



Universidad Nacional de Cuyo



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS
BÁSICAS, ORIENTACIÓN BIOLOGÍA.

“ANÁLISIS EVOLUTIVO Y GENÉTICO DE PLANTAS PARÁSITAS DEL
GÉNERO *Lophophytum*”

Alumna: Josefina Wohlfeiler Altavilla

Directora: Dra. María Virginia Sánchez Puerta

Octubre 2016

AGRADECIMENTOS

A mi directora, la Dra. Virginia Sánchez Puerta, por su buena predisposición, por su tiempo dedicado en mi aprendizaje, y por despertar mi interés en Evolución Molecular y en la Ciencia.

A las autoridades y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su profesionalismo y dedicación durante estos años.

A la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la UNCuyo, por otorgarme dos becas de investigación.

Al Dr. Héctor Sato de la Universidad Nacional de Jujuy, por la recolección y fotografías del material de estudio.

A mis compañeros del IBAM, por haberme brindado su apoyo y alegría a lo largo de este camino. En especial a Laura, Cinthia, Fede, Gaby y Caro por haberme ayudado y transmitido conocimientos que me fueron de gran ayuda.

A Florencia Jofré y Josefina Menéndez por haber preparado tantas materias juntas, haber sobrellevado mis ataques de nervios y mi mal humor antes de rendir, y por ser amigas incondicionales.

A mis amigos y compañeros de estudio, por los lindos momentos que compartimos durante la carrera y por su gran ayuda cada vez que lo necesité. Especialmente a Facundo Agüero, Nicolás Jerez, Celeste Calderón, Gonzalo Lucero, Sebastián Drajlin, Cristian Rodríguez y Julio Ruiz.

A todos los integrantes de mi familia, a mi abuela Ñeca, mis padres, mis hermanas, primos y tíos, por alentarme y acompañarme con alegría durante toda mi carrera.

A la familia San Martín, por tantos mates, oraciones y buena onda.

A mi novio Pelu, por estar a mi lado en todo momento, por darme aliento, calma, buenos consejos, alegría y entusiasmo cada vez que lo necesité.

ÍNDICE

RESUMEN	6
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	7
I.1) Plantas parásitas	7
I.1.1) Biología de las plantas parásitas	7
I.1.1.1) Modos de nutrición	8
I.1.1.2) Rango de hospedador	8
I.1.2) Taxonomía de las plantas parásitas	9
I.1.3) Filogenia de las plantas parásitas	9
I.2) Orden Santalales	9
I.2.1) Familia Balanophoraceae	11
I.2.2) Género <i>Lophophytum</i>	11
I.3) Transferencia horizontal de genes	12
I.3.1) Transferencia horizontal en los tres dominios de la vida	13
I.3.2) Transferencia horizontal en plantas	13
I.3.3) Mecanismos	15
I.4) Genomas citoplasmáticos de las plantas	16
I.4.1) Genoma mitocondrial de las plantas	16
I.4.2) Genoma cloroplastídico de las plantas	17
I.4.3) Sitios de edición del ARN	18
I.5) Objetivos	18
I.5.1) General	18
I.5.2) Específicos	19
I.6) Hipótesis	19

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	20
II.1) Recolección del material	20
II.2) Extracción de ADN y gel de visualización	20
II.3) Amplificación de genes mitocondriales, cloroplastídicos y nucleares	20
II.4) Electroforesis	22
II.5) Purificación de productos de PCR	23
II.6) Secuenciación	23
II.7) Southern Blot	23
II.8) Alineamientos	23
II.9) Árboles filogenéticos	24
CAPÍTULO III: RESULTADOS	25
III.1) Extracción de ADN	25
III.2) Amplificación por PCR de genes mitocondriales, cloroplastídicos y nucleares	25
III.3) Análisis filogenéticos	27
III.3.1) Análisis del gen nuclear ADNr <i>18S</i>	27
III.3.2) Análisis del gen cloroplastídico <i>rbcL</i>	27
III.3.3) Análisis evolutivos de genes mitocondriales	33
III.3.4) Análisis de bootstrap de los árboles filogenéticos	54
III.4) Southern Blot	54
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	56
IV.1) Filogenia de Santalales, Balanophoraceae y <i>Lophophytum</i>	56

IV.2) Transferencia horizontal de genes mitocondriales entre parásitas y hospedadoras	57
IV.2.1) ¿Son funcionales los genes foráneos en las parásitas?	58
IV.3) Gen cloroplastídico <i>rbcL</i> en plantas parásitas	58
CAPITULO V: BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

Antecedentes: Las plantas parásitas representan alrededor del 1% de las plantas con flor. Éstas tienen la habilidad de nutrirse de otras plantas al invadir los tallos o las raíces de la planta hospedadora mediante una estructura llamada haustorio, la cual interconecta el tejido vascular de la planta parásita con el de la hospedadora. El parasitismo se originó aproximadamente 12 veces en las angiospermas desde ancestros de vida libre. La taxonomía de las plantas parásitas está aún siendo dilucidada debido a la escasez de caracteres morfológicos y a las dificultades que presentan para la sistemática molecular. El efecto más intrigante de la conexión directa parásito-hospedador es la transferencia horizontal de genes que podría ser clave para la evolución de las angiospermas parásitas. El orden Santalales comprende al menos ocho familias con plantas hemiparásitas, holoparásitas y de vida libre, que estarían relacionadas con la familia Balanophoraceae. A su vez, el género de holoparásitos de raíces *Lophophytum* pertenecería a esta última. Sin embargo, no hay análisis filogenéticos que evalúen estas hipótesis taxonómicas. Actualmente, es muy común para determinar las afinidades filogenéticas de linajes de angiospermas parásitas emplear secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt), sin embargo, el uso de éste para estudios taxonómicos de plantas parásitas debe considerar la posibilidad de transferencia génica horizontal.

Resultados: Se analizaron ocho genes de dos especies de *Lophophytum*, *L. mirabile* y *L. leandri*. Dos genes permitieron evaluar las relaciones evolutivas de la familia Balanophoraceae, que resultó ser polifilética, dividida en dos linajes independientes. Se identificaron cinco casos de genes mitocondriales foráneos en ambas parásitas, que fueron obtenidos de sus hospedadores leguminosas. Hibridaciones por Southern Blot mostraron una única copia de los genes foráneos *cob* y *atp1* en *Lophophytum mirabile*.

Conclusiones: A partir de los análisis filogenéticos se infirió que la familia Balanophoraceae no forma un grupo monofilético y ambos linajes de esta familia forman parte del orden Santalales. El grupo hermano del género *Lophophytum* fue el género *Ombrophytum*. Se encontró evidencia de cinco genes mitocondriales foráneos adquiridos por transferencia horizontal en sentido hospedador-parásito. Dos de ellos sugieren transferencia funcional debido a que reemplazaron a los genes homólogos nativos y son genes universalmente presentes en las angiospermas.

Palabras clave: ADN mitocondrial, Balanophoraceae, holoparásita, *Lophophytum leandri*, *Lophophytum mirabile*, transferencia horizontal de genes.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1) Plantas parásitas

En los ambientes naturales, las plantas están en constante interacción con una multitud de diversos organismos y están íntimamente asociadas con otras plantas. Las epífitas crecen sobre otras plantas utilizándolas de soporte. En otros casos, como en la pipa de indio (*Monotropa uniflora*), obtienen nutrientes indirectamente de otras plantas vía puentes de micorrizas que las conectan con raíces de hospedadores. Una interacción más directa planta a planta se da entre plantas parásitas y sus hospedadores (Estabrook & Yoder, 1998).

El parasitismo es una estrategia de vida altamente exitosa y está presente en diversos linajes incluyendo bacterias, arqueas, hongos, animales, protistas, algas y plantas. La mayoría de las plantas son organismos autótrofos, es decir que satisfacen sus necesidades de carbono únicamente a través de la fijación de carbono inorgánico (Westwood *et al.*, 2010). Sin embargo, un número significativo de plantas ha adoptado el modo de vida heterótrofo obteniendo parte o todos sus requerimientos a partir de otros organismos. Éstas pueden dividirse en micoheterótrofas (viven en simbiosis con hongos a través de los cuales se alimentan de materia orgánica en descomposición); y las denominadas parásitas que tienen la habilidad de alimentarse directamente de otras plantas al invadir sus tallos o raíces.

Una de las consecuencias de la transición hacia la heterotrofia es la disminución en la presión evolutiva para conservar los procesos fotosintéticos, que resulta en pérdidas de genes cloroplásticos, y en algunos casos, del genoma o la organela completa (Krause, 2008; Molina *et al.*, 2014).

I.1.1) Biología de las plantas parásitas

Las plantas parásitas son comunes en distintos ecosistemas naturales y seminaturales, desde bosques pluviales tropicales hasta el Ártico. Además poseen diversas formas de vida, incluyendo hierbas anuales y perennes, vides, arbustos y árboles (Press & Phoenix, 2005).

Muchas veces el parasitismo reduce severamente el desempeño del hospedador, lo cual lleva a que se produzcan cambios en las interacciones competitivas entre plantas hospedadoras y no hospedadoras. Esto, a su vez induce una cascada de efectos en la estructura de las comunidades, diversidad, ciclo vegetativo y zonificación (Press & Phoenix, 2005).

