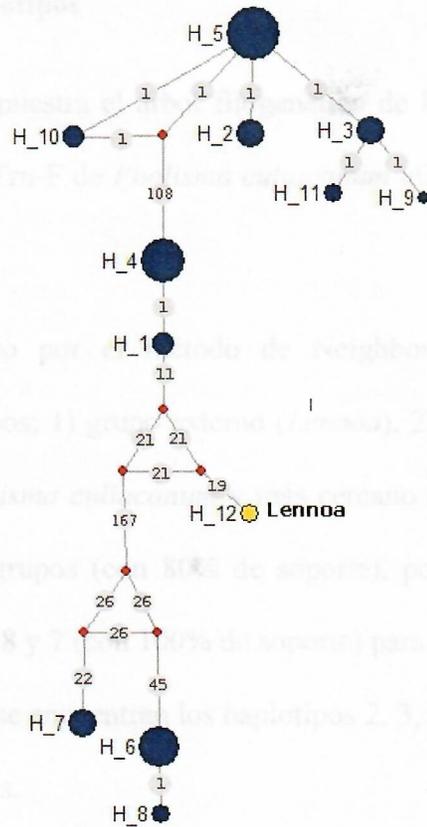
- Cerro de Álamos está compuesto por cuatro haplotipos de los cuales dos son únicos (haplotipo 2 y haplotipo 8) el resto se encuentra compartido por 5 poblaciones más. En términos porcentuales el 70% de los haplotipos de Cerro de Álamos son únicos.

El resto de las poblaciones (Masiaca, San Blas y Heraclio Sb) están compuestas en su totalidad por haplotipos presentes en otras poblaciones (haplotipos 4, 5, 6 y 7).

## **5. Red de haplotipos**

En la Ilustración 7 se muestra la red de haplotipos generada por el programa Network. En la imagen cada haplotipo está representado por un círculo color azul cuyo tamaño es proporcional a la frecuencia de las secuencias que lo componen y junto a ellos se encuentra escrito con letra el número del haplotipo. En círculos color rojo, se encuentran representados los vectores medios que fueron generados por el programa para unir haplotipos distantes, estos vectores medios pueden ser pasos mutacionales, subespecies extintas o no muestreadas. Los haplotipos y vectores medios están conectados por una serie de líneas que en su conjunto representan la red, en ellas se encuentra un círculo color gris de tamaño constante donde se indica con un número el total de mutaciones que existen entre un haplotipo /vector medio y otro.

## 6. Filogenia de haplotipos



Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.

**Ilustración 7** Red de haplotipos. Generada con el programa Networks (Bandelt et al., 1998).

El programa network generó una red de haplotipos considerando a *Lennoa* como la raíz, de la cual surgen tres grandes grupos de haplotipos:

- 1.- a 51 pasos mutacionales de Lennoa se encuentran los haplotipos 1 y 4 separados por un paso mutacional entre ellos.
- 2.- a 160 pasos mutacionales de Lennoa se encuentra un grupo formado por los haplotipos 2, 3, 5, 9, 10 y 11 separados a tres o menos pasos mutacionales entre ellos.
- 3.- a 207 pasos mutacionales de Lennoa se encuentra un grupo formado por los haplotipos 6, 7 y 8.

## 6. Filogenia de haplotipos

La Ilustración 8 muestra el árbol filogenético de los 11 haplotipos de la región intergénica del Trn-T al Trn-F de *Pholisma culiacanum* utilizando como grupo externo a *Lennoa madreporoides*.

El árbol generado por el método de Neighbor-Joining del software Mega reconoció 4 grandes grupos; 1) grupo externo (*Lennoa*), 2) los haplotipos 1 y 4 como el grupo más basal de *Pholisma culiacanum* y más cercano a *Lennoa*, 3) una rama que se bifurca en dos grandes grupos (con 80% de soporte), por un lado los haplotipos más cercanos a los basales 6, 8 y 7 (con 100% de soporte) para finalizar con 4) una rama (con 100% de soporte) donde se encuentran los haplotipos 2, 3, 5, 9, 10, 11 con valores de 30-50% de soporte entre ellos.



Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.

