

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN INTERGÉNICA (TrnL-F) DE CLOROPLASTO EN POBLACIONES DE *Pholisma culiacanum* Y.

## GENETIC DIVERSITY OF THE CHLOROPLAST (TrnL-F) REGION AMONG POPULATIONS OF *Pholisma culiacanum* Y.

O. Omer **Linares-Holguín**<sup>1</sup>, Pedro **Sánchez-Peña**<sup>1</sup>, Francisco **Molina-Freaner**<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Culiacán de Rosales, km.17.5, Carretera Culiacán-Eldorado, 80000. Sinaloa. México. (orlandomer@hotmail.com), (spernap@hotmail.com). <sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de ecología. ERNO. Avenida Luis Donaldo Colosio M. esquina Madrid S/N, Campus UNISON, Apartado Postal 1039, 83000. Hermosillo, Sonora. México. (freaner@unam.mx)

### RESUMEN

*Pholisma culiacanum* es una holoparásita de raíz, endémica de los estados de Sinaloa y Sonora, México, y tiene importancia cultural, alimenticia, biológica y evolutiva. Esta planta es un modelo agrícola adecuado como fuente alternativa de nutrientes y para entender los cambios moleculares de la fotosíntesis del autotrofismo al parasitismo. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de siete poblaciones de *P. culiacanum* de Sinaloa y Sonora. En 70 muestras se analizaron secuencias de un fragmento de ADN de cloroplasto (TrnL-F) para calcular la variación genética dentro (86.51 %) y entre (13.49 %) poblaciones. Para los datos de distancias genéticas y geográficas se realizaron análisis de correlación y regresión lineal simple. La diversidad haplotípica y nucleotídica detectada fue 0.85 y 0.27; además, se identificaron 11 haplotipos. La red y filogenia de haplotipos mostraron similitud con tres grupos. La relación entre las distancias genéticas y geográficas no fue significativa, ( $p > 0.05$ ); por lo tanto, no hay evidencia de aislamiento por distancia. Con la información analizada se proponen zonas de explotación *in situ* y de conservación de recursos genéticos.

**Palabras clave:** Holoparásita, *Pholisma culiacanum*, diversidad genética, cloroplasto, TrnL-F.

### INTRODUCCIÓN

*Pholisma culiacanum* es una holoparásita de raíz, con importancia agronómica, alimenticia, económica, cultural, biológica y evolutiva y representa un modelo adecuado para conocer los

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2015. Aprobado: marzo, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 799-809. 2016.

### ABSTRACT

*Pholisma culiacanum* is a root holoparasitic plant, endemic to the Mexican states of Sinaloa and Sonora that has cultural, nutritious, biological, and evolutionary importance. This plant is an adequate agricultural model as an alternative source of nutrients and as a tool for understanding photosynthesis' molecular changes, from autotrophism to parasitism. The aim of this study was to analyze the genetic diversity of seven populations of *P. culiacanum* in Sinaloa and Sonora. Sequences from a chloroplast DNA (TrnL-F) fragment were analyzed in 70 samples, in order to calculate the genetic variation within (86.51 %) and between (13.49 %) populations. Correlation and simple linear regression analysis were performed for the genetic and geographic distances data. Haplotype and nucleotide diversity was detected at 0.85 and 0.27; 11 haplotypes were identified as well. The relationship between genetic and geographic distances was not significant ( $p > 0.05$ ); therefore, no evidence of isolation due to distance was found. Based on the analyzed information, areas of *in situ* exploitation and genetic resources conservation are proposed.

**Key words:** Holoparasitic, *Pholisma culiacanum*, genetic diversity, chloroplast, TrnL-F.

### INTRODUCTION

*Pholisma culiacanum* is a root holoparasitic plant of great agricultural, nutritious, economic, cultural, biological, and evolutionary importance. Besides it represents an appropriate model to study changes in the photosynthesis process, from autotrophism to parasitism (Bungard, 2004).

cambios en el proceso de la fotosíntesis del autotrofismo al parasitismo (Bungard, 2004).

Las plantas parásitas representan 1 % de las angiospermas, de ellas hay unas cuatro mil especies, agrupadas en 265 géneros en el mundo y 36 de estos se localizan en México. En Sinaloa se encuentran seis géneros de plantas parásitas, entre ellos *Pholisma*, que se distribuye desde el sur de Culiacán hasta los estados de California y Arizona en EE.UU. De las tres especies del género, *P. culiacanum* es endémica de los estados de Sonora y Sinaloa, donde el área circundante a Culiacán es el posible centro de origen de la especie y del género (Yatskievych *et al.*, 1986).

El objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad genética en poblaciones de *P. culiacanum*, con secuencias genéticas de la región intergénica (TrnL-F) de ADN de cloroplasto, e identificar zonas con potencial para explotación *in-situ* y conservación de esos recursos genéticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Para localizar las poblaciones de *P. culiacanum* se consultaron bases de datos: GIFB (Global Information of Biodiversity, 2013), Missouri Botanical Garden, Universidad de Arizona, Escuela de Biología y Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Sonora (ERNO-UNAM) y se exploraron áreas que cumplen con las características de distribución. En cada población se recolectaron de 10 a 30 individuos (separados por un mínimo de 10 m), se geo referenciaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la purificación del ADN.

### Amplificación

Para la amplificación se evaluaron los métodos de extracción de ADN propuestos por Doyle (1991), Porebski *et al.* (1997), Sá *et al.* (2011), Cota-Sánchez *et al.* (2006), Krizman (2006), Sánchez-Hernández (2006) y Amani *et al.* (2011). La metodología adecuada se basó en la descrita por Azmat *et al.* (2012).