Existen diferentes modos de invadir las plantas hospedadoras: algunas parásitas invaden las raíces, mientras que otras invaden las partes aéreas de la planta hospedadora. En cualquier caso, la invasión del tejido vascular del hospedador y la extracción de recursos están mediadas por una estructura llamada haustorio. La misma se utiliza para interconectar el tejido vascular de la planta parásita con el de la planta hospedadora, y permitir así la transferencia de nutrientes, agua e incluso material genético. Los haustorios se encuentran únicamente en las plantas parásitas (Estabrook & Yoder, 1998; Westwood *et al.*, 2010). A su vez, una especialización del parasitismo consiste en el endoparasitismo, en el cual la mayor parte de la porción vegetativa del parásito vive dentro del hospedador, emergiendo del mismo sólo durante la reproducción sexual. Una ventaja selectiva de esta

especialización podría ser la evasión de herbívoros, así como también, vivir en un ambiente homeostático (Barkman *et al.*, 2007).

I.1.1.1) Modos de nutrición

Existen dos tipos básicos de parasitismo: hemiparasitismo y holoparasitismo. Los hemiparásitos tienen clorofila y realizan fotosíntesis al menos en algún momento de su ciclo de vida, sin embargo obtienen agua y nutrientes de la planta hospedadora a través de conexiones haustoriales. A su vez, los hemiparásitos pueden ser divididos en dos tipos: facultativos y obligados. Esta clasificación se basa en el grado de dependencia con el hospedador (Nickrent, 2002a). Los hemiparásitos facultativos pueden vivir autotróficamente y reproducirse sin estar en contacto con el hospedador, pero oportunamente parasitan a plantas hospedadoras cuando están disponibles. Es decir, no requieren un hospedador para completar su ciclo de vida (Nickrent, 2002a; Westwood *et al.*, 2010). En cambio, los hemiparásitos obligados deben parasitar a la planta hospedadora para poder completar su ciclo de vida. Entre estos últimos, se pueden diferenciar dos tipos: primitivos y avanzados. Los hemiparásitos obligados primitivos, son plantas fotosintéticas que se fijan al xilema. En contraste, los hemiparásitos obligados avanzados se unen, no sólo al xilema del hospedador, sino que también obtienen carbono a través de conexiones con el floema (Nickrent, 2002a).

La manifestación más extrema del parasitismo se presenta en las plantas holoparásitas (aproximadamente el 10% de las plantas parásitas descritas) (Heide-Jørgensen, 2008), siendo éstas totalmente aclorófitas y obteniendo todos sus nutrientes del hospedador, de quien son absolutamente dependientes. La mayoría de las plantas holoparásitas acontecen en las raíces del hospedador, sin embargo, existen unas pocas especies holoparásitas de tallos que han perdido la enzima RuBisCO, los tilacoides y la clorofila (Nickrent, 2002a; Westwood *et al.*, 2010). Dependiendo de la especie, las plantas holoparásitas pueden no contener raíz, tallo, hojas, nudos o brotes laterales. Además, muchas carecen de epidermis, estomas, cutícula, pelos absorbentes de la raíz y endodermis (González & Mauseth, 2010).

I.1.1.2) Rango de hospedador

Es importante resaltar dos conceptos: rango de hospedador y preferencia por el hospedador. El rango de hospedador se refiere al número total de especies diferentes que pueden ser infectadas por una planta parásita. En cambio, la preferencia por el hospedador, se relaciona con la elección del hospedador más deseado para lograr un crecimiento óptimo; pero cuando estos parásitos se encuentran con otros hospedadores en condiciones artificiales, el parasitismo también puede ocurrir, lo cual indica un rango de hospedador más extenso (Nickrent, 2002a; Nickrent & Musselman, 2004). La mayoría de las plantas parásitas son generalistas, aunque hay excepciones de plantas parásitas que sólo atacan una única especie o género de angiospermas (Press & Phoenix, 2005). La estrategia especialista probablemente tiene ventajas contra la estrategia generalista cuando los hospedadores son comunes en la naturaleza; pero desde una perspectiva evolutiva, los generalistas posiblemente persisten más en tiempo geológico, lo cual podría explicar por qué la mayoría de las plantas parásitas con flor son generalistas (Nickrent, 2002a).

I.1.2) Taxonomía de las plantas parásitas

Las plantas hemi y holoparásitas representan alrededor del 1% de las plantas con flor, con aproximadamente 4200 especies (Nickrent, 2002a). Dentro de las angiospermas se han identificado 28 linajes de plantas parásitas que habrían surgido 12 veces de forma independiente a partir de ancestros de vida libre (Nickrent, 2002b; Barkman *et al.*, 2007; Filipowicz & Renner, 2010). Los linajes parásitos incluyen a: Apodanthaceae, Cytinaceae, Mitrastemonaceae, Santalales (incluyendo las Balanophoraceae), Cynomoriaceae, Hydnoraceae, Rafflesiaceae, Convolvulaceae, Krameriaceae, Lauraceae, Lennoaceae y Orobanchaceae (Figura 1). Sin embargo, la taxonomía de las plantas parásitas está aún siendo dilucidada debido a la escasez de caracteres morfológicos (producto de la extrema reducción o modificación de la morfología floral y vegetativa en las plantas holoparásitas) y a las dificultades que presentan para la sistemática molecular. Los datos moleculares utilizados para inferir las relaciones filogenéticas pueden dar resultados artificiales o inconclusos, ya que los parásitos carecen de los marcadores moleculares cloroplastídicos típicamente utilizados para la taxonomía de plantas (dePamphilis & Palmer 1990; Nickrent *et al.*, 1997) o poseen secuencias de ADN altamente divergentes debido a elevadas tasas de sustitución (Nickrent *et al.*, 2004; Barkman *et al.*, 2007).

I.1.3) Filogenia de las plantas parásitas

Barkman *et al.* (2007) realizaron un análisis de máxima verosimilitud resultando en un árbol filogenético (Figura 1) que representa la ubicación taxonómica de todos los linajes parásitos en el contexto global de las angiospermas. El mismo indica 12 orígenes independientes de plantas parásitas (especificados en el párrafo anterior) nueve de los cuales consisten completamente en especies holoparásitas (Apodanthaceae, Rafflesiaceae, Cynomoriaceae, Cytinaceae, Balanophoraceae, Mitrastemonaceae, Lennoaceae, Orobanchaceae e Hydnoraceae). A su vez, revela cuatro orígenes de endoparasitismo en diferentes linajes: Apodanthaceae, Rafflesiaceae, Cytinaceae y Mitrastemonaceae. Estas observaciones indican que ni las plantas endoparásitas ni las holoparásitas representan grupos monofiléticos (Barkman *et al.*, 2007; Filipowicz & Renner, 2010). La importancia de identificar a los grupos monofiléticos en un análisis filogenético es que éstos incluyen miembros que comparten un ancestro común. Por tanto, son considerados cercanamente relacionados si el ancestro común es reciente, y lejanamente relacionados si el ancestro común más reciente es antiguo (Baum & Shaw, 1995; Futuyma, 2013). De esta manera se pueden establecer relaciones filogenéticas entre distintas especies y las mismas pueden reflejarse en la taxonomía.

I.2) Orden Santalales

Santalales es un orden de las angiospermas que contiene 18 familias, 160 géneros, y más de 2200 especies (Nickrent *et al.*, 2010). Este orden está compuesto mayormente por plantas hemiparásitas, pero también incluye plantas autótrofas confinadas a tres familias pequeñas (Erythropalaceae, Strombosiaceae, y Coulaceae), y holoparásitos de las familias Balanophoraceae y Mystropetalaceae. Con este número de especies, las Santalales forman el grupo más grande de plantas parásitas que comprende casi la mitad del total de plantas parásitas conocidas hasta el momento (Petersen *et al.*, 2015).