## X. DISCUSIÓN

### 1. Amplificación de secuencias.

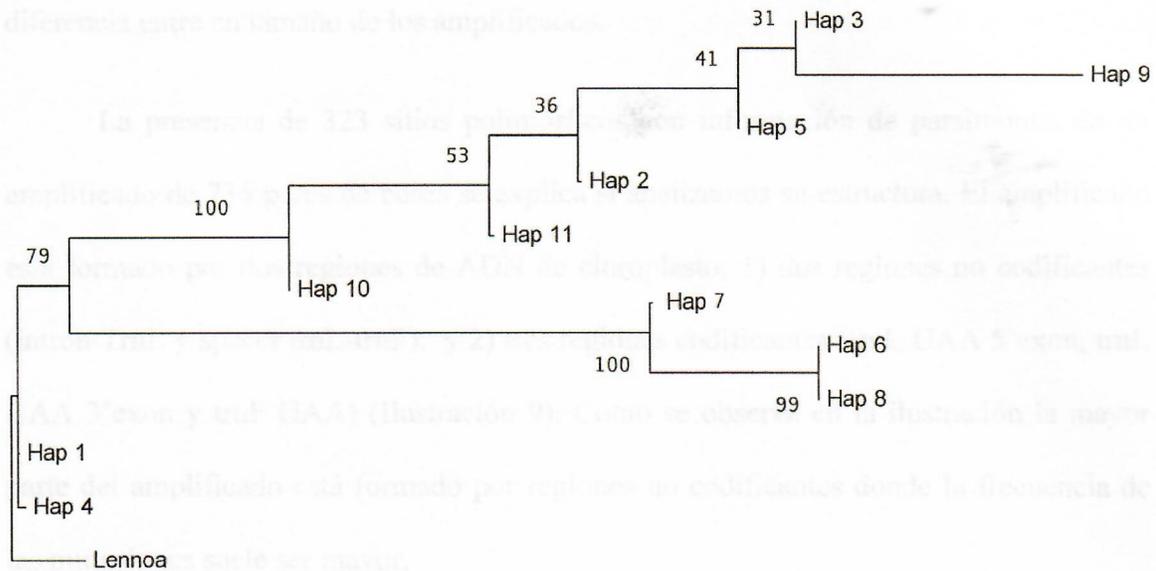
En la búsqueda de las regiones de ADN de cloroplasto que presentaran los niveles adecuados de variación genética se dividió en 3 grupos:

1.- Regiones que no se lograron amplificar ni secuenciar nada (rps432-trnL [UAA], trnT [GGU]-trnE [UUC], atpB-rbcL).

2.- Regiones que se lograron amplificar y secuenciar pero los niveles de variación genética detectadas no fueron adecuados (rpl32F – trnL [UAG], trnT [UGU] – trnL [UAA]).

3.- Regiones que se lograron amplificar, secuenciar y que mostraron los niveles de variación genética necesarios (trnL 5' for – trnF [GAA]).

El resultado del grupo uno se debe a dos razones principalmente; la primera es la mala calidad del ADN extraído y la segunda a la reducción del tamaño del cloroplasto o la pérdida de fragmentos de genes de cloroplasto al igual que otras plantas parásitas (Bungard 2004).



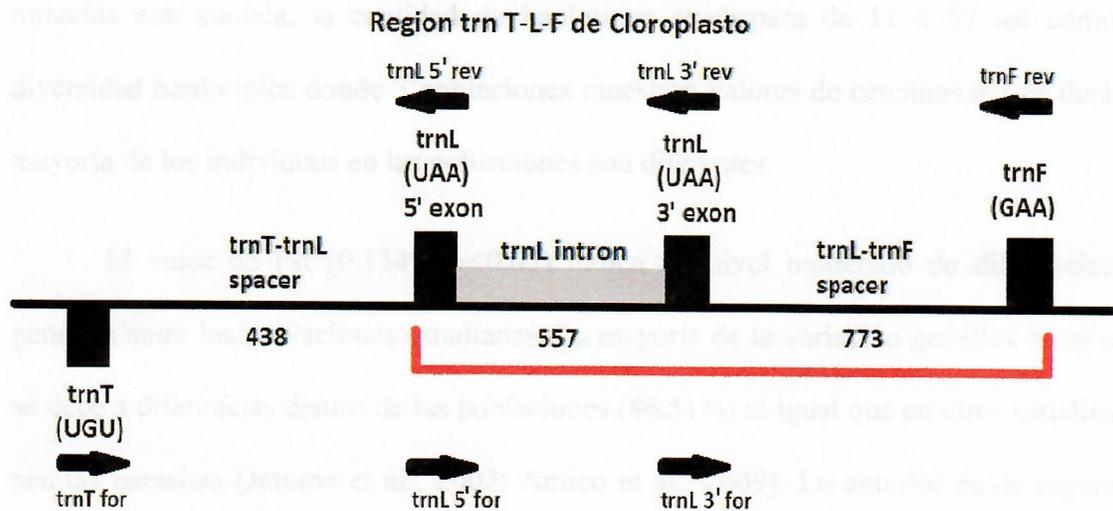
**Ilustración 8** Filogenia de haplotipos de *Pholisma culiacanum* sin considerar indeles utilizando el método Neighbor Joining con el programa Mega (Tamura et al., 2007). Los valores de soporte de bootstrap son usando 1,000 replicas.

Las secuencias analizadas en el grupo dos no presentaron niveles apropiados de variación genética por dos razones; 1) tamaño pequeño de amplificado y niveles bajos de variación genética (trnT [UGU] – trnL [UAA]), y 2) espacio intergénica pequeño y niveles bajos de variación genética debido a secuencias conservadas (rpl32F – trnL [UAG]) este gen (rpl32) codifica proteínas ribosomales 60S que se ha observado se conserva entre especies parasitas (Funk et al., 2007).

El grupo 3 pertenece a una región de cloroplasto conocida como trnT (UGU) al trnF (GAA) que consta de los genes que codifican trn (trnT UGU, trnL UGA, trnL UAA y trnF GAA), dos regiones intergénicas (trnT-trnL y trnL-trnF) y el intrón TrnL (Ilustración 9). La longitud esperada de este fragmento era de 1330 pares de bases, nuestro amplificado fue de aproximadamente 700 pares de bases, aquí al igual que en el grupo uno el carácter parasitario y la reducción del tamaño del cloroplasto explican la

diferencia entre en tamaño de los amplificadores.