Al carecer de información de la variabilidad genética de *P. culiacanum*, evaluamos varias regiones de ADN del cloroplasto reportadas en otras parásitas, en las que se detectó la variabilidad suficiente para realizar estudios de genética de poblaciones (Taberlet *et al.*, 1991, dePamphilis *et al.*, 1997; Zuber *et al.*, 2000; Heinze, 2007; Amico *et al.*, 2009; Nickrent *et al.*, 2009). Con base en los resultados, los iniciadores que seleccionamos fueron

Parasitic plants represent 1 % of angiosperms. There are four thousand different species worldwide, gathered in 265 genera, 36 of which are found in Mexico. There are six genera of parasitic plants in Sinaloa –including *Pholisma*, which can be found from southern Sinaloa, all the way to California and Arizona in the U.S. Out of the three species that belong to the genus, *P. culiacanum* is the one endemic to the states of Sonora and Sinaloa, and the area surrounding Culiacan –Sinaloa’s capital city– is likely to be the place of origin of the species and genus (Yatskievych *et al.*, 1986).

The aim of this research was to determine the genetic variability in populations of *P. culiacanum* with genetic sequences of the TrnL-F region of the chloroplast DNA and to identify areas with good potential for both *in situ* exploitation and genetic resources conservation.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

In order to locate *P. culiacanum* populations, different data bases were consulted: GIFB (Global Information of Biodiversity, 2013), Missouri Botanical Garden, University of Arizona, the Biology School and the Faculty of Agriculture of the Autonomous University of Sinaloa, and the Sonora Regional Station of the National Autonomous University of Mexico (ERNO-UNAM). Areas that comply with the distribution characteristics were also explored. In each population, 10 to 30 individuals were collected (with at least 10 m between them), they were georeferenced, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , until DNA purification was performed.

### Amplification

For the amplification, the extraction methods proposed by Doyle (1991), Porebski *et al.* (1997), Sá *et al.* (2011), Cota-Sánchez *et al.* (2006), Krizman (2006), Sánchez-Hernández (2006), and Amani *et al.* (2011) were evaluated. The appropriate methodology was based on that described by Azmat *et al.* (2012).

Due to the lack of previous information on *P. culiacanum*'s genetic variability, several chloroplast DNA regions reported in other parasitic plants were evaluated, where sufficient variability to perform population genetics studies were found (Taberlet *et al.*, 1991, de Pamphilis *et al.*, 1997; Zuber *et al.*, 2000; Heinze, 2007; Amico *et al.*, 2009; Nickrent *et al.*, 2009). Based on those results,

c-Tab F y f-Tab R de Taberlet *et al.* (1991), esos amplifican la región intergénica del Trn L-F. El protocolo de amplificación usado fue por PCR tipo touch-down (Amico *et al.*, 2007), con una modificación en las temperaturas de alineamiento de 48 a 50 °C y de 52 a 54 °C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Techne Unit Genius® y se visualizaron en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio (0.003 %), en un transiluminador de luz UV.

Los productos de amplificación se secuenciaron en el High-Throughput Sequencing Solutions del Departamento de Ciencias Genómicas de la Universidad de Washington en Seattle, Washington, EE.UU. Para la edición y el alineamiento de las secuencias se utilizaron los programas CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, 2009), Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc., 2004-2006) y el ClustalW *multiple alignment* del paquete informático BioEdit (Hall, 1999).

### Análisis de la variabilidad

Los programas DnaSP (Librado y Rosas, 2010) y ARLEQUIN 3.1 (Excoffier, 2005) se utilizaron para calcular los índices de diversidad genética: 1) diversidad nucleotídica " $\pi$ " (Nei, 1987, Hedrick, 2005, Hartl y Clark, 2007); 2) diversidad haplotípica *Hd* considerando y sin considerar indels como sitios informativos (Nei, 1987); 3) componentes de la variación debida a diferencias entre y dentro de las poblaciones (AMOVA). Para evaluar si las poblaciones se ajustan al modelo de aislamiento por distancia se realizaron análisis de correlación y de regresión lineal entre las distancias genéticas y geográficas con el modelo de Maximum Composite Likelihood sin considerar indels en MEGA 4.0, Tamura *et al.* (2007) y Microsoft 2007.

### Red de haplotipos

Las secuencias de haplotipos se generaron con el programa DnaSP sin considerar los sitios alineados con gaps, datos perdidos o sitios invariables (monomórficos). El programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology, 2004-2012) se utilizó para construir redes de haplotipos (Bandelt *et al.*, 1999; Polzin *et al.*, 2003) con secuencias de *Lennoa* como grupo raíz.

### Filogenia de haplotipos

El árbol filogenético se generó en MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) con el método Neighbor-Joining, con un bootstrap de mil replicas. Las distancias genéticas se calcularon con el método de Maximum Composite Likelihood sin considerar indels. Secuencias de *Lennoa* sp. se utilizaron como grupo externo.

c-Tab F and f-Tab R from Taberlet *et al.* (1991) were selected as strand primers, which amplify the intergenic region of Trn L-F. A touchdown-like PCR amplification protocol was used (Amico *et al.*, 2007), with a modification in alignment temperatures: from 48 to 50 °C, and from 52 to 54 °C. Amplification reactions were performed in a Techne Unit Genius® thermocycler, visualized in a 1 % agarose gel, and stained with ethidium bromide (0.003 %) in an UV transilluminator.

The amplified product was sequenced in the High-Throughput Sequencing Solutions of the Genomic Science Department of the University of Washington, Seattle, U.S. To edit and align the sequences, two software were used: CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, 2009), Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc., 2004-2006), and ClustalW *multiple alignment* from the BioEdit software suite (Hall, 1999).