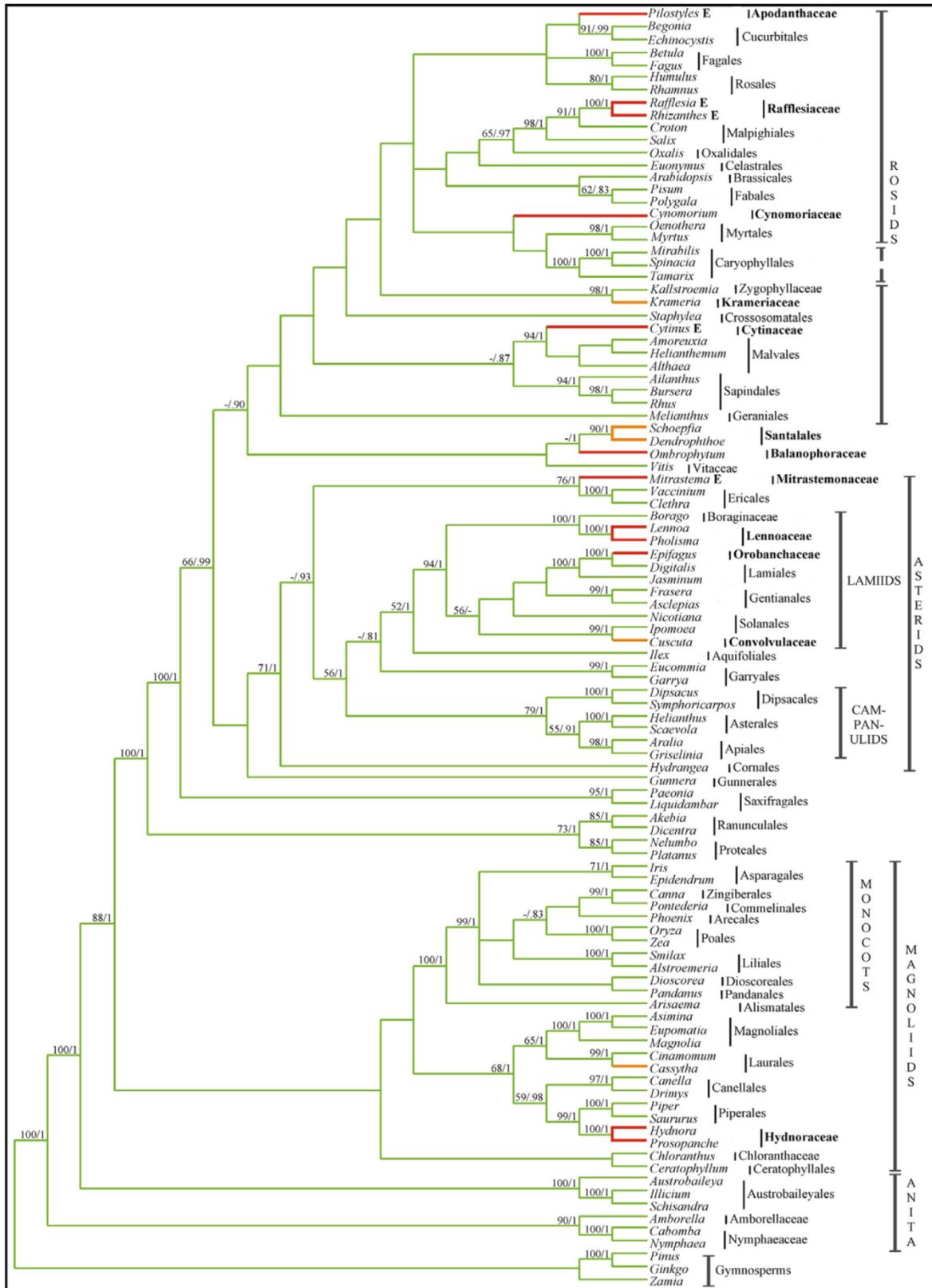


Figura 1) 12 orígenes del parasitismo en la filogenia de las angiospermas. Las ramas verdes corresponden a plantas no parásitas, las anaranjadas, a hemiparásitas, y las rojas son linajes holoparásitos. La letra E indica linajes endoparásitos (Figura adaptada de Barkman *et al.*, 2007).

I.2.1) Familia Balanophoraceae

La familia Balanophoraceae incluye 17 géneros de holoparásitos de raíces (Nickrent *et al.*, 2005; Barkman *et al.*, 2007), que están relacionados filogenéticamente con las plantas del orden Santalales. Sin embargo, la afiliación filogenética de esta familia y de las especies del orden Santalales aún es controversial. A pesar de que las Santalales son las mejores candidatas como el ancestro de las Balanophoraceae, muchas similitudes entre estos dos grupos podrían ser el resultado de convergencia adaptativa hacia el parasitismo (Nickrent *et al.*, 2005).

Esta familia se distribuye principalmente en selvas tropicales, y se presenta frecuentemente en altitudes elevadas. Existen especies dioicas y monoicas (Heide-Jørgensen, 2008). En cuanto a la descripción morfológica, la familia Balanophoraceae incluye plantas carnosas de colores blanquecino, amarillento, anaranjado, rojizo y púrpúreo. Estas plantas no presentan el cuerpo diferenciado en raíz, tallo y hojas sino que desarrollan un cuerpo vegetativo llamado túber, parcial o totalmente subterráneo y de forma variable. De éste se desarrollan una o más inflorescencias que pueden ser aéreas, parcialmente o totalmente subterráneas, y que emergen sólo durante la época de floración (Sato, 2014). Esta familia es considerada una de las más avanzadas de plantas parásitas con flor debido a la intensa reducción de sus partes florales y vegetativas. El rango de hospedador que presentan la mayoría de las especies de Balanophoraceae es extenso (Heide-Jørgensen, 2008).

I.2.2) Género *Lophophytum*

Según estudios morfológicos, el género *Lophophytum* pertenecería a la familia Balanophoraceae (González & Mauseth, 2010). Sin embargo, ninguna especie del género ha sido hasta el momento analizada molecularmente y por lo tanto no hay análisis filogenéticos que evalúen dicha hipótesis taxonómica. Tampoco se conoce cuál sería el grupo hermano del género *Lophophytum* dentro de la familia ni la diversidad genética entre especies del género.

El género *Lophophytum* abarca plantas parásitas de raíces extremadamente ricas en almidón. Se encuentra parasitando mayormente a *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae, Mimosoideae), sin embargo se han reportado otras cinco especies de leguminosas Mimosoideae como hospedadoras de este género: *Anadenanthera macrocarpa*, *Piptadenia* sp., *Parapiptadenia rigida*, *Inga* sp. y *Enterolobium* sp. (Hansen, 1980). *Lophophytum* es exclusivamente sudamericano y comprende cinco especies, dos de las cuales crecen en la Argentina: *L. leandri* en Corrientes y Misiones, y *L. mirabile* en Salta y Jujuy (Sato & González, 2013). Estas últimas, son especies holoparásitas de raíces de árboles que desarrollan un cuerpo vegetativo o túber completamente subterráneo, del cual sólo emergen las inflorescencias compuestas de origen endógeno (González & Mauseth, 2010). Ambas especies son monoicas. Un carácter utilizado para distinguir a estas dos especies de *Lophophytum* es el perianto: en *L. mirabile* el perianto está constituido por una sola pieza, mientras que en *L. leandri*, por dos piezas (Sato, 2014).

Esta tesina consiste en el estudio taxonómico, genético y evolutivo de dos especies holoparásitas del género *Lophophytum*, *L. leandri* (Figura 2) y *L. mirabile*, parásitas de las angiospermas *Parapiptadenia rigida* y *Anadenanthera colubrina*, respectivamente. Ambas plantas hospedadoras pertenecen a la subfamilia Mimosoideae de la familia Fabaceae.



Figura 2) Inflorescencia de *Lophophytum leandri* emergiendo del túber subterráneo. Foto tomada por Héctor Sato en provincia de Misiones. Barra = 5 cm.

I.3) Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes (THG), también conocida como transferencia lateral de genes, se refiere al movimiento de información genética entre organismos más o menos relacionados, atravesando las barreras de cruzamiento normal y distinguiéndose así de la transmisión vertical estándar desde progenitores a su progeñe (Kelling & Palmer, 2008). Este mecanismo permitiría a los organismos adquirir tanto caracteres adaptativos como no adaptativos, pre-existentes de otros organismos, a pesar de las distancias filogenéticas. Entonces, en lugar de que los rasgos genéticos entre los linajes emerjan gradualmente a través de sucesivas mutaciones y selección, con la THG, la evolución está acelerada por un proceso paralelo en el cual las novedades ocurridas en diferentes linajes

pueden reunirse en una única célula (Fournier *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayoría de los casos reportados de THG en eucariotas (plantas en particular) no otorgan ninguna ventaja adaptativa, siendo posiblemente el resultado de la deriva génica (azar).

I.3.1) Transferencia horizontal en los tres dominios de la vida

El árbol de la vida se divide en tres grandes Dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (Woese, 1990). El material genético ha sido transferido horizontalmente numerosas veces en la historia de la vida, atravesando linajes completamente distintos. Esta transferencia ocurre también frecuentemente entre el genoma nuclear y los genomas de organelas dentro de una misma célula eucariota (Futuyma, 2013). En este caso, el término que utilizamos es transferencia intracelular de genes (TIG).

El proceso de THG es notablemente común en la evolución procariótica, conduciendo a la adquisición o modificación de rasgos importantes como la resistencia a antibióticos, virulencia, fotosíntesis y fijación de nitrógeno. En contraste, la imagen actual de este proceso en eucariotas es sin duda muy variada. La THG es en gran medida desconocida en eucariotas multicelulares (animales, plantas y hongos), sin embargo, es más o menos común en diversos grupos de protistas unicelulares, los cuales contienen varios a muchos genes producto de la THG (Bergthorsson *et al.*, 2004; Richardson & Palmer, 2007). Quizá la causa de dicha diferencia en abundancia de la THG entre estos dos últimos grupos, sea que los eucariotas unicelulares no poseen una célula germinal retenida; y que además, frecuentemente éstos engullen sus presas liberando ADN cerca del núcleo (Richardson & Palmer, 2007) lo cual facilita el mecanismo.

Existen además, evidencias de THG interdominios que involucran procariotas y eucariotas multicelulares superiores. Por ejemplo, las asociaciones endosimbióticas entre la bacteria *Wolbachia pipientis* con varias especies de artrópodos proveen un contexto propicio para la THG (Hotopp *et al.*, 2007). La THG también parece ocurrir frecuentemente entre microorganismos y vertebrados; o bien entre vertebrados (Salzberg *et al.*, 2001). La reciente secuenciación del genoma del lagarto *Anolis carolinensis* revela una amplia transferencia horizontal de transposones entre diversos vertebrados, incluyendo primates, murciélagos y marsupiales. Estos transposones muestran una baja divergencia en sus secuencias entre especies, y difieren primariamente en los sitios sinónimos (Novick *et al.*, 2010).

I.3.2) Transferencia horizontal en plantas

En las últimas dos décadas, el intercambio de material genético entre plantas terrestres ha sido inferido en diferentes linajes. Las especies involucradas provienen de clados ampliamente separados tanto geográfica como filogenéticamente. Los clados corresponden a helechos, gimnospermas y angiospermas, lo que insinúa que la THG entre plantas está relativamente extendida (Renner & Bellot, 2012). La mayoría de los casos implican transferencias de una angiosperma a otra, pero la causa de esto bien podría ser que la mayoría de los genes secuenciados en plantas son de angiospermas (Richardson & Palmer, 2007).