La presencia de 323 sitios polimórficos con información de parsimonia, en un amplificado de 735 pares de bases se explica si analizamos su estructura. El amplificado está formado por dos regiones de ADN de cloroplasto; 1) dos regiones no codificantes (intrón TrnL y spacer trnL-trnF), y 2) tres regiones codificantes (trnL UAA 5' exon, trnL UAA 3' exon y trnF GAA) (Ilustración 9). Como se observa en la ilustración la mayor parte del amplificado está formado por regiones no codificantes donde la frecuencia de las mutaciones suele ser mayor.



**Ilustración 9** Región del trn T-L-F de cloroplasto. En rojo se muestra el tamaño amplificado y los valores esperados de pares de bases (Nickrent., 2006)

## 2. Análisis de variabilidad.

En general la diversidad genética de *Pholisma culiacanum* es alta, muestra de ello es que las 7 poblaciones están formadas por más de un haplotipo y aunque existen

poblaciones con solo dos (Masiaca y Tosalibampo) se puede considerar que todas las poblaciones son polimórficas.

La diversidad nucleotídica total es baja si la comparamos con la diversidad haplotípica; existe una cierta concordancia entre los datos analizados ejemplo de ello es el caso de Tosalibampo que por una parte es la población que presenta tanto la menor diversidad nucleotídica como la menor diversidad haplotípica con  $\pi=0.00069$  y  $Hd=0.4670$ .

Los análisis de la diversidad genética considerando indeles deberían de ser tomados con cautela, la cantidad de haplotipos se dispara de 11 a 57 así como la diversidad haplotípica donde 3 poblaciones muestran valores de cercanos a 1 es decir la mayoría de los individuos en las poblaciones son diferentes.

El valor de  $F_{st}$  (0.1349,  $p<0.05$ ) indica un nivel moderado de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas. La mayoría de la variación genética observada se debe a diferencias dentro de las poblaciones (86.51%) al igual que en otros estudios de plantas parásitas (Jerome et al., 2002; Amico et al., 2009). Lo anterior es de esperarse dado los valores observados (tabla 2) de diversidad haplotípica ( $Hd$ ) de las poblaciones donde la mayoría de los valores son superiores a 0.5 (excepto Tosalibampo) ya que altos niveles de varianza molecular dentro de poblaciones tiene como consecuencia altos niveles de diversidad haplotípica.

Dados los valores del análisis de correlación y regresión lineal entre las distancias génicas y las distancias geográficas de nuestro estudio no se puede afirmar que exista flujo génico principalmente entre poblaciones cercanas de *Pholisma culiacanum* ya que

los valores obtenidos son muy pequeños; este resultado coincide con los encontrados en otros estudios en plantas parásitas. Las poblaciones están aisladas pero no es, o no solamente por el factor de distancia, si esto fuera así existiría un valor alto de correlación entre los valores de distancias genética y geográfica. (Jerome et al., 2002<sup>a</sup>; Mutikainen et al., 2002; de Vega et al., 2008; Holzapfel S et al., 2002).

### **3. Distribución de haplotipos**

Los haplotipos no compartidos en las poblaciones de nuestro estudio, pueden ser consecuencia de mutaciones asociadas a eventos de colonización de nuevos nichos ecológicos de la planta parásita ó bien, debido a la expansión de los hospederos a nuevos territorios y la posterior colonización del parasito (deVega et al., 2008).

El alto porcentaje de variación dentro de las poblaciones de *Pholisma culiacanum* puede ser entendida como consecuencia del flujo génico dentro de las poblaciones (Garcia-Franco et al., 1998); esto contrasta con otros estudios de especies parásitas y de otras especies dependientes donde la mayoría de la variación genética encontrada fue entre poblaciones donde se plantea que estas plantas se caracterizan por una distribución fragmentada o distribución por parches, de la dependencia de las especies parásitas de sus hospederos (de Vega et al., 2009), de la historia de vida tanto del parasito y del hospedero, los eventos geográficos y estocásticos (cuellos de botella y evento fundador).

### **4. Red y Filogenia de haplotipos**

Por lo general el haplotipo más frecuente suele ser también el de mayor distribución; sin embargo en nuestro estudio el haplotipo más frecuente es el 5 y el de

mayor distribución es el haplotipo 6 que se encuentra presente en 5 de las 7 poblaciones muestreadas.

La red de haplotipos detecta al igual que la filogenia de haplotipos 3 grandes grupos a partir del grupo externo *Lennoa*, 1) haplotipos 1 y 4 más cercanos a *Lennoa* (parafilético) sin un antecesor común inmediato claro, 2) haplotipos 6, 7 y 8 (monofilético) con un antecesor común, 3) haplotipos 2, 3, 5, 9, 10 y 11 (monofilético) con un antecesor común.