### Genetic variability analysis

DnaSP (Librado and Rosas, 2010) and ARLEQUIN 3.1 (Excoffier, 2005) software were used to calculate genetic diversity indexes: 1) nucleotide diversity ( $\pi$ ) (Nei, 1987, Hedrick, 2005, Hartl and Clark, 2007); 2) haplotype diversity (*Hd*), with and without indels as informative sites (Nei, 1987); 3) variation components due to differences between and within populations (AMOVA). In order to evaluate if the populations fit in the isolation by distance model, correlation and linear regression analysis of the genetic and geographic distances were performed, using the Maximum Composite Likelihood model, without taking indels into consideration, in MEGA 4.0, Tamura *et al.* (2007), and Microsoft 2007.

### Haplotype network

Haplotype sequences were obtained with the DnaSP software, excluding the aligned sites with gaps, missing data, and monomorphic sites. The Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology, 2004-2012) software was used to build haplotype networks (Bandelt *et al.*, 1999; Polzin *et al.*, 2003) with *Lennoa* sequences as base group.

### Haplotype phylogeny

The phylogenetic tree was generated with MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), using the Neighbor-Joining method, with a bootstrap of one thousand iterations. Genetic distances were calculated with the Maximum Composite Likelihood method, without taking into consideration indels. *Lennoa* sp. sequences were used as an outgroup.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Muestreo

Nuestra exploración del área de distribución de *P. culiacanum* mostró siete poblaciones: cinco en Sinaloa y dos en Sonora. De los individuos recolectados, de cada población se seleccionaron 10, para realizar la purificación del ADN. En algunos lugares de distribución reportados (GIF, 2013) no se localizaron poblaciones debido al cambio de uso de suelo, de bosque primario a zonas agrícolas o de explotación forestal (Ranchería Los Álamos, Cerro siete gotas en Culiacán, San Blas), al desarrollo de vías de comunicación (Carretera al sur de Culiacán, Carretera Los Mochis-Obregón, Carretera Altata-Dautillos), al desarrollo turístico-inmobiliario (zona costera de Nuevo Altata) y a la consecuente fragmentación de los ecosistemas.

### Amplificación

De todas las muestras secuenciadas, 70 pertenecían a *P.culiacanum* y dos a *Lennoa madreporoides*. El tamaño del fragmento amplificado fue de 735 nucleótidos, 261 presentaron gaps o fueron datos perdidos, 151 fueron sitios mono mórficos y 323 polimórficos, 251 de ellos presentaron dos tipos de sustituciones, 69 tres tipos y tres de ellos cuatro tipos. La longitud del producto de amplificación, las regiones no amplificadas (rps432-trnL [UAA], trnT [GGU]-trnE [UUC], atpB-rbcL) y las amplificadas con niveles bajos de variación (trnT [UGU] – trnL [UAA], rpl32F – trnL [UAG] y trnT [UGU] – trnL [UAA]) sugieren que en *P. culiacanum*, como en otras parásitas, existe reducción del tamaño del cloroplasto comparado con el tamaño original de la planta del tabaco (1560 nucleótidos) (Bungard, 2004).

### Análisis de la variabilidad

Las siete poblaciones evaluadas son polimórficas, con 11 haplotipos diferentes (dos a cuatro por población) sin considerar indels como sitios informativos (Figura 1).

La diversidad nucleotídica total ( $\pi$ ), sin considerar indels, fue  $0.2737 \pm 0.0242$ , donde la población con el valor mayor fue Masiaca (0.2990) y Tosalibampo (0.0007) con el menor. La diversidad

## RESULTS AND DISCUSSION

### Sampling

Our *P. culiacanum* distribution area scouting found seven populations: five in Sinaloa and two in Sonora. Out of all the collected individuals, 10 of each population were selected for DNA purification. In some reported distribution sites (GIF, 2013), no populations were found, due to changes in land use – such as primary forests transformed into agricultural or forest exploitation areas (Ranchería Los Álamos, Cerro Siete Gotas, in Culiacán, San Blas)–, to the construction of highways –highway in south Culiacán, Los Mochis-Obregón highway, Altata-Dautillos highway–, or to tourism and real estate development projects (Nuevo Altata coastal area), and the consequent ecosystem fragmentation.