Las interacciones entre plantas parásitas y hospedadoras han resultado facilitadoras de la THG. Muchos nutrientes y macromoléculas, incluyendo ARN mensajeros (ARNm) y ADN son transferidos entre la planta hospedadora y la parásita (Davis & Xi, 2015). Hasta ahora han sido identificadas transferencias de genes en ambos sentidos, es decir, desde parásito a hospedador (Davis & Wurdack, 2004; Mower *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005;

Yoshida *et al.*, 2010), y también desde hospedador a parásito (Davis & Wurdack, 2004; Roney *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2013), pero la mayoría aluden a transferencias de hospedador a parásito. La evidencia de la THG ha sido identificada en 10 de los 12 linajes parásitos identificados hasta ahora (Tabla 1), e involucra predominantemente ADN mitocondrial (Davis & Xi, 2015).

La THG que involucra ADN plastídico, por el contrario, es rara. Esto es probablemente debido al hecho de que los plástidos no presentan mecanismos de captación de ADN, y además tienen pocas regiones intergénicas, las cuales permiten que los genes foráneos sean insertados sin perturbar la expresión de los genes nativos (Davis & Xi, 2015).

Por último, nuestro conocimiento acerca de la THG que involucra ADN nuclear todavía está en sus comienzos, quizá debido a la escasez de genomas nucleares completos disponibles para poder abordar este tema en un trabajo comparativo (Davis & Xi, 2015).

Algunos ejemplos de THG entre plantas incluyen: a) intrón del gen mitocondrial *cox1* fue transferido entre cientos (o miles) de plantas con flor (Adams *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1998; Cho & Palmer, 1999; Sánchez-Puerta *et al.*, 2008; Sánchez Puerta *et al.*, 2011); b) la angiosperma basal *Amborella* ha adquirido copias de genes mitocondriales que codifican proteínas, desde otras plantas terrestres, y además ha obtenido genomas mitocondriales enteros de tres algas verdes y un musgo (Bergthorsson *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2013); c) la planta parásita *Striga hermontica* (familia Orobanchaceae) obtuvo un gen nuclear de un hospedador monocotiledónea (Yoshida *et al.*, 2010); d) la parásita de tallo *Cuscuta australis* así como la parásita de raíz *Orobanche aegyptiaca* mostraron similitudes mucho más altas en secuencias nucleares con Brassicaceae que con sus parientes cercanos (Zhang *et al.*, 2014); e) la parásita *Phelipanche aegyptiaca* adquirió genes nucleares de una leguminosa (Zhang *et al.*, 2013); f) varias docenas de genes fueron posiblemente transferidos núcleo a núcleo entre Rafflesiaceae y sus hospedadores (Davis & Wurdack, 2004; Xi *et al.*, 2012); g) parte del genoma mitocondrial del helecho *Botrychium virginianum* fue adquirido por THG desde una Loranthaceae (Santalales) (Davis *et al.*, 2005); h) la THG mitocondriales en la familia Rafflesiaceae es considerablemente mayor que la THG que involucra genes nucleares (Xi *et al.*, 2013); e i) tres genes mitocondriales fueron transferidos desde el género de parásitas *Cuscuta* a especies del género *Plantago* (Mower *et al.*, 2010).

De las evidencias de THG reportadas hasta ahora en plantas parásitas se desprende que, la mayoría de estos eventos implica ADN mitocondrial, y que las asociaciones físicas, por ejemplo entre plantas parásitas y sus hospedadores, facilitan la THG planta a planta (Renner & Bellot, 2012). Los genes mitocondriales transferidos parecen instalarse en los genomas mitocondriales de los parásitos, y la mayoría corresponden a intrones y pseudogenes no funcionales (Renner & Bellot, 2012; Davis & Xi, 2015).

Tabla 1. Resumen de los eventos de transferencia horizontal de genes que involucran plantas parásitas.
(Adaptada de Davis & Xi, 2015).

Clado	Transgenes	Referencia
Apodanthaceae	1 gen mitocondrial	Nickrent <i>et al.</i> , 2004
	2 genes mitocondriales	Barkman <i>et al.</i> , 2007
Convolvulaceae	1 gen mitocondrial	Mower <i>et al.</i> , 2004
	3 genes mitocondriales	Mower <i>et al.</i> , 2010
Cynomoriaceae	1 gen nuclear	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	2 genes mitocondriales	Barkman <i>et al.</i> , 2007
Hydnoraceae	1 gen mitocondrial	Barkman <i>et al.</i> , 2007
Lauraceae	1 gen mitocondrial	Barkman <i>et al.</i> , 2007
Lennoaceae	1 gen mitocondrial	Barkman <i>et al.</i> , 2007
Mitrastemonaceae	1 gen mitocondrial	Nickrent <i>et al.</i> , 2004
	2 genes mitocondriales	Barkman <i>et al.</i> , 2007
Orobanchaceae	1 gen mitocondrial	Mower <i>et al.</i> , 2004
	1 gen plastídico	Park <i>et al.</i> , 2007
	1 gen nuclear	Yoshida <i>et al.</i> , 2010
	1 gen plastídico	Li <i>et al.</i> , 2013
	1 gen nuclear	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	1 gen nuclear	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Rafflesiaceae	1 gen mitocondrial	Davis & Wurdack, 2004
	1 gen mitocondrial	Nickrent <i>et al.</i> , 2004
	1 gen mitocondrial	Barkman <i>et al.</i> , 2007
	47 genes nucleares	Xi <i>et al.</i> , 2012
	2 genes mitocondriales	
	11 genes mitocondriales	Xi <i>et al.</i> , 2013
	14 genes plastídicos	
15 genes plastídicos	Molina <i>et al.</i> , 2014	
Santalales	2 genes mitocondriales	Davis <i>et al.</i> , 2005
	1 gen mitocondrial	Barkman <i>et al.</i> , 2007

I.3.3) Mecanismos

Los mecanismos involucrados en la transferencia de ADN foráneo entre plantas no relacionadas pueden ser: vectores, como bacterias, virus, hongos e insectos succionadores de floema (Renner & Bellot, 2012) y distintos tipos de contactos célula a célula entre diferentes especies, lo cual incluye el parasitismo (Mower *et al.*, 2010), el epifitismo (Bock, 2009), los injertos naturales (Mower *et al.*, 2010) y la polinización ilegítima. En los casos donde existe contacto planta con planta, puede ocurrir la transferencia de mitocondrias enteras a través de plasmodesmos. Por último, existen motivos que explicarían parcialmente la alta frecuencia de la THG en las mitocondrias de plantas terrestres, y la

ausencia de la misma en plástidos: i) las mitocondrias de plantas son competentes en la transformación genética, mientras que no hay evidencia de tal circunstancia en plástidos; y ii) las mitocondrias de plantas generalmente se fusionan in vivo, mientras que los plástidos no lo hacen (Rice *et al.*, 2013).

I.4) Genomas citoplasmáticos de las plantas

I.4.1) Genoma mitocondrial de las plantas

Las mitocondrias de las plantas poseen su propio genoma que codifica un número limitado de proteínas. Éstas últimas son principalmente componentes de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna, así como también componentes de la maquinaria de transcripción y traducción necesaria para expresar los genes que las codifican (Brennicke & Leaver, 2007). De todos modos, la gran mayoría de los genes esenciales para la biogénesis y funcionalidad de la mitocondria son codificados por el núcleo. Para aquellos genes codificados en el genoma nuclear, la síntesis proteica ocurre en el citosol, y luego las proteínas son importadas hacia la mitocondria post-traduccionalmente. Por lo tanto, la biogénesis de la mitocondria requiere de la expresión coordinada de ambos genomas, nuclear y mitocondrial. Tal coordinación es posible gracias a numerosos factores proteicos codificados en el núcleo, los cuales son responsables de todas las etapas de la expresión génica en la organela (Brennicke & Leaver, 2007).

El genoma mitocondrial de las angiospermas se describe, en general, como una molécula única de ADN circular que alberga un juego completo de genes (Kubo & Newton, 2007). Los ADN mitocondriales (ADNmt) de las plantas presentan un gran tamaño el cual oscila entre 0.2 y 11.3 Mb en las angiospermas (Skippington *et al.*, 2015). Se ha inferido que los tamaños de estos genomas se han expandido desde que las plantas colonizaron la tierra (Kubo & Newton, 2007). La densidad genética es comparativamente baja en las mitocondrias de las plantas ya que las regiones codificantes constituyen sólo cerca del 10% del ADNmt total (aproximadamente 60 genes que codifican proteínas, ARN ribosomal y ARN de transferencia). Otro 10-20% de este genoma corresponde a intrones y secuencias importadas desde los genomas plastidial y nuclear. El porcentaje total de los intrones dentro del genoma corresponde al 4-13%. Todos los intrones en los genomas mitocondriales secuenciados se clasifican como intrones del grupo II; sin embargo, un intrón del grupo I transferido horizontalmente al gen *cox1* de las angiospermas ha sido documentado (Cho *et al.*, 1998; Kubo & Newton, 2007).

Además, los genomas mitocondriales de plantas poseen masivas regiones intergénicas, lo cual, como ya se dijo, permite que los genes foráneos sean insertados en las mismas sin perturbar la expresión de los genes nativos (Davis & Xi, 2015). Cerca del 70% del ADNmt comprende secuencias aparentemente no funcionales, con contenido informacional no discernible. Y el 10% restante son largas secuencias repetidas, las cuales, por frecuentes recombinaciones, dan forma a la organización física del ADNmt (Brennicke & Leaver, 2007). Además de estas secuencias largas, también se pueden encontrar secuencias repetidas cortas. La diferencia entre las repeticiones largas y las cortas es, no solamente la longitud, sino también la actividad de recombinación: mientras que las repeticiones largas parecen recombinarse activamente y con frecuencia, las repeticiones cortas en cambio, son usualmente inactivas, pero podrían igualmente jugar un rol central en la evolución de los genomas mitocondriales de angiospermas (Kubo & Newton, 2007).