El aspecto morfológico de las poblaciones varía geográficamente. Existen dos grandes grupos que se diferencian fácilmente, el primero formado por las poblaciones de Altata y Heraclio Sb, el segundo por poblaciones de Culiacán, Tosalibampo, San Blas, Masiaca y Cerro de Álamos. El primer grupo se caracteriza por tener tallos delgados únicos o ramificados que se originan en un solo haustorio más parecidos a los de *Lennoa*, mientras que el segundo grupo se caracteriza por tener tallos únicos gruesos mayores a 1 cm de diámetro. Estas observaciones visuales coinciden con la evidencia molecular producto de los análisis de filogenia y red de haplotipos que ubica a la mayoría de los haplotipos pertenecientes a las poblaciones del grupo uno alejados de los del grupo dos. En el caso de la red de haplotipos se observa una gran cantidad de pasos mutacionales entre los haplotipos que en su mayoría están formados por individuos que corresponden a las poblaciones de Altata y Heraclio Sb (Haplotipos 1, 4, 6, 7 y 8) y el resto de las poblaciones. De igual manera la filogenia de haplotipos ubica a estos mismos haplotipos de poblaciones morfológicamente diferentes más cercanos a *Lennoa*. Otro aspecto que es importante y se registro en campo fue que el suelo en cual se encontraron estas dos poblaciones es diferente al resto de las otras poblaciones; dunas costeras (Altata) suelo

arenoso (Heraclio Sb) y suelos arcillosos pertenecientes al bosque tropical subcaducifolio. Si revisamos la literatura observamos que *Pholisma arenarium* y *Pholisma sonora* comparten estos tipos de suelos (Tabla 1). Lo anterior sugiere que es posible que estas poblaciones de *Pholisma culiacanum* pertenezcan a otra especie del genero *Pholisma* o a una sub especie de *Pholisma culiacanum*. Estas observaciones sugieren que son necesarios más análisis comparativos para determinar el porqué de estas diferencias.

## XI. CONSERVACIÓN

Dados los altos niveles de diversidad genética haplotípica se recomienda establecer zonas de conservación en las áreas de distribución de *Pholisoma culiacanum* de las poblaciones de Culiacán, Cerro de Álamos y Altata. Conservando estas tres poblaciones se abarca casi la totalidad de la diversidad genética de la especie, además se aseguraría que la mayoría de los haplotipos únicos queden dentro de las áreas conservadas, mismas que son las áreas de distribución más afectadas por las actividades antropogénicas mencionadas anteriormente.

Con fines de explotación in situ se recomienda la zona de distribución de la población de Tosalibampo por dos razones; los índices de diversidad genética y haplotípica son los más bajos además de tener solo 2 haplotipos y aunque no se realizó el estudio correspondiente a abundancia en campo resultó ser la población más abundante.

## XII. CONCLUSIÓN

Se localizaron 7 poblaciones diferentes de *Pholisma culiacanum* distribuidas en los estados de Sonora y Sinaloa.

El fragmento amplificado de la región intergénica del cloroplasto trnT-L al trnT-F presenta la suficiente variabilidad genética para realizar estudios de genética de poblaciones, filogeografía y filogenética cuyo tamaño es de aproximadamente 735 pares de bases.

Las 7 poblaciones de *Pholisma culiacanum* son polimórficas. Se encontraron 11 haplotipos diferentes. El haplotipo más grande fue el 5 y el más distribuido fue el haplotipo 6.

La diversidad nucleotídica total sin considerar indeles fue de 0.27366, la población con mayor diversidad nucleotídica fue Masiaca y la menor Tosalibampo. La diversidad haplotípica global sin considerar indeles fue de 0.855 con los valores más altos en las poblaciones de Altata y Cerro de Álamos y el menor en Tosalibampo.

El AMOVA muestra que la mayoría de la diversidad genética es explicada por las diferencias genéticas dentro de las poblaciones con un 86.51% y solo un 13.49% debido a las diferencias entre poblaciones.

El valor de correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas es muy bajo -0.051268. No se puede asegurar que exista flujo génico principalmente entre poblaciones cercanas de *Pholisma culiacanum*, se plantea la posibilidad de aislamiento por mas mecanismos que el de la distancia geográfica.

XIII. En la red de haplotipos los haplotipos 1 y 4 son los más cercanos al grupo externo *Lennoa*, situación que corroboran los análisis filogenéticos donde los haplotipos más basales y cercanos al grupo externo son los haplotipos 1 y 4 que contienen en su mayoría a individuos pertenecientes a las poblaciones de Altata y Heraclio Sb.

Las áreas idóneas para conservación dados sus niveles de diversidad haplotípica son Altata, Culiacán y Cerro de Álamos. Y los de explotación in situ Tosalibampo.

A partir de esta investigación surgen algunas preguntas que se pueden considerar para seguir la comprensión de los análisis de geografía de poblaciones, filogeografía y filogenética en plantas parásitas. Estos proveen buenas medidas para evaluar la estructura de genética de las poblaciones, la formación de razas, la distribución de los haplotipos en las poblaciones de la especie y las relaciones filogeográficas entre ellas. Sin embargo la información que pueden proporcionar se ve limitada dada las características evolutivas de las plantas parásitas y por la técnica utilizada para realizar los análisis, en nuestro caso, secuencias de ADN. Incluir otro tipo de análisis como AFLPs o ampliar el análisis a otras regiones genómicas del cloroplasto puede brindar información adicional. Además es necesario un análisis similar al presente de los haplotipos de esta planta parásita al compararlo con la distribución de la diversidad genética de *Pholisma californicum* arrojaría mejores resultados que nos ayudarían a comprender mejor los procesos biológicos y evolutivos que dieron origen a la diferenciación y distribución de los parientes genéticos de *Pholisma californicum*.