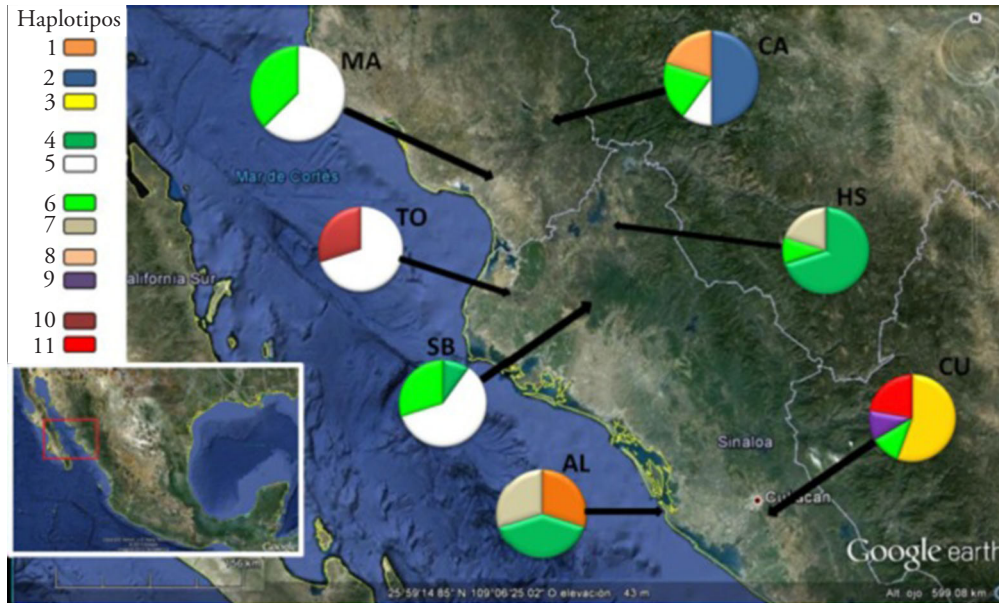
### Amplification

Out of all the sequenced samples, 70 belonged to *P.culiacanum* and two belonged to *Lennoa madreporoides*. The size of the amplified fragment was 735 nucleotides, 261 had gaps or were missing data, 151 were monomorphic sites and 323 were polymorphic sites. Two-hundred fifty-one of those polymorphic sites presented two types of substitutions, 69 presented three types, and 3 presented four types. The length of the amplification product, the unamplified regions (rps432-trnL [UAA], trnT [GGU]-trnE [UUC], atpB-rbcL), and the amplified regions with low variation levels (trnT [UGU] – trnL [UAA], rpl32F – trnL [UAG] y trnT [UGU] – trnL [UAA]) all suggest that in *P. culiacanum*, as in other parasitic plants, the size of the chloroplast was reduced, in comparison with the original size in tobacco plants (1560 nucleotides) (Bungard, 2004).

### Variability analysis

The seven analyzed populations are polymorphic, with 11 different haplotypes (2-4 per population), without taking indels into consideration as informative sites (Figure 1).

Nucleotide total diversity ( $\pi$ ) –without taking indels into consideration– was  $0.2737 \pm 0.0242$ ; Masiaca and Tosalibampo had the highest and lowest



**Figura 1.** Distribución de haplotipos (sin considerar indels) de *Pholisma culiacanum*. Altata (AL), Culiacán (CU), Tosalibampo (TO), San Blas (SB), Heraclio SB (HS), Masiac (MA) y Cerro de Álamos (CA).

**Figure 1.** Haplotype distribution (without taking indels into consideration) of *Pholisma culiacanum*. Altata (AL), Culiacán (CU), Tosalibampo (TO), San Blas (SB), Heraclio SB (HS), Masiac (MA), and Cerro de Álamos (CA).

haplotípica global, sin considerar indels ( $H_d$ ), fue  $0.855 \pm 0.024$ , donde los valores mayores se compartieron entre Altata y Cerro de Álamos (0.7330) y el menor fue Tosalibampo (0.4670) (Cuadro 1).

El valor de  $F_{st}$  (0.1349,  $p \leq 0.05$ ) indica un nivel moderado de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas. El AMOVA mostró que la mayoría de la variación genética observada se debe

values (0.2990, and 0.0007, respectively). Overall haplotype diversity –without taking indels ( $H_d$ ) into consideration– was  $0.855 \pm 0.024$ ; Altata and Cerro de Álamos shared the highest value (0.7330), while Tosalibampo had the lowest (0.4670) (Table 1).

First value (0.1349,  $p \leq 0.05$ ) indicates a moderate level of genetic differentiation among studied populations. AMOVA showed that most

**Cuadro 1.** Diversidad genética de *Pholisma culiacanum*.

**Table 1.** Genetic diversity of *Pholisma culiacanum*.

Localidad	$h$	$H_d$	$h_i$	$H_{d_i}$	$\pi$
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 SANB	3	0.66700	6	0.84444	0.26463
Masiaca	2	0.53600	8	1.00000	0.29903
Cerro de Álamos	4	0.73300	10	1.00000	0.2960
Total	11	$0.855 \pm 0.024$	57	0.99367	$0.27366 \pm 0.02425$

Numero de haplotipos ( $h$ ), diversidad haplotípica ( $H_d$ ), número de haplotipos considerando indels ( $h_i$ ), diversidad haplotípica considerando indels ( $H_{d_i}$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), desviación estándar ( $\pm$ ) ♦ Number of haplotypes ( $h$ ), haplotype diversity ( $H_d$ ), number of haplotypes, taking indels into consideration ( $h_i$ ), haplotype diversity, taking indels into consideration ( $H_{d_i}$ ), nucleotide diversity ( $\pi$ ), standard deviation ( $\pm$ ).

principalmente a diferencias dentro de las poblaciones (86.51 %) y menos a las poblaciones (13.49 %). Este resultado coincide con los de otros estudios de plantas parásitas (Jerome *et al.*, 2002; Amico *et al.*, 2009) (Cuadro 2). Lo anterior podría esperarse pues los valores de *Hd* de las poblaciones son superiores a 0.5 (excepto Tosalibampo); niveles altos de varianza molecular dentro de poblaciones tienen como consecuencia diversidad haplotípica alta. El porcentaje alto de variación dentro de las poblaciones puede entenderse como consecuencia del flujo génico entre individuos de una misma población (García-Franco *et al.*, 1998), esto contrasta con otros estudios de especies parásitas y dependientes, en las que gran parte de la variación genética se detectó entre poblaciones. Estas especies se caracterizan por su distribución fragmentada o en parches, por la dependencia de sus hospederos (de Vega *et al.*, 2008), de la historia de vida tanto del parásito como del hospedero, de sufrir hechos geográficos y eventos estocásticos (cuellos de botella y evento fundador). Sin embargo, hay especies polinizadas por el viento que lo usan como medio de dispersión de semillas (como *P. culiacanum*), generalmente presentan índice de diversidad genética menor entre poblaciones (Allendorf *et al.*, 2014).

Aunque hubo estructura poblacional con niveles bajos de diferenciación genética entre poblaciones, el coeficiente de correlación de Pearson y el modelo de regresión lineal de las distancias genéticas y geográficas no mostraron evidencia de aislamiento por distancia ( $p > 0.05$ ,  $r^2 = 0.0026$ ) a diferencia de otras plantas parásitas (Holzapfel *et al.*, 2002; Jerome *et al.*, 2002a; Mutikainen *et al.*, 2002; deVega *et al.*, 2008). Lo anterior permite inferir que existe flujo

of the observed genetic variation is mainly due to differences within populations (86.51 %), rather than differences between populations (13.49 %). This result is consistent with those of other parasitic plants studies (Jerome *et al.*, 2002; Amico *et al.*, 2009) (Table 2). This was to be expected, because the populations' *Hd* values are over 0.5 (except in Tosalibampo); high levels of molecular variance within populations result in high haplotypic diversity. High variation within populations can be interpreted as a consequence of gene flow between individuals of the same population (García-Franco *et al.*, 1998). This contrasts with other studies on parasitic and dependent plants, in which most genetic variation was found at population level. These species are characterized by: fragmented or patchy distribution; dependence on their hosts (de Vega *et al.*, 2008); the life history of both the parasite and the host; suffering geographic and stochastic events (bottle necks and founder events). However, there are species that are wind-pollinated or that use the wind to spread their seeds (such as *P. culiacanum*). These species usually have a lower genetic diversity index between populations (Allendorf *et al.*, 2014).