Las mitocondrias de numerosas especies de plantas han adquirido uno a varios tipos de plásmidos extracromosomales o replicones de ADN o ARN, de tamaños que van desde 0.7 kb a 20 kb. En las especies de plantas estudiadas hasta ahora, estos plásmidos de ADN mitocondrial son específicos de cada especie, o bien, se hallan como grupos específicos de moléculas de ADN lineal y circular. Éstos tienen funciones esencialmente desconocidas, y se replican independientemente del ADN mitocondrial principal. La mayoría de estos plásmidos mitocondriales no tienen homología con las secuencias del genoma mitocondrial principal. El origen de los mismos es desconocido, y se propone que estos plásmidos han sido introducidos en células de plantas superiores por simbiontes o patógenos. Todo esto sugiere que las mitocondrias de las plantas poseen una elevada capacidad para capturar e integrar secuencias foráneas (Koulintchenko *et al.*, 2003).

Además, como ya se mencionó anteriormente, existe evidencia de frecuentes fusiones entre mitocondrias en plantas superiores, que luego se fisianan y el ADN mitocondrial es desigualmente distribuido durante la división celular mitocondrial (Arimura *et al.*, 2004). Inclusive, se han descrito mitocondrias sin genoma mitocondrial (Sheahan *et al.*, 2005).

A lo largo de la evolución, genes codificados en el genoma mitocondrial fueron transferidos al núcleo y eliminados de la mitocondria. Inclusive hoy, genes mitocondriales aún continúan migrando hacia el núcleo en algunas especies de plantas superiores, por lo cual, el contenido génico del genoma mitocondrial puede diferir entre las plantas. Estos genes incluyen aquellos que codifican proteínas ribosomales y polipéptidos involucrados en la biosíntesis del citocromo c. Igualmente, los genes que codifican componentes de la cadena transportadora de electrones han migrado también hacia el núcleo (Brennicke & Leaver, 2007). Por tanto, cuando el contenido de genes que codifican proteínas ribosomales se compara entre las angiospermas, es posible saber con qué frecuencia los genes se han perdido del genoma mitocondrial durante la evolución (Kubo & Newton, 2007). Por el contrario, el ADNmt de los Metazoa se ha estabilizado y la mayoría posee el mismo contenido génico (alrededor de 13 genes que codifican proteínas, 3 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia).

La tasa de sustitución en genes mitocondriales de las angiospermas es, en general, muy baja; aproximadamente 3-4 veces más baja que en genes cloroplásticos y 12 veces menor que en genes nucleares (Palmer & Herbon, 1988). Por esto, es muy común para determinar las afinidades filogenéticas de familias de angiospermas parásitas emplear secuencias del ADNmt (Nickrent, 2002b; Nickrent *et al.*, 2005; Barkman *et al.*, 2007).

I.4.2) Genoma cloroplástico de las plantas

Los genomas plásticos (ADNpt) de todos los linajes de plantas contienen la información genética en moléculas circulares, así como también en una variedad de monómeros lineales y ramificados (Krause, 2012). Tanto el orden génico como la capacidad de codificación en los plástidos se han mantenido altamente conservados en las plantas superiores. Los ADNpt muestran muy poca variación en su contenido y tamaño genómico. La presión selectiva para el mantenimiento de los genes relacionados con la fotosíntesis parece ser fundamental para conservar el genoma plástico. La falta de presión de selección por mantener la fotosíntesis en las plantas parásitas, permitió a los genomas plásticos de las mismas una peculiar evolución (Krause, 2012).

A pesar de que las plantas hemiparásitas aún llevan a cabo la fotosíntesis hasta cierto punto, las holoparásitas, como ya se mencionó, dependen completamente del

hospedador para producir carbohidratos. Por lo tanto, en estas últimas, los genes relacionados con la fotosíntesis no son requeridos, y por ello, pueden volverse pseudogenes y ser eliminados, resultando en una reducción física y funcional del genoma plastídico (Krause, 2008). Por tanto se puede inferir que, una de las consecuencias de la transición hacia la heterotrofía es la disminución en la presión evolutiva para conservar los procesos fotosintéticos, que resulta en pérdidas de genes cloroplastídicos y en una producción primaria reducida (Krause, 2008).

Hasta el momento se han estudiado 26 linajes tanto de plantas holoparásitas como de micoheterótrofas, para verificar los genes cloroplastídicos que persisten en estas plantas no fotosintéticas. La comparación de estos 26 genomas cloroplastidiales muestra que 23 de ellos retienen un mínimo juego de 17 genes del total de 116 genes plastídicos que existen normalmente en las plantas (Bellot & Renner, 2015). La excepción a esto la presentan tres endoparásitas: *Pilostyles aethiopica* y *Pilostyles hamiltonii* (Apodanthaceae) que contienen sólo cinco genes posiblemente funcionales y de dos a tres pseudogenes (Bellot & Renner, 2015); y *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae), en la cual no se han identificado secuencias plastídicas, lo que sugiere una pérdida total del genoma cloroplastídico en esta especie (Molina *et al.*, 2014).

I.4.3) Sitios de edición del ARN

La edición del ARN en las mitocondrias y plástidos de las plantas con flor convierten algunos nucleótidos citosina (C) en uracilo (U) en los ARNm y en los ARN de transferencia (ARNt). La mayoría de los sitios de edición del ARN se encuentran en los genes codificadores de proteínas, y muy pocos en los ARNt, en las regiones UTR (untranslated regions, regiones de los transcriptos que no se traducen) y en intrones (Brennicke & Leaver, 2007; Kubo & Newton, 2007). La mayoría de los eventos de edición del ARN ocurre en la primera o en la segunda posición de los codones, por lo cual generalmente se altera el aminoácido (Takenaka *et al.*, 2013). El número de sitios de edición en los genomas mitocondriales de las angiospermas es variable, entre 357 en la remolacha azucarera y más de 700 en *Liriodendron tulipifera*. Análisis comparativos revelan que existe un número de sitios de edición específico para cada especie (Kubo & Newton, 2007; Richardson *et al.*, 2013).

Estas alteraciones en el ARN explican la existencia de muchos codones no conservados en los genes mitocondriales de las plantas. Por ejemplo, muchos codones CGG que codifican el aminoácido Arginina se encuentran en posiciones donde, en lugar de este último, el aminoácido Triptófano es el que está conservado. Este aminoácido se establece como consecuencia de la edición del ARN que condujo al codón UGG, y probablemente, esta edición da como resultado una proteína funcional (Brennicke & Leaver, 2007).

Mientras que en las mitocondrias se encuentran varios cientos de modificaciones, en los plástidos se observan sólo cerca de 35-40 eventos de edición del ARN (Brennicke & Leaver, 2007).

I.5) Objetivos

I.5.1) General

Comprender la evolución molecular del genoma mitocondrial de angiospermas parásitas y la incidencia de la transferencia horizontal en la historia evolutiva de las mismas.

I.5.2) Específicos

- Determinar relaciones filogenéticas del género *Lophophytum* y de la familia Balanophoraceae.
- Amplificar, secuenciar y analizar genes mitocondriales de *Lophophytum spp.* y de sus hospedadores leguminosas *Anadenanthera colubrina* y *Parapiptadenia rigida* para estudiar su evolución.
- Evaluar la incidencia, dirección y datación de la transferencia horizontal de genes mitocondriales entre plantas parásitas del género *Lophophytum* y sus plantas hospedadoras.

I.6) Hipótesis

- Análisis comparativos de marcadores moleculares citoplasmáticos y nucleares permiten conocer las relaciones filogenéticas de la familia Balanophoraceae y del género *Lophophytum*.
- El género *Lophophytum* forma un grupo monofilético junto con los otros géneros de Balanophoraceae y están relacionados con el orden Santalales.
- Existe una alta frecuencia de transferencia horizontal de genes mitocondriales en las plantas holoparásitas del género *Lophophytum* adquiridos de sus hospedadores en eventos relativamente recientes.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

II.1) Recolección del material

Las muestras de las plantas en estudio fueron recolectadas por el Dr. Héctor Sato (Universidad Nacional de Jujuy). La holoparásita *Lophophytum leandri* y su hospedadora *Parapiptadenia rigida* fueron recolectadas el día 24/07/13 en 27° 16' 5'' S 55° 31' 4,2'' O, San Ignacio, provincia de Misiones (Argentina). *Lophophytum mirabile* y su hospedadora *Anadenanthera colubrina* fueron recolectadas el 14/01/13 en 23° 55' 34,9'' S 64° 55' 58,5'' O, Parque Nacional Calilegua en la provincia de Jujuy (Argentina).

Las muestras de las holoparásitas (túberes e inflorescencias) fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas en el freezer a -80°C en el laboratorio. Hojas de las hospedadoras fueron deshidratadas en sílica gel. Se analizaron muestras de dos individuos por especie.

II.2) Extracción de ADN y gel de visualización

Se realizó la extracción de ADN a partir del tejido de las muestras recolectadas. La extracción y purificación se efectuó de acuerdo a un protocolo de extracción de ADN del kit comercial DNeasy Plant Mini de QIAGEN.

Posteriormente, para visualizar el resultado de las extracciones de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra (glicerol al 30% y azul de bromofenol) y se realizó la corrida electroforética a 90 voltios durante 45 minutos utilizando buffer TBE 0,5X. Se sembraron 2 µl de muestra con 1 µl de buffer de siembra. Se sembró además un marcador de peso molecular (1kb DNA ladder New England Biolabs) para estimar el tamaño del ADN. El gel fue teñido con Bromuro de etidio (en una concentración de 100 mg/L). Las muestras obtenidas fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz UV con un fotodocumentador Ugenius (Syngene).