A nivel filogenético y biogeográfico es necesario un análisis del género *Pholisma* que incluya a las 3 especies que lo conforman, con ello se puede aclarar más de la historia

### XIII. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este estudio representan una primera aproximación de entender la diversidad genética de *Pholisma culiacanum*. Aunque los resultados no son del todo concluyentes muestran una amplia perspectiva que contribuye a resolver cuestiones relevantes sobre la historia evolutiva de esta especie endémica de México.

A partir de esta investigación surgen algunos aspectos que se pueden considerar para lograr la comprensión de los análisis de genética de poblaciones, filogeografía y filogenética en plantas parásitas. Estos proveen buenas medias para conocer la estructura de genética de las poblaciones, la formación de razas, la distribución de los haplotipos en las poblaciones de la especie y las relaciones filogenéticas entre ellas. Sin embargo la información que pueden proporcionar se ve limitada dada las características evolutivas de las plantas parásitas y por la técnica utilizada para realizar los análisis, en nuestro caso, secuencias. El incluir otro tipo de análisis como AFLPs o ampliar el análisis a otras regiones genéticas del cloroplasto puede brindar información adicional. Además es necesario un análisis similar al presente de los hospederos de esta planta parásita, al compararlo con la distribución de la diversidad genética de *Pholisma culiacanum* arrojaría mejores resultados que nos ayudarían a comprender mejor los procesos biológicos y evolutivos que dieron origen a la diferenciación y distribución de los patrones genéticos de *Pholisma culiacanum*.

A nivel filogenético y filogeográfico es necesario un análisis del género *Pholisma* que incluya a las 3 especies que lo conforman, con ello se puede aclarar cuál de las tres

especies que componen el género es el más basal y corroborar o no la teoría de George Yatskievych quien plantea que *Pholisma culiacanum* es la especie basal del genero.

En nuestro estudio pudimos constatar un grado alto de fragmentación del área de distribución de esta especie como consecuencia de dos fenómenos; 1) la deforestación y 2) el cambio de uso de suelo. El segundo se da en varios aspectos; con fines de producción agrícola (Culiacán), de producción acuícola y desarrollo de zonas habitacionales o turísticas (poblaciones cercanas a la costa de Altata). Es necesario un estudio del estado de las áreas de distribución de la especie y la asignación de áreas de conservación.

Desde la publicación de la revisión de la familia Lennoaceae por parte de George Yatskievych se plantearon una serie de estudios pendientes para el género *Pholisma* entre ellos estudios de ecología poblacional.

Ya que el género *Pholisma* esta reportado como una planta comestible, se sugiere realizar los análisis correspondientes para determinar el perfil nutricional y nutraceutico de la especie y así verificar la pertinencia de su domesticación.

#### XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C., Martínez E., Arriaga L., 2000. Deforestación y fragmentación de ecosistemas: ¿Qué tan grave es el problema en México? CONABIO: Biodiversitas. 30: 7-11.
- Alvarado-Cárdenas L. O., 2009. Sistemática del género *Bdallophytum* (Cytinaceae). Acta Botánica Mexicana 87: 1-21.
- Amani, J., Roohallah K., Ali R. A., Ali H. S., 2011. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. Iranian Journal of Biotechnology. 9: 69-71.
- Amico, G. C., y Nickrent D. L., 2009. Population Structure and Phylogeography of the Mistletoes *Tristerix corymbosus* and *T. aphyllus* (Loranthaceae) Using Chloroplast DNA Sequence Variation. American Journal of Botany, 96: 1571–1580.
- Amico, G. C., Vidal-Russell R., Nickrent D. L., 2007. Phylogenetic relationships and ecological speciation in the mistletoe *Tristerix* (Loranthaceae): The influence of pollinators, dispersers, and hosts. American Journal of Botany. 94: 558–567.
- Avise, J. C., 2009 Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography. 36: 3-15.
- Azmat, M. A., Iqar A. K., Hafiza M. N. C., Ishtiaq A. R., Ahmad S. K., Asif A. H., 2012. Extraction of DNA Suitable For PCR Applications from Mature Leaves of *Mangifera Indica* L. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 13:239-243.
- Bandelt, H., Forster P., y Röhl A., 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. Molecular Biology Evolution. 16: 37–48.