Although population structure had low levels of genetic differentiation among populations, the Pearson correlation coefficient and the linear regression model for genetic distances showed no evidence of isolation by distance ( $p > 0.05$  y  $r^2 = 0.0026$ ), unlike in other parasitic plants (Holzapfel *et al.*, 2002; Jerome *et al.*, 2002a; Mutikainen *et al.*, 2002; deVega *et al.*, 2008). This allowed us to infer that there is a gene flow amongst the studied populations and that overall they behave as a single

**Cuadro 2. Análisis de la varianza molecular.**  
**Table 2. Analysis of molecular variance.**

Variación	AMOVA			
	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	

Índice de diferenciación genética  $F_{st} = 0.13490$  ♦ Genetic differentiation index  $F_{st} = 0.13490$ .

<sup>†</sup>Test de significancia 1023 permutaciones ♦ Significance test 1023 permutations.

<sup>‡</sup>Va y FST: Valor de  $P = 0.0137 \pm 0.0034$  ♦ Va and FST: P value =  $0.0137 \pm 0.0034$ .

<sup>§</sup>Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992. Weir, B. S., 1996.

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

genético entre las poblaciones estudiadas y que éstas, en su conjunto, se comportan como una sola unidad evolutiva poblacional (García-Franco *et al.*, 1998; Allendorf *et al.*, 2014), la cual es tan grande que evita el efecto de la deriva génica. Sin embargo, en especies raras, como *P. culiacanum*, en las que la variación es igual o mayor que el de las especies comunes, se recomienda la evaluación de otros factores además de los ecológicos: las estrategias de ciclo de vida, los atributos reproductivos, la demografía, las interacciones con otros organismos (para este caso el hospedero) y otros (Eguiarte *et al.* 2007).

### Distribución de haplotipos

El haplotipo 5 fue el de frecuencia mayor (19), se presentó en las poblaciones Tosalibampo, Masiaca, San Blas y Cerro de Álamos; el más distribuido fue el 6, que se presentó en Culiacán, San Blas, Heraclio Sb, Masiaca y Cerro de Álamos (Figura 2).

Las poblaciones con haplotipos únicos fueron Altata (haplotipo 1), Culiacán (haplotipos 3, 9, y 11), Tosalibampo (haplotipo 10) y Cerro de Álamos (haplotipos 2 y 8). Las otras poblaciones (Masiaca, San Blas y Heraclio Sb) estuvieron compuestas en su totalidad por haplotipos presentes en otras poblaciones (haplotipos 4, 5, 6 y 7). Los haplotipos no compartidos pueden ser consecuencia de mutaciones asociadas a eventos de colonización de nichos ecológicos nuevos (hospederos, ecosistemas o ambos). Esta capacidad de *P. culiacanum* para parasitar a diferentes géneros de plantas en diferentes ecosistemas fue documentada por Yatskievych (1985). También se puede deber a la expansión de los hospederos a nuevos territorios y la colonización posterior del parásito, como lo plantea deVega *et al.* (2008).

### Red de haplotipos

En la Figura 2 cada haplotipo está representado por un círculo color negro cuyo tamaño es proporcional a la frecuencia de las secuencias que lo compone. En color blanco están representados los vectores medios que fueron generados por el programa para unir haplotipos distantes. Los vectores medios pueden ser pasos mutacionales, subespecies extintas o no muestreadas. El análisis detectó tres grupos grandes de haplotipos: 1) a 51 pasos mutacionales de *Lennoa* (H 12) se encuentran los haplotipos 1 y 4; 2) a 160

evolutionary population unit (García-Franco *et al.*, 1998; Allendorf *et al.*, 2014), which is large enough to avoid the effects of genetic drift. However, in rare species –such as *P. culiacanum*–, where variation is equal or larger than in common species, evaluating other non-ecologic factors –such as life cycle strategies, reproductive attributes, demography, interaction with other organisms (the host in this case), and others factors– is advised (Eguiarte *et al.* 2007).

### Haplotype distribution

Haplotype 5 had the highest frequency (19), and it was found in Tosalibampo, Masiaca, San Blas and Cerro de Álamos; haplotype 6 had the highest distribution rate, and it was found in Culiacán, San Blas, Heraclio Sb, Masiaca and Cerro de Álamos (Figure 2).

Populations with unique haplotypes were Altata (haplotype 1), Culiacán (haplotypes 3, 9, and 11), Tosalibampo (haplotype 10), and Cerro de Álamos (haplotypes 2 and 8). The other three populations (Masiaca, San Blas, and Heraclio Sb) were made up entirely by haplotypes present in other populations (haplotypes 4, 5, 6, and 7). Unshared haplotypes can be the result of mutations related to the colonization of new ecological niches (hosts, ecosystems, or both). This *P. culiacanum* ability to parasitize different plant genera in different ecosystems was documented by Yatskievych (1985). It can also be a result of the expansion of hosts to new territories and the subsequent colonization of the parasite as proposed by deVega *et al.* (2008).