II.3) Amplificación de genes mitocondriales, cloroplastídicos y nucleares

Se procedió a la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la ADN polimerasa) convencional en un termociclador Biometra usando las especificaciones y condiciones detalladas en las tablas 2 y 3. La Tabla 2 muestra la composición de la solución para las distintas PCR; y la Tabla 3 muestra la secuencia de pasos de la amplificación por PCR.

Tabla 2: Composición de la mezcla de reacción para las distintas PCR ensayadas.

Componentes	Volumen	Concentración final
10X PCR buffer sin Mg	2 µL	1X
10 mM dNTP (incluye dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	2 µL	0,2 mM
50 mM MgCl₂	0,6 µL	1,5 mM
10 µM forward primer	1 µL	0,5 µM
10 µM reverse primer	1 µL	0,5 µM
5 U/µL Taq ADN polimerasa (INVITROGEN)	0,2 µL	1 U
Molde (ADN)	1-3 µL	
H₂O mili-Q	Hasta completar 20 µL	

Tabla 3: Detalle de las amplificaciones por PCR.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1) Desnaturalización inicial	95.0	02:00
2) Desnaturalización	94.0	00:40
3) Hibridación	52.0	00:45
4) Extensión	72.0	01:30
Vuelve al paso 2 hasta completar 36 ciclos		
5) Extensión	72.0	07:00
6) Conservación	16.0	Pausa

Para aquellas amplificaciones que no dieron resultados positivos, se añadió 0,5 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) en la solución de PCR. Este compuesto es un agente optimizador de PCR que actúa facilitando la separación de las hebras de ADN, con lo cual mejora el proceso de amplificación (Frackman *et al.*, 1998).

En el caso de las amplificaciones de los hospedadores leguminosas, se añadió PVP (polivinil-pirrolidona) en una concentración de 2g/100 ml. La razón de este recurso es que los polisacáridos, metabolitos secundarios y polifenoles se encuentran en altas concentraciones en algunos linajes de plantas superiores, como por ejemplo en las leguminosas. Dichos compuestos son propensos a formar complejos con los ácidos nucleicos de los tejidos, lo que resulta en la inhibición de las manipulaciones moleculares. Para evitar estas inhibiciones, se adiciona PVP en la preparación de las PCR (Koonjul *et al.*, 1998).

Se realizaron amplificaciones de seis genes mitocondriales: *ccmC*, *rpl5*, *cox1*, *atp1*, *atp8* y *cob*, un gen nuclear: ADNr *18S* y un gen cloroplastídico: *rbcL* a partir de ADN genómico de la holoparásita *Lophophytum leandri* y de las hospedadoras leguminosas

Parapiptadenia rigida y *Anadenanthera colubrina*. Para ello, se utilizaron “primers” universales ya que estos genes son altamente conservados en todas las angiospermas. La Tabla 4 presenta las secuencias de los primers utilizados para amplificar los diversos genes.

Tabla 4: Secuencias de los primers utilizados para las amplificaciones.

Gen	Origen	Secuencia de los primers (5´-3´)		Tamaño esperado del amplicón (pb)
		Forward	Reverse	
18S ADNr	Nuclear	Nickrent 1994 18S-366F: GTCTGCCCTATCAACT	1137: GTGCCCTTCCGTC AAT	800
rbcL	Cloroplastídico	rbcL-50F: CTTCTACTGGTACATGGAC	rbcL-835R: CGTGAATATGATCTCCACC	800
atp1	Mitocondrial	atp1-F2: ATCGGTCGAGTGGTCTCAGTTG	atp1-R: GTGGCATTTCGATCACAGAATC	1300
atp8		atp8-F: ATGCCTCAACTKGATMAATTBAC	atp8-R: AACATGKRTKAGCATTATKTY	500
cox1		cox1-1: AYGAMAAATCYGGTYGATGG	cox1-4: ACCGRATCCAGGCAGAATGRG	1700 (con intrón) 700 (sin intrón)
		cox1-3: CATCTCTTTYTGTTCTTCGGT	cox1-6: AGCTGGAAGTTCTCCAAAAGT	1800 (con intrón) 800 (sin intrón)
	IP53: ATGCCATGTCAGGCCGCAC	IP56: GAGCAATGTCTAGCCC	1800 (con intrón) 800 (sin intrón)	
cob		cob-F: CCGAGCAATCTTAGTTATTGG	cob-R: AATTCCTCTTCCAACCTCGTCC	1100
ccmC		ccmC-F: TTCTCATTGGATCTYGGTTGT	ccmC-R: TCCTTCTCGAGCTTCWATTTC	600
rpl5		rpl5-F: CGAAGATGTATCACGTCAGG	rpl5-R: GGTGGTAAAGTCTCATCTTG	500

Las secuencias de ADN de la planta holoparásita *Lophophytum mirabile* se obtuvieron de la secuenciación completa y ensamble del genoma de la misma con el secuenciador Illumina (Illumina HiSeq) a partir del ADN total de la planta. Esto último proviene de un trabajo de investigación de la Dra. María Virginia Sánchez Puerta. Asimismo, las secuencias de los genes *cox1* y *cob* de *Parapiptadenia rigida* fueron obtenidas previamente en el laboratorio.

II.4) Electroforesis

Para analizar los productos de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se sembraron 5 µl de muestra con 1 µl de buffer de siembra y se realizó la corrida electroforética a 90 voltios durante 45 minutos utilizando buffer TBE 0,5X. Se sembró además un marcador de peso molecular (1kb DNA ladder New England Biolabs) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados. El gel fue teñido con Bromuro de etidio

(en una concentración de 100mg/L). Las muestras obtenidas fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz UV con un fotodocumentador Ugenius (Syngene).

II.5) Purificación de productos de PCR

Previo a la secuenciación es conveniente purificar los productos amplificados para liberarlos de restos de primers, dNTPs, enzimas y demás compuestos utilizados durante la PCR.

Los productos de la PCR fueron purificados usando dos procedimientos diferentes, en distintas muestras: PEG (Green & Sambrook, 2012) y ExoSAP-IT (Affymetrix USB).

II.6) Secuenciación

Los genes fueron secuenciados mediante secuenciación automática (“Sanger sequencing”) usando el analizador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems 3700). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa Sequencher 4.7 (GenCodes).

II.7) Southern Blot

Se realizaron ensayos de Southern Blot, utilizando el DIG Application Manual for Filter Hybridization, de los genes mitocondriales *atp1* y *cob* de las plantas parásitas *L. leandri* y *L. mirabile* para identificar el número de copias de los mismos. Las sondas fueron marcadas con Digoxigenina (DIG) mediante la técnica de PCR (Roche) a partir de ADN de *Nicotiana tabacum* y utilizando los primers descritos anteriormente (Tabla 4). La señal fue detectada con CDP-star (Roche).

II.8) Alineamientos

Para realizar estudios comparativos y análisis evolutivos significativos fue necesario realizar una búsqueda de secuencias homólogas en otras angiospermas además de las especies bajo estudio. El BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fue utilizado como herramienta de comparación y búsqueda de secuencias de otras angiospermas, confrontando las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos públicas de secuencias de nucleótidos (GenBank de NCBI).

Para cada gen se realizó un alineamiento múltiple, incluyendo las nuevas secuencias obtenidas y secuencias homólogas de angiospermas provenientes de la base de datos GenBank (NCBI). Para ello, se utilizó el programa MacClade 4 (Version 4.07) que permite alineación automática y manual de nucleótidos o aminoácidos, al igual que el programa MEGA 6.06 el cual también posibilita la alineación de nucleótidos o aminoácidos. Para el gen *cox1* se realizaron alineamientos separados: por un lado las secuencias correspondientes a los exones, y por otro lado las del intrón, ya que sus historias evolutivas son dispares (Adams *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1998; Cho & Palmer, 1999; Sánchez-Puerta *et al.*, 2008; Sánchez Puerta *et al.*, 2011).

La predicción de los sitios de edición de los genes mitocondriales se realizó con el programa PREP-Mt (Mower, 2009). Luego se procedió a la eliminación de los sitios de edición del alineamiento debido a que presentan elevada homoplasia que puede generar

errores en la estimación de las relaciones filogenéticas. Mientras más sitios de edición existan, mayores son las chances de que las señales homoplásicas oscurezcan la verdadera filogenia. Una aproximación a esta última se logra eliminando los sitios de edición (Bowe & dePamphilis, 1996).

II.9) Árboles filogenéticos

La reconstrucción de la historia evolutiva de los genes se realizó mediante análisis de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) y Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony, MP) para cada alineamiento. El método de MP se basa en el principio que afirma que, entre todos los árboles filogenéticos posibles para un grupo de taxa, la mejor estimación de la verdadera filogenia es la que postula el menor número de cambios evolutivos. Por lo tanto, tal árbol presentaría también el menor número de homoplasias (Futuyma, 2013). El programa de computación que se empleó para este método fue PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony). El criterio de optimalidad ML selecciona el mejor árbol en cuanto posea el mayor valor de verosimilitud o likelihood. Es decir, la historia evolutiva más probable de acuerdo a los datos de secuencias de las especies actuales. Además, ML difiere de MP en que la longitud de las ramas estimadas para los árboles de ML son mucho más precisas que las encontradas en los árboles de MP, debido a un mejor cálculo de las sustituciones múltiples (Futuyma, 2013). Este último método es desarrollado por el programa GARLI (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference), el cual también se empleó en este trabajo.