- Barkman, T. J., Chenery G., McNeal J. R., Lyons-Weiler J., Ellisens W. J., Moore G., Wolfe Y. D. y dePamphilis C. W., 2000. Independent and combined analyses of sequences from all three genomic compartments converge on the root of flowering plant phylogeny. PNAS, 97: 13166-13171.
- Barkman, T. J., Lim S., Salleh K. M. y Nais J., 2004. Mitochondrial DNA sequences reveal the photosynthetic relatives of *Rafflesia*, the world's largest flower. PNAS, 101: 787-792.
- Barkman, T. J., Seok-Hong L., Gwen C., Croom H. B., Nelson D. Y., y dePamphilis C. W., 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. BMC Evolutionary Biology. 7: 1-15
- Beatty, G. E. y Provan J., 2011. Phylogeographic analysis of North American populations of the parasitic herbaceous plant *Monotropa hypopitys* L. reveals a complex history of range expansion from multiple late glacial refugia. Journal of Biogeography. 1365-2699.
- Bungard, R. A., 2004. Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. BioEssays. 26: 235-247.
- CONABIO, Capital Natural de México. CONABIO 2008.
- Copeland, H. F., 1935. The structure of the Flower of *Pholisma arenarium*. American Journal of Botany. 22: 366-383.
- Cota-Sanchez, H. J., Remarchuk, K. y Kumary U. Atid., 2006. Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. Plant Molecular Biology Reporter 24: 161-167.

- Davis C. C., 2007. Floral Gigantism in Rafflesiaceae. *Science*. 315.
- dePamphilis C. W., Nelson D. Y., y Wolfe A. D., 1997. Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: Many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *PNAS. USA* 94: 7367–7372.
- deVega C., Berjano R., Arista M., Ortiz P. L., Salvador T. y Stuessy T.F., 2008. Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (Cytinaceae) in the Western Mediterranean basin. *New Phytologist*, 178: 875-887.
- Doyle, J. J., 1991. DNA Protocols for Plants. P. 283-293 In: G. Hewitt, A. W. B. Johnson, and J. P. W. Young (Eds.), *Molecular Techniques In Taxonomy*. NATO ASI Series H, Cell Biology Vol. 57.
- Dressler., 1968. A Second Species of *Ammobroma* (Lennoaceae) in Sinaloa, Mexico. *Madroño*. 19: 179-182.
- FAO 2005. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2005 informe nacional. México. FRA, 2005. Informe Nacional México (189).
- FAO 2006. Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2005. Hacia la ordenación forestal sostenible. FRA 2006. 1.
- Funk, H. T., Berg S., Krupinska k., Maier U. G., Krause K., 2007. Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *BMC Plant Biology*. 45: 1-12.
- Molina-Freaner, F. E., Markow T. A., Pfeiler E. J., Rojas-Soto O. R., Varela-Romero A., Quijada-Mascareñas A., Esqueda-Valle M. y Yépiz-Plascencia G., 2010. Diversidad

- genética de la biota. En: F.E Molina-Freaner y T.R. Van Devender, eds. *Diversidad Biológica de Sonora*. UNAM. México. 97-128.
- Gutiérrez, O. J. S., 2010. Filogeografía de la cicada *Dioon sonorensis* (Cycadales: Zamiaceae) en Sonora, México, utilizando la región intergenica *trnL-F* del adn del cloroplasto. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Hamilton, M.B., 2009. Population Genetics. Wiley Blackwell. 1 ed. UK.
- Hedrick, P.W., 2005. Genetic of Populations. Jones y Bartlett. Third Edition. USA.
- Heinze, B., 2007. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher Plants. *Plant Methods*. 3: 1-7.
- Hickerson, M.J., Cavender-Bares B.C.C. J., Crandall K.A., Grahame C.H., Rissler J. L., Victoriano P.F., y Yoder A.D., 2000. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010. 54: 291-301.
- Holzappel, S., Faville M. Z., Gemmill C. E. C., 2002. Genetic variation of the endangered holoparasite *Dactylanthus taylorii* (Balanophoraceae). *Journal of Biogeography*. 29: 663-676.
- Huang, K., Whitlock R., Press M.C., y Scholes J.D., 2012. Variation for host range within and among populations of the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Heredity*. 108, 96-104.
- Lyons, C. A., y Ford B. A., 2002-a. The discovery of three genetic races of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) provides insight into the evolution of parasitic angiosperms. *Molecular Ecology*. 11: 387-405.

- Jerome, C. A., y Ford B. A., 2002-b. Comparative population structure and genetic diversity of *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) and its Pinus host species: insight into host parasite evolution in parasitic angiosperms. *Molecular Ecology*. 11: 407-420.
- Garcia-Franco, J. G., Souza V., Eguiarte L. E., y Rico-Gray V., 1998. Genetic variation, genetic structure and effective population size in tropical holoparasitic endophyte *Bdallophyton bambusarum* (Rafflesiaceae). *Plant systematics and evolution*. 210: 271-288.
- Kujit, J., 1966. Parasitism in Pholisma (Lennoaceae). External morphology of subterranean organs. *American Journal of Botany*. 53: 82-86.
- Librado, P., y Rosas J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- McLay, T. G. B., Tate J. A., y Symonds V., Epub 2012. Microsatellite Markers for the Endangered Root Holoparasite *Dactylanthus Taylorii* (Balanophoraceae) from 454 Pyrosequencing. *American Journal of Botany*. 99: e323-5.
- Križman, M., Jernej J., Dea B., Branka J., Mirko P., 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta agriculturae Slovenica*, 87: 427-433.
- Mutikainen, P. y Koskela T., 2002. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. *Heredity*,. 89, 318-324.
- Nickrent, D. L., 2006. *Molecular Methods in Plant Biology*. Department of Plant Biology. Southern Illinois University. Fourth Edition.
- Nickrent, D. L., y García M. A., 2009. On the Brink of Holoparasitism: Plastome Evolution in Dwarf Mistletoes (*Arceuthobium*, Viscaceae). *Journal of Molecular Evolution*. 68:603-615.