### Haplotype networks

In Figure 2, each haplotype is represented by a black circle the size of which is proportional to the frequency of the sequences that it is made up by. Mean vectors are represented in white and were generated by the software to link distant haplotypes. Mean vectors can be mutational steps, extinct, or not sampled subspecies. The analysis detected three major haplotype groups: 1) haplotypes 1 and 4, which are 51 mutational steps away from *Lennoa* (H12); 2) a group formed by haplotypes 2, 3, 5, 9, 10 and 11 is 160 steps away ; and 3) another group formed by haplotypes 6, 7 and 8 is 207 steps away. The

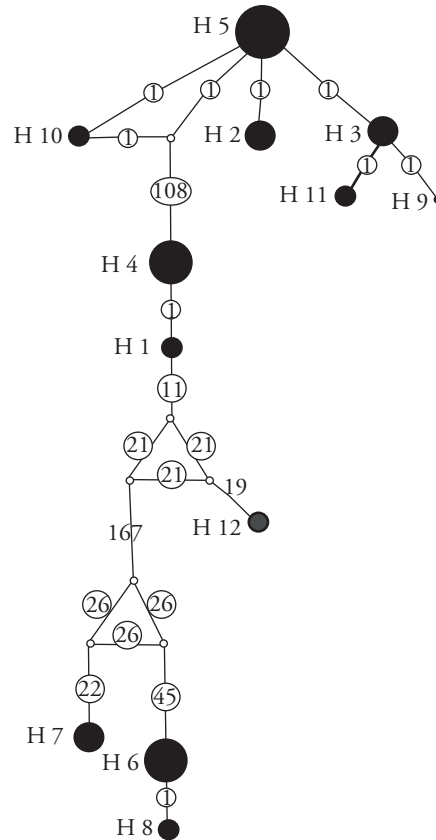
está un grupo formado por los haplotipos 2, 3, 5, 9, 10 y 11; 3) a 207 se encuentra otro grupo formado por los haplotipos 6, 7 y 8. Los métodos que utiliza la red de haplotipos están diseñados para modelar el pasado (evolutivo) mediante un proceso estocástico (coalescencia), el que está basado en el concepto de que los alelos en una población pueden rastrear-se hacia atrás en el tiempo, hasta el punto en el que coalescen en un alelo ancestral. De esta manera, los haplotipos más lejanos a las secuencias raíz (6, 7, 8, 3, 11 y 9) son los más recientes, y los haplotipos (1 y 4) son los más antiguos (Eguiarte *et al.*, 2007).

### Filogenia de haplotipos

El árbol filogenético de los 11 haplotipos mostró cuatro grupos: 1) grupo externo (*Lennoa*); 2) los haplotipos 1 y 4, como el grupo basal de *P. culiacanum* y más cercano a *Lennoa*; 3) una rama que se bifurca en dos grandes grupos (80 % de soporte), por un lado los haplotipos cercanos a los basales 6, 8 y 7 (100 % de soporte); 4) una rama (100 % de soporte), en la que se encuentran los haplotipos 2, 3, 5, 9, 10, 11. La distribución general coincidió con la presentada en la red de haplotipos, incluida la cercanía o no de las secuencias raíz (Figura 3).

El aspecto morfológico de las poblaciones varía geográficamente. Dos grupos grandes se diferenciaron. El primero se formó con las poblaciones de Altata y Heraclio Sb y el segundo con las poblaciones de Culiacán, Tosalibampo, San Blas, Masiaca y Cerro de Álamos. El primero se caracterizó por tener tallos delgados únicos o ramificados que se originan en un haustorio único, con un aspecto parecido a los de *Lennoa*. El segundo grupo se caracterizó por tener tallos únicos, gruesos, con diámetro mayor a 1 cm. Estas observaciones visuales coincidieron con la evidencia molecular, producto de los análisis de filogenia y red de haplotipos que ubicaron a la mayoría de los haplotipos pertenecientes a las poblaciones del grupo uno, alejados de los del grupo dos.

En la red de haplotipos se observó gran cantidad de pasos mutacionales entre los haplotipos que en su mayoría están formados por individuos correspondientes a las poblaciones de Altata y Heraclio Sb (haplotipos 1, 4, 6, 7 y 8) y el resto de las poblaciones. La filogenia de haplotipos también ubicó a estos haplotipos de poblaciones, morfológicamente diferentes, cercanos entre sí y a *Lennoa*. Otros aspectos



**Figura 2.** Red de haplotipos sin considerar indels, generada con el programa Networks (Bandelt *et al.*, 1998). Las H y sus números corresponden a los haplotipos encontrados.

**Figure 2.** Haplotype network without taking indels into consideration, generated with Networks software (Bandelt *et al.*, 1998). The Hs and the adjacent numbers indicate the haplotypes that were found.

methods used in haplotype networks are designed to model the evolutionary past via a stochastic process (coalescence), which is based on the idea that the alleles in a population can be traced back in time to the point where they coalesce with an ancestral allele. Therefore, the haplotypes furthest from the root sequence (6, 7, 8, 3, 11 y 9) are the most recent and the haplotypes closest to the root sequence (1 and 4) are the oldest (Eguiarte *et al.*, 2007).

### Haplotype phylogeny

The phylogenetic tree of the 11 haplotypes showed four groups: 1) the outgroup group (*Lennoa*); 2) haplotypes 1 and 4, as the basal group of *P. culiacanum* and the closest to *Lennoa*; 3) a



relevantes fueron la diferencia en el tipo de suelo donde se encuentran las poblaciones, dunas costeras (Altata) y suelo arenoso (Heraclio Sb); y suelos arcillosos de selva caducifolia, y los ecosistemas (selva espinosa, matorral xerófilo, selva subcaducifolia y selva caducifolia). *Pholisma arenarium* y *Pholisma sonora* comparten estos tipos de suelos (Nabhan, 1979; Felger, 1980; Yatskievych, 1985; Yatskievych y Mason, 1986; AGFD Plant Abstract, 2004). Lo anterior permite sugerir que estas poblaciones de *P. culiacanum* pertenezcan a otra especie del género *Pholisma* o a una sub especie de *P. culiacanum*. Por lo tanto, un análisis molecular comparativo entre las tres especies del género es necesario para determinar la razón de estas diferencias.