Para evaluar estadísticamente los árboles filogenéticos, se realizaron 100 réplicas de bootstrap (BS) para establecer el soporte de las ramas y obtener un árbol consenso. Los valores del análisis de “bootstrapping” fueron transferidos al mejor árbol obtenido para identificar los nodos más fuertemente soportados (BS>50%) de cada filogenia. Los valores de bootstrap menores a 50% no fueron incluidos en los árboles para mayor claridad.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

III.1) Extracción de ADN

La extracción de ADN de la planta parásita *Lophophytum leandri* utilizando un kit comercial dio buen resultado, obteniendo ADN de alto peso molecular (peso molecular estimado $\gg 10$ kb). El mismo fue sembrado en cuatro carriles, dos de los cuales (carriles 1 y 4) presentaron bandas tenues pero distinguibles, y uno de los cuales (carril 2) presentó una banda bien perceptible. No se observó ninguna banda en el carril 3 (Figura 3). El ADN genómico obtenido de hojas de las hospedadoras leguminosas *Anadenanthera colubrina* y *Parapiptadenia rigida* se observó parcialmente degradado y en menor cantidad (peso molecular estimado > 2 kb). Sin embargo, este ADN resultó igualmente útil para las posteriores amplificaciones. Para *A. colubrina* podemos observar una banda muy tenue en el carril 1, y ninguna banda en el carril 2; y para *P. rigida*, se obtuvo una banda tenue de ADN degradado (carril 1) y ninguna banda en el segundo carril (Figura 3).

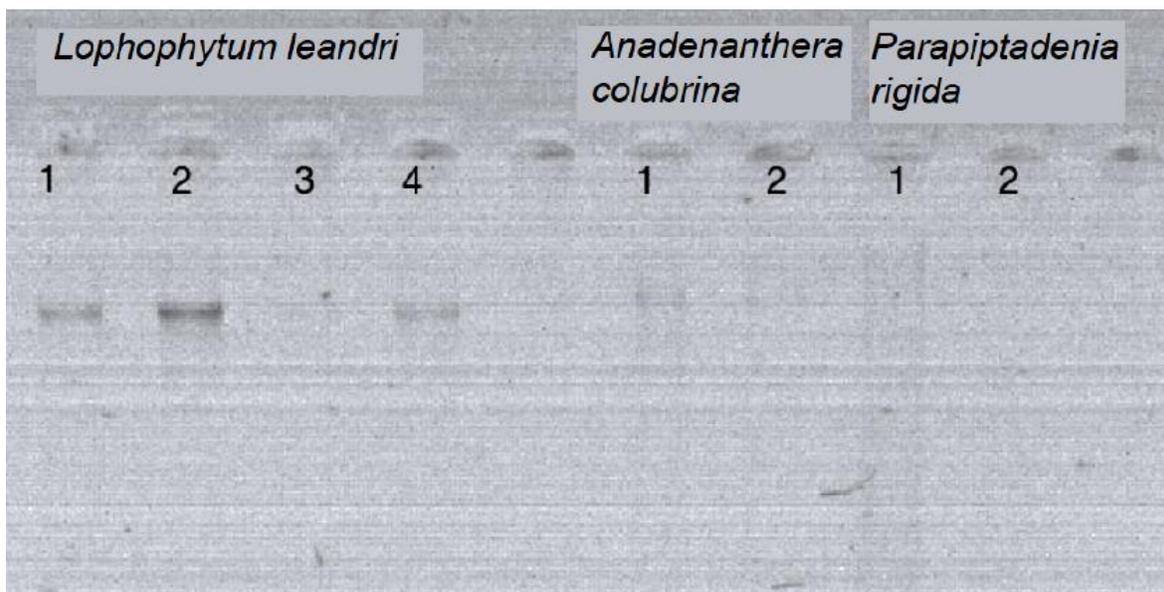


Figura 3) Gel de visualización de extracción de ADN con DNeasy Plant Mini kit de QIAGEN.

III.2) Amplificación por PCR de genes mitocondriales, cloroplastídicos y nucleares

Se amplificaron por PCR seis genes mitocondriales de la planta holoparásita *L. leandri* y de las plantas hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida*. Los genes mitocondriales *cox1*, *cob*, *atp1*, *atp8*, *ccmC* y *rpl5* codifican para diversas proteínas involucradas en la respiración. El gen *cox1* codifica la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa; *cob*, al citocromo b; *atp1* y *atp8* codifican dos subunidades del complejo ATP sintasa: el núcleo catalítico F(1) y el factor de acoplamiento F(0), respectivamente; el gen *ccmC* codifica una proteína encargada de la biosíntesis del citocromo c; y *rpl5* codifica una proteína de la subunidad mayor de los ribosomas de la mitocondria.

Además, se amplificaron los genes *rbcL* y ADNr *18S*. El gen *rbcL* es un gen cloroplastídico que codifica para la subunidad mayor de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxidasa (RuBisCO), mientras que la subunidad pequeña de la RuBisCO es codificada por un gen nuclear (*rbcS*). El gen ADNr *18S* es un componente de la subunidad menor del ribosoma de los eucariotas.

Se realizaron 254 ensayos de amplificación por PCR en total (95 para *A. colubrina*, 65 para *P. rigida* y 94 para *L. leandri*). El porcentaje de éxito en las amplificaciones fue del 58% para *A. colubrina*, 40% para *P. rigida* y 52% para *L. leandri*. La tabla 5 muestra los detalles de las cantidades de ensayos de PCR realizados para cada gen por cada especie y el porcentaje de éxito de los mismos.

Tabla 5) Detalle de los ensayos de amplificación por PCR.

Gen	Origen	Ensayos	Especies		
			<i>A. colubrina</i>	<i>P. rigida</i>	<i>L. leandri</i>
ADNr 18S	Nuclear	Cant. ensayos	4	2	4
		Ensayos positivos	0	0	2
		Éxito	0%	0%	50%
<i>rbcL</i>	Cloroplastídico	Cant. ensayos	7	2	4
		Ensayos positivos	6	2	0
		Éxito	86%	100%	0%
<i>atp1</i>		Cant. ensayos	22	17	12
		Ensayos positivos	15	5	6
		Éxito	68%	29%	50%
<i>atp8</i>		Cant. ensayos	13	17	7
		Ensayos positivos	2	1	4
		Éxito	15%	6%	57%
<i>cox1</i>	Mitocondrial	Cant. ensayos	18	-	27
		Ensayos positivos	13	-	10
		Éxito	72%	-	37%
<i>cob</i>		Cant. ensayos	5	-	10
		Ensayos positivos	3	-	5
		Éxito	60%	-	50%
<i>ccmC</i>		Cant. ensayos	13	14	15
		Ensayos positivos	9	10	11
		Éxito	69%	71%	73%
<i>rpl5</i>		Cant. ensayos	13	13	15
		Ensayos positivos	7	8	11
		Éxito	54%	61%	73%

III.3) Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos incluyen 27 secuencias de ADN generadas en este trabajo, pertenecientes a las dos especies parásitas y las dos hospedadoras analizadas en el mismo. Estas secuencias incluyen 4 de *atp1*, 2 de *atp8*, 4 de *cob*, 4 de los exones de *cox1*, 2 del intrón de *cox1*, 4 de *ccmC*, 4 de *rpl5*, 1 de *rbcL* y 2 de ADNr *18S*.

Se obtuvieron 9 árboles filogenéticos por análisis de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) y 9 árboles por Máxima Parsimonia (MP) basados en los alineamientos de cada gen con los correspondientes soportes estadísticos de bootstrapping (Figuras 4-21).

III.3.1) Análisis del gen nuclear ADNr *18S*

En las figuras 4 y 5 podemos observar árboles filogenéticos del gen ADNr *18S* que incluyen una gran diversidad de angiospermas. En los mismos se observan, por un lado, relaciones evolutivas con elevado apoyo estadístico que incluyen a las afiliaciones ya conocidas entre las plantas; y por otro lado, relaciones filogenéticas con bajo apoyo estadístico que incluyen algunas relaciones inesperadas, como por ejemplo (en el análisis de ML, Figura 4) el grupo monofilético de las Saxifragales (integrado por *Paeonia* y *Mitella*) es hermano de *Canella* (Canellales), y (en el análisis de MP, Figura 5) *Polygala* y *Securidaca* están alejadas filogenéticamente siendo que pertenecen a la misma familia (Polygalaceae). Sin embargo, las relaciones con bajo soporte estadístico no se tienen en cuenta al analizar la filogenia debido a que no son significativas.

Seis especies de la familia Balanophoraceae pertenecientes a los géneros *Lophophytum*, *Scybalium*, *Ombrophytum*, *Helosis* y *Corynaea* se encontraron formando un grupo monofilético con alto soporte de bootstrap, 96% para el análisis de ML (Figura 4) y 100% para MP (Figura 5). Dentro de este grupo (sólo para el análisis de ML) se observa a *Ombrophytum* como hermano de *Lophophytum*, con BS= 76%. Dicho grupo no presenta relaciones filogenéticas claras con el resto de las angiospermas ya que, los otros grupos monofiléticos en los que está integrado con ancestros comunes más lejanos, no tienen soporte estadístico significativo (BS<50%). Por otro lado, se encontró un grupo con bajo soporte estadístico integrado por especies pertenecientes a 8 familias del orden Santalales, (Loranthaceae, Opiliaceae, Misodendraceae, Thesiaceae, Nanodeaceae, Santalaceae, Cervantesiaceae y Amphorogynaceae) y tres especies de la familia Balanophoraceae (*Mystropetalon*, *Dactylanthus* y *Hachettea*).