- Nickrent, D. L., Duff Joel R., Colwell Alison E., Wolfe Andrea D., Young Nelson D., Steiner Kim E., y dePamphilis Claude W. 1998. Molecular Phylogenetic and Evolutionary Studies of Parasitic Plants. In: Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing. D. Soltis, P. Soltis, J. Doyle (eds.). Kluwer Academic Publishers, 1998 (Chapter 8): p. 211-241.
- Nickrent, D. L., Garcia Miguel A., María P. Martín María P., y Mathiasen Robert L. 2004. A Phylogeny of All Species Of *Arceuthobium* (Viscaceae) Using Nuclear And Chloroplast DNA Sequences. American Journal of Botany 91: 125–138.
- Paran, I., Gidoni D. y Jacobsohn R., 1997. Variation between and within broomrape (Orobanche) species revealed by RAPD markers. Heredity. 78: 68-74.
- Petit, R. J., Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Salvini D. y Vendramin G. G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. Molecular Ecology. 14: 689–701.
- Piñero, D., et al., 2008. La diversidad genética como un instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies Mexicanas, en *Capital natural de México*, Vol 1: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO. México. p 437-494.
- Piñero, D., et al., 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital Natural de México*, Vol I; *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México. p 415-435.
- Polzin, T., y Daneschmand S. V., 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. Operations Research Letters 31:12-20.

- Porebski, S., Grant B., y Bernard R. B., 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15: 8-15.
- Rich K. A., Thompson J. N. y Fernandez C. C., 2008. Diverse historical processes shape deep phylogeographical divergence in the pollinating seed parasite *Greya politella*. *Molecular Ecology*. 17: 2430-2448
- Sá, O., Pereira J. A., y Baptista P., 2011. Optimization of DNA Extraction for RAPD and ISSR Analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 4156-4164
- Sánchez-Hernández, C. y Gaytán-Oyartzún J.C., 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology* 5: 1864-1867.
- SEMARNAT. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Cap. 2 Ecosistemas, 2008.
- Stanton, S., Honnay O., Hans J., y Roldan-Ruiz I., 2009. A comparison of the population genetic structure of parasitic *Viscum album* from two landscapes differing in degree of fragmentation. *Plant Systematics & Evolution* 281: p. 161-169.
- Smith, R. A., Ferguson D. M., Barkman T. J. y dePamphilis C.W., 2000. Molecular phylogenetic evidence for the origin of Lennoaceae: A case of adelphoparasitism in the angiosperms? BSA, Meeting of the Botanical Society of America (August 6-10): p. Oregon Convention Center and Doubletree Lloyd Center in Portland, Oregon.
- Taberlet. P., Gielly L., Pautou G. y Bouvet., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions o chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109

- Tamura, K., Dudley J., Nei M. y Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
- Thorogood, C. J., Rumsey F. J., Harris S. A., Hiscock S. J. 2009. Gene flow between alien and native races of the holoparasitic angiosperm *Orobanche minor* (Orobanchaceae). *Plant Systematics Evolution*. 282: 31-42.
- Vaz, P. M. C., Diaz-Ruiz R., Satovich Z., Roman B., Pujadas-Salva y Rubiales D., 2007. Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: evolving from parasitizing wild hosts to crop plants. *Weed Research*. 48, 179-186.
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico S., Garrido-Garduño T. y Gutiérrez-García T. A., 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*. 82: 277-297.
- Wolfe, K. H., Morden C. W., y Palmer J. D., 1992. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *PNAS. USA* 89: p. 10648-10652.
- Yatskievych, G. y Mason C. T., 1986. A Revision of the Lennoaceae. *Systematic Botany*. 11: 531-584.
- Zuber, D., y Widmer A., 2000. Genetic evidence for host specificity in the hemi-parasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Molecular Ecology*. 9: 1069-1073.

## APÉNDICE

### 1. Extracción de ADN de tejido de una planta parásita (*Pholisma culiacanum*).

1.- Búfer de extracción [incluye CTAB 0.04 g/ml, NaCl 3 mol/L, ácido ethylenediaminetetracético (EDTA) 20 mmol/L, Tris-HCl 100mmol/L (pH 8.0), y PVP-40 (polivinilpirrolidona, peso molecular 40 000) 0.025g/ml].

1.1.-  $\beta$ -mercaptoethanol 3% (adicionar justo antes del uso),

2.- Cloroformo: Alcohol iso-amilico 24:1 (v/v).

3.-Etanol al 70% y 80%.

4.-Acetato de Sodio 3 mol/L.

5.-RNAsa a 10 mg/ml.

6.-Proteinaza K 1 mg/ml.

8.-Búfer TE [incluye Tris-HCl 10 mmol/L (pH8.4), EDTA 1mmol/L (pH8.5)].