Dados los niveles altos de diversidad genética haplotípica es recomendable establecer zonas de conservación de recursos genéticos en las áreas de distribución de las poblaciones de Culiacán, Cerro de Álamos y Altata. Éstas abarcarían casi la totalidad de la diversidad genética de las poblaciones estudiadas y la mayoría de los haplotipos únicos quedarían dentro de las áreas conservadas. Esto es importante porque estas áreas de distribución son las más afectadas por actividades antropogénicas, como el desarrollo urbano y turístico, la agricultura, la tala de bosque primario y el cambio de uso de suelo.

branch which bifurcates into two major groups (80 % support), on the one hand, haplotypes close to the basal group 6, 8 and 7 (100 % support); and (4) a branch (100 % support) with haplotypes 2, 3, 5, 9, 10, 11. The general distribution matched the haplotype network diagram, including the proximity or distance from the root sequences (Figure 3).

Populations' morphology varies geographically. There were two major differentiated groups. The first one includes the populations of Altata and Heraclio Sb, and the second is made up by the populations of Culiacán, Tosalibampo, San Blas, Masiaca, and Cerro de Álamos. The former has characteristic thin or branched stems originating from a single haustorium, similar to those of *Lennoa*. The second group has one single thick stem, over 1 cm in diameter. These observed characteristics matched the molecular evidence that resulted from the phylogenetic analysis and the haplotype network, which located most of group 1 haplotypes far apart from group 2 haplotypes.

The haplotype networks showed several mutational steps between those haplotypes that are mostly formed by individuals from Altata and Heraclio Sb (haplotypes 1, 4, 6, 7 and 8) and those from all other populations. Haplotype phylogeny also located these morphologically different populations'

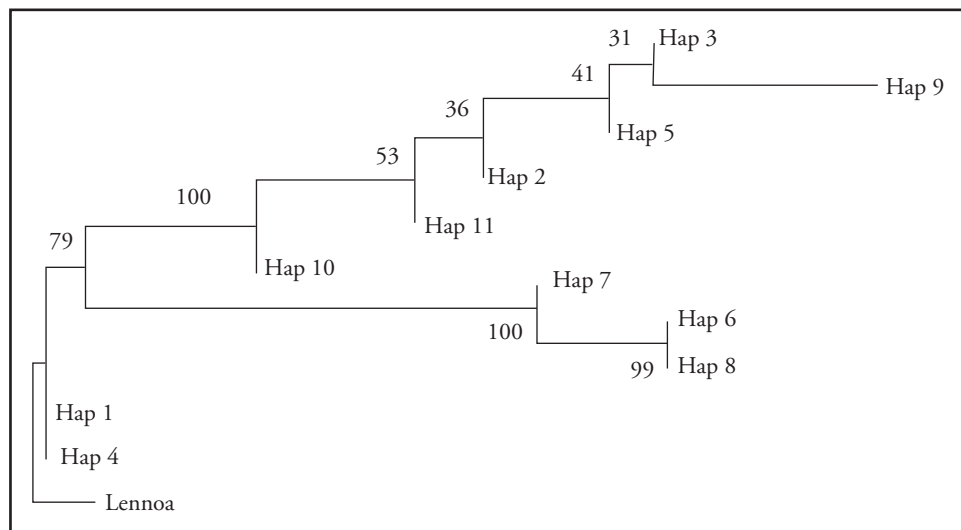


Figura 3. Filogenia de haplotipos de *Pholisma culiacanum* sin considerar indels utilizando el método Neighbor Joining, con el programa Mega (Tamura *et al.* 2007). Los valores de soporte de bootstrap son usando 1000 réplicas.

Figure 3. *Pholisma culiacanum* haplotype phylogeny, without taking indels into consideration and using the Neighbor Joining method with Mega software (Tamura *et al.* 2007). Support bootstrap values used 1000 iterations.

Con fines de explotación *in situ*, se recomienda la zona de distribución Tosalibampo porque los índices de diversidad genética y haplotípica fueron los menores, contó únicamente con dos haplotipos y fue la población más abundante.

## CONCLUSIONES

Las áreas de distribución de Culiacán, Cerro de Álamos y Altata se recomiendan como las de conservación de recursos genéticos y la zona de Tosalibampo para explotación *in situ*.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y su programa de fomento a la investigación PROFAPI #165 por proporcionar los fondos económicos para la realización de esta investigación. Al Dr. Nickrent por sus consejos en la investigación y el tiempo en su laboratorio en la Southern Illinois University en Carbondale. A José Fulgencio Martínez Rodríguez del Laboratorio de ecología molecular y funcional del Instituto de Ecología de la UNAM por su asesoría en las técnicas moleculares y el tiempo compartido el laboratorio.