III.3.2) Análisis del gen cloroplastídico *rbcL*

Los árboles filogenéticos basados en *rbcL* encuentran, en general, las relaciones evolutivas esperadas que existen entre las angiospermas (Figuras 6 y 7). Por ejemplo, se observan en ambos árboles grupos monofiléticos integrados por las angiospermas basales (BS=97% en ML y BS=90% en MP), por las Caryophyllales (BS=100% tanto en ML como en MP), por las monocotiledóneas (BS=100% en ambos análisis), y por las rósidas (BS=86% en ML y 63% en MP).

El gen cloroplastídico *rbcL* no se logró amplificar en *L. leandri* y tampoco se encontró la secuencia del mismo en el proyecto de secuenciación masiva en *L. mirabile*. Por otro lado, si bien se logró amplificar por PCR este gen en *Anadenanthera colubrina*, no se logró la secuenciación del mismo, por lo cual se incluyó la secuencia del gen *rbcL* de

Anadenanthera peregrina obtenida de la base de datos de GenBank. Las secuencias de *rbcL* de *Parapiptadenia rigida* y *Anadenanthera peregrina* forman un grupo monofilético con los miembros de la subfamilia Mimosoideae con valores de bootstrap de 91% para el análisis de ML (Figura 6) y 96% para MP (Figura 7). A su vez, los miembros de esta subfamilia se encuentran dentro de las Fabaceae (Leguminosas) con soporte estadístico del 95% para ML y 79% para MP. Las Santalales forman un grupo monofilético separado de las Fabaceae (bootstrap 75% para ML y 59% en MP).

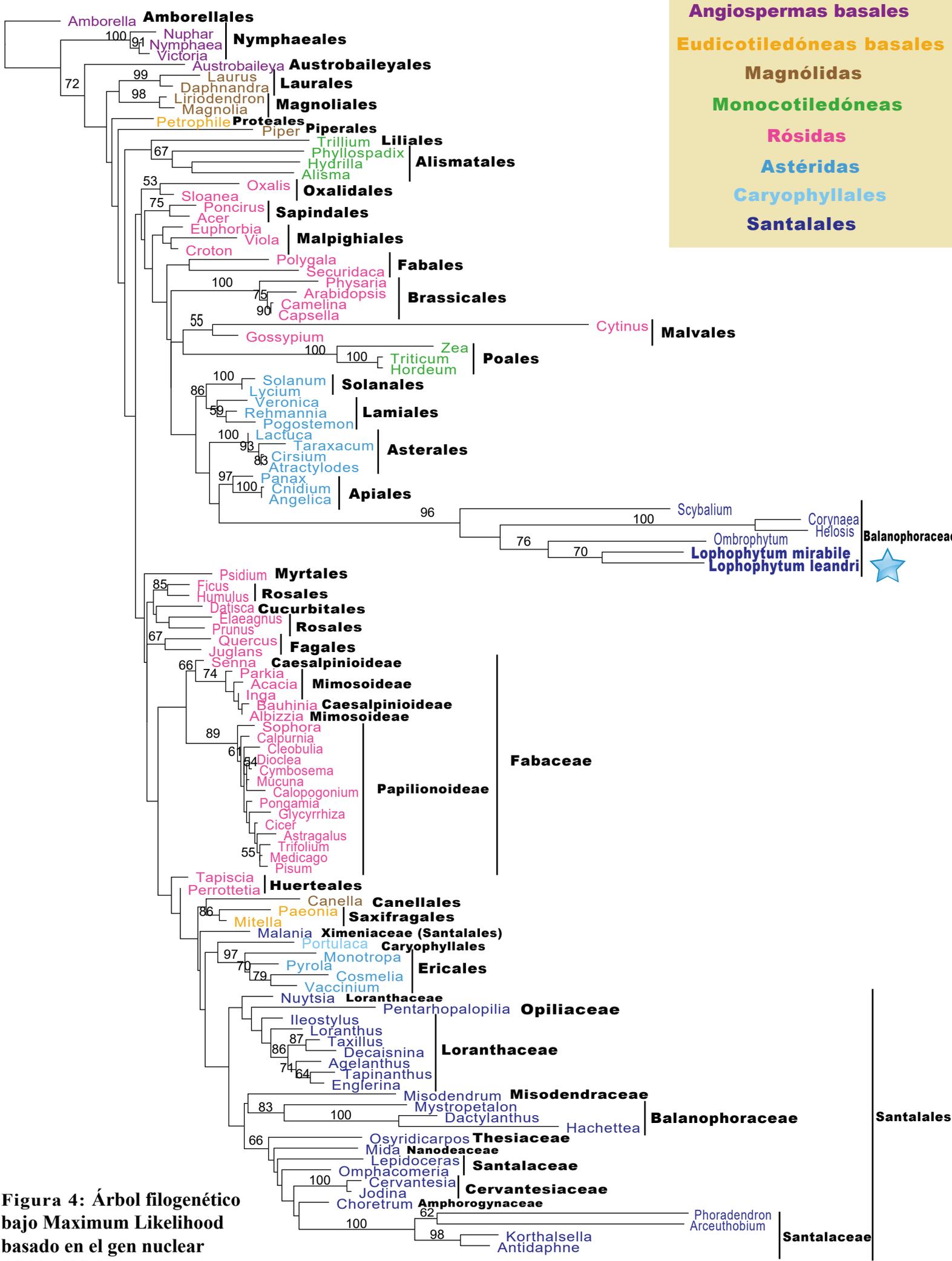
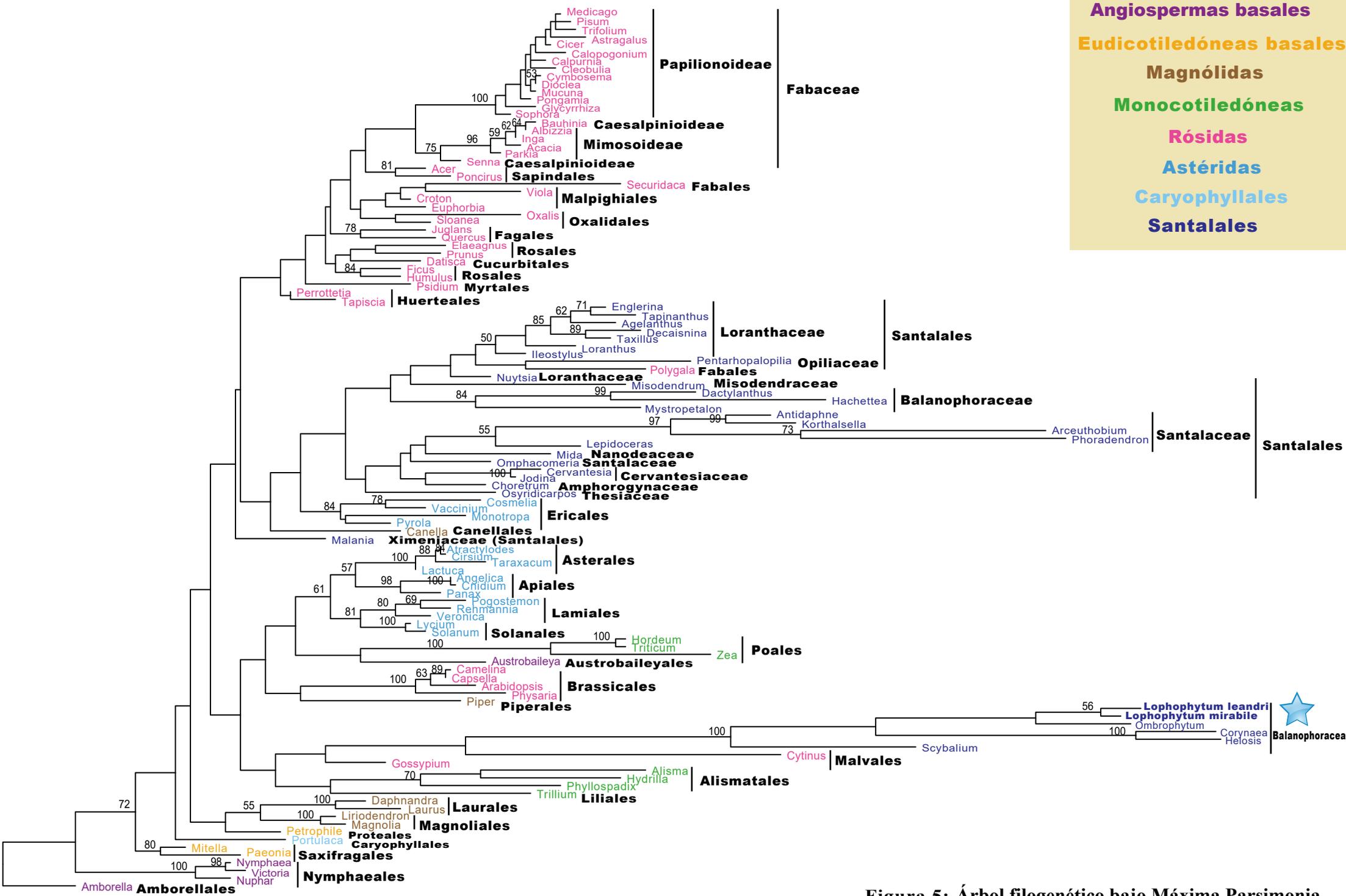


Figura 4: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen nuclear ADNr 18S. La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio.

0.03 sustituciones por sitio

Angiospermas basales
Eudicotiledóneas basales
Magnólicas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Caryophyllales
Santalales



30.0 sustituciones

Figura 5: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen nuclear ADNr 18S. La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio.