#### Protocolo.

(1) Calentar el búfer de extracción a 65°C en baño maría.

(2) Cortar de 0.01 a 0.02 g de tejido interno.

(3) Colocar el tejido en un mortero estéril que esté a temperatura ambiente, adicionar 30  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoethanol directamente a la muestra.

(4) Añadir 1 ml de búfer de extracción y macerar con fuerza hasta obtener una consistencia acuosa, si es necesario adhiere más búfer de extracción.

(5) Transferir el macerado a un tubo eppendorf de 1.5ml y llene máximo hasta 0.75 ml, invertir los tubos fuertemente y mezclarlos utilizando vortex. Incubar a 65°C en baño maría de 60-80 min. agitando con vortex cada 10min.

(6) Añadir un volumen de Cloroformo: Alcohol iso-amilico 24:1 y mezclar fuertemente invirtiendo los tubos.

(7) Centrifugar a 7600 rpm por 15 min a temperatura ambiente.

(8) Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo y desechar la fase orgánica remanente.

(9) Repetir los 3 pasos anteriores (dos o tres veces según sea necesario).

(10) Añadir 1 ml de Isopropanol frío (a 4°C) y mezclar suavemente invirtiendo los tubos. Depositar los tubos a -20°C de 15 a 30 min.

(11) Centrifugar a 9700 rpm por 10 min. a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.

(12) Lavar el pellet dos o tres veces con etanol al 70%.

(13) Invertir los tubos en una toalla de papel secante y dejar secar los pellets a temperatura ambiente.

(14) Re suspender el ADN en 200  $\mu$ l de búfer TE, agregar RNAsa (1  $\mu$ l por cada 20  $\mu$ l de solución) e incubar a 37°C por 2 hrs.

(15) Agregar un volumen de Cloroformo: Alcohol iso-amilico 24:1 y mezclar mediante inversión.

- (16) Centrifugar a 7600 rpm por 10 min. a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- (17) Añadir un volumen 1/10 de NaCl 3 mol/L o un volumen de 1/10 de Acetato de Sodio 3 mol/L, mezclar y precipitar el ADN con dos volúmenes de Etanol 100% congelado (4°C).
- (18) Centrifugar a 9700 rpm por 10 min. a temperatura ambiente, desechar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70%.
- (19) Invertir los tubos en una toalla secadora y dejar secar los pellets a temperatura ambiente, una vez secos resuspender en 25 µl de búfer TE y guardar en refrigeración.

## 2. Sitios con información de parsimonia.

Dos sustituciones;

29 32 37 39 40

41 42 43 44 49 50 53 56 57 60 61 63 64 65 68 77 79 80 81 82

84 86 88 90 91 94 95 96 101 123 125 127 128 129 134 138

139 140 141 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156

165 166 167 168 169 171 174 176 178 179 180 182 183 184

186 187 189 191 192 193 197 199 200 201 202 204 206 207

208 209 211 213 219 227 230 231 233 242 244 245 246 248

252 253 254 260 263 265 268 269 270 271 273 275 276 277

278 279 281 283 284 285 290 293 294 297 298 301 302 303

304 307 309 311 314 317 321 322 324 326 328 332 333 334

336 337 346 347 349 350 355 360 362 366 369 372 376 378

383 388 389 391 392 401 402 404 405 406 410 412 414 416

417 421 424 427 429 431 435 436 437 441 444 445 448 453

454 455 457 459 460 461 462 465 467 468 469 470 473 475

478 484 485 486 490 492 493 494 496 504 505 507 508 509

510 519 525 527 529 530 531 532 534 536 537 538 539 541

545 546 547 549 551 552 563 564 567 570 571 572 578 579

580 581 583 586 587 588 589 590 592 593 595 597 611 612

Tres sustituciones;

36 89 130 131 132 136 137 142 143 172 173 175 181

185 215 228 232 247 258 259 262 274 280 286 287 288 296

299 300 310 325 329 335 338 351 354 363 367 371 375 384

387 400 403 409 413 428 433 434 446 450 451 452 458 464

476 479 480 491 503 506 523 553 565 566 573 594 596 613

Cuatro sustituciones;

282 442 456

### 3. Haplotipos y Frecuencias.

Hap\_1: 3 [10AL 5AL 8AL]  
Hap\_2: 5 [10CA 3CA 4CA 5CA 7CA]  
Hap\_3: 5 [10CU 1CU 2CU 5CU 9CU]  
Hap\_4: 12 [10HS 1HS 2HS 3AL 4AL 5HS 6HS 7AL 7HS 8HS 9AL 9SB]  
Hap\_5: 19 [10MA 10TO 1TO 2CA 2SB 2TO 3MA 3SB 4MA 4TO 5SB 5TO 6SB  
7MA 7SB 7TO 8MA 8SB 8TO]  
Hap\_6: 10 [10SB 1SB 4SB 5MA 6CA 6CU 6MA 8CA 9HS 9MA]  
Hap\_7: 5 [1AL 2AL 3HS 4HS 6AL]  
Hap\_8: 2 [1CA 9CA]  
Hap\_9: 1 [3CU]  
Hap\_10: 3 [3TO 6TO 9TO]  
Hap\_11: 2 [4CU 7CU]



Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.