## LITERATURA CITADA

- Amani, J., K. Roohallah, R. A. Ali, and H. S. Ali. 2011. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iran. J. Biotechnol.* 9: 69-71.
- Amico G. C., R. Vidal-Russell, and D. L. Nickrent. 2007. Phylogenetic relationships and ecological speciation in the mistletoe *Tristerix* (Loranthaceae): The influence of pollinators, dispersers, and hosts. *Am. J. Bot.* 94: 558-567.
- Amico, G. C., and D. L. Nickrent. 2009. Population structure and phylogeography of the mistletoes *Tristerix corymbosus* and *T. aphyllus* (Loranthaceae) using chloroplast DNA sequence variation. *Am. J. Bot.* 96: 1571-1580.
- Allendorf, F. A., G. Luikart, and S. N. Aitken. 2014. Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell. 2nd ed. 624 p.
- Arizona Game and Fish Department. 2004. Lennoaceae. PDL-NN02020. Unpublished abstract compiled and edited by the Heritage Data Management System, Arizona Game and Fish Department, Phoenix, AZ. 3 p.
- Azmat, M. A., A. K. Iqar, M. N. Hafiza C., A. R. Ishtiaq, S. K. Ahmad, and A. H. Asif. 2012. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera Indica* L. *J. Zhejiang University-Science B. Biomed. Biotechnol.* 13: 239-243.
- Bandelt, H., P. Forster, and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Bungard, R. A. 2004. Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. *BioEssays* 26: 235-247.
- haplotypes close to each other and to *Lennoa*. Other relevant characteristics were the different kind of soils in which the populations were found, ranging from coastal dunes (Altata) and sandy soil (Heraclio Sb), to clay soil in deciduous forests and the ecosystems (thorn forest, xeric shrublands, deciduous and semi-deciduous forests). *Pholisma arenarium* and *Pholisma sonora* share these types of soil (Nabhan, 1979; Felger, 1980; Yatskievych, 1985; Yatskievych and Mason, 1986; AGFD Plant Abstract, 2004), which might suggest that these *P. culiacanum* populations belong to a different species of the *Pholisma* genus or to a *P. culiacanum* subspecies. For this reason, a comparative molecular analysis of the three species of the genus is necessary to determine the reason for these differences.
- Given the high levels of haplotype genetic diversity, it is advisable to establish genetic resources conservation areas in the Culiacán, Cerro de Álamos and Altata ranges. These would include almost all the genetic diversity of the studied populations and most of the unique haplotypes would be found in the preserved areas. This is important because the aforementioned ranges are the most affected by anthropogenic activities, such as urban and touristic developments, agriculture, forestry, and land-use changes.
- The Tosalibampo range is recommended for *in situ* exploitation, because the genetic diversity and haplotype indexes were the lowest; only two haplotypes were found and it had the most abundant population.

## CONCLUSIONS

The Culiacán, Cerro de Álamos and Altata ranges are recommended as genetic resources conservation areas, while the Tosalibampo range is recommended for *in situ* exploitation.

—End of the English version—

-----\*-----

- CodonCode Corporation, 2009. CodonCode Aligner versión 3.5. <http://www.codoncode.com/>. (Consulta: Febrero 2010).
- Cota-Sánchez, H. J., K. Remarchuk, and U. A. Kumary. 2006. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 24: 161-167.
- dePamphilis C. W., D. Y. Nelson, and A. D. Wolfe. 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* 94: 7367-7372.
- deVega, C., R. Berjano, M. Arista, P. L. Ortiz, T. Salvador, and T. F. Stuessy. 2008. Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (Cytinaceae) in the western mediterranean basin. *New Phytol.* 178: 875- 887.
- Doyle, J. J. 1991. DNA Protocols for plants. In: Hewitt, G., A. W. B. Johnson, and J. P. W. Young (eds), *Molecular Techniques In Taxonomy*. NATO ASI Series H, Cell Biol. 57: 283-293.
- Dressler, R. L. 1968. A second species of *Ammobroma* (Lennoaceae) in Sinaloa, Mexico. *Madroño* 19: 179-182.
- Excoffier, L., and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Funk, H. T., S. Berg, K. Krupinska, U. G. Maier, and K. Krause. 2007. Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *Plant Biol.* 45: 1-12.
- García-Franco, J. G., V. Souza, L. E. Eguiarte, and V. Rico-Gray. 1998. Genetic variation, genetic structure and effective population size in tropical holoparasitic endophyte *Bdallophyton bambusarum* (Rafflesiaceae). *Plant Syst. Evol.* 210: 271-288.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser* 41: 95-98.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4ta ed. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA. 652 p.
- Hedrick, P. W. 2005. *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett. Third Edition. USA. 725 p.
- Heinze, B. 2007. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Method* 3: 1-7.
- Holzapfel, S., M. Z. Faville, and C. E. Gemmill. 2002. Genetic variation of the endangered holoparasite *Dactylanthus taylorii* (Balanophoraceae). *J. Biogeogr.* 29: 663-676.
- Jerome, C. A., and B. A. Ford. 2002-a. The discovery of three genetic races of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) provides insight into the evolution of parasitic angiosperms. *Mol. Ecol.* 11: 387-405.
- Krizman, M., J. Jernej, B. Dea, J. Branka, and P. Mirko. 2006. Robust CTAB-activated harcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta Agriculturae Slovenica* 87: 427-433.
- Librado, P., and J. Rosas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Mutikainen, P., and T. Koskela. 2002. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. *Heredity* 89: 318-324.
- Nabhan G. P. 1980. The ecology of floodwater farming in southwestern North America. *Agroecosy.* 5: 245-55.
- Nickrent, D. L. and M. A. García. 2009. On the brink of holoparasitism: plastome evolution in dwarf mistletoes (*Arceuthobium*, Viscaceae). *J. Mol. Evol.* 68: 603-615.
- Zuber, D., and A. Widmer. 2000. Genetic evidence for host specificity in the hemi-parasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Mol. Ecol.* 9: 1069-1073.
- Polzin, T., and S. V. Daneschmand. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper. Res. Lett.* 31:12-20.
- Porebski, S., Grant B., and R. B. Bernard. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8-15.
- Sá, O., J. A. Pereira and P. Baptista. 2011. Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 4156-4164.
- Sánchez-Hernández, C., and J. C. Gaytán-Oyarzún. 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *African J. Biotech.* 5: 1864-1867.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17:1105-1109.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Yatskievych, G. 1985. Notes on the biology of the Lennoaceae. *Cactus Succulent* 57: 73-79.
- Yatskievych, G. and C. T. Mason. 1986. A revision of the Lennoaceae. *Syst. Bot.* 11: 531-584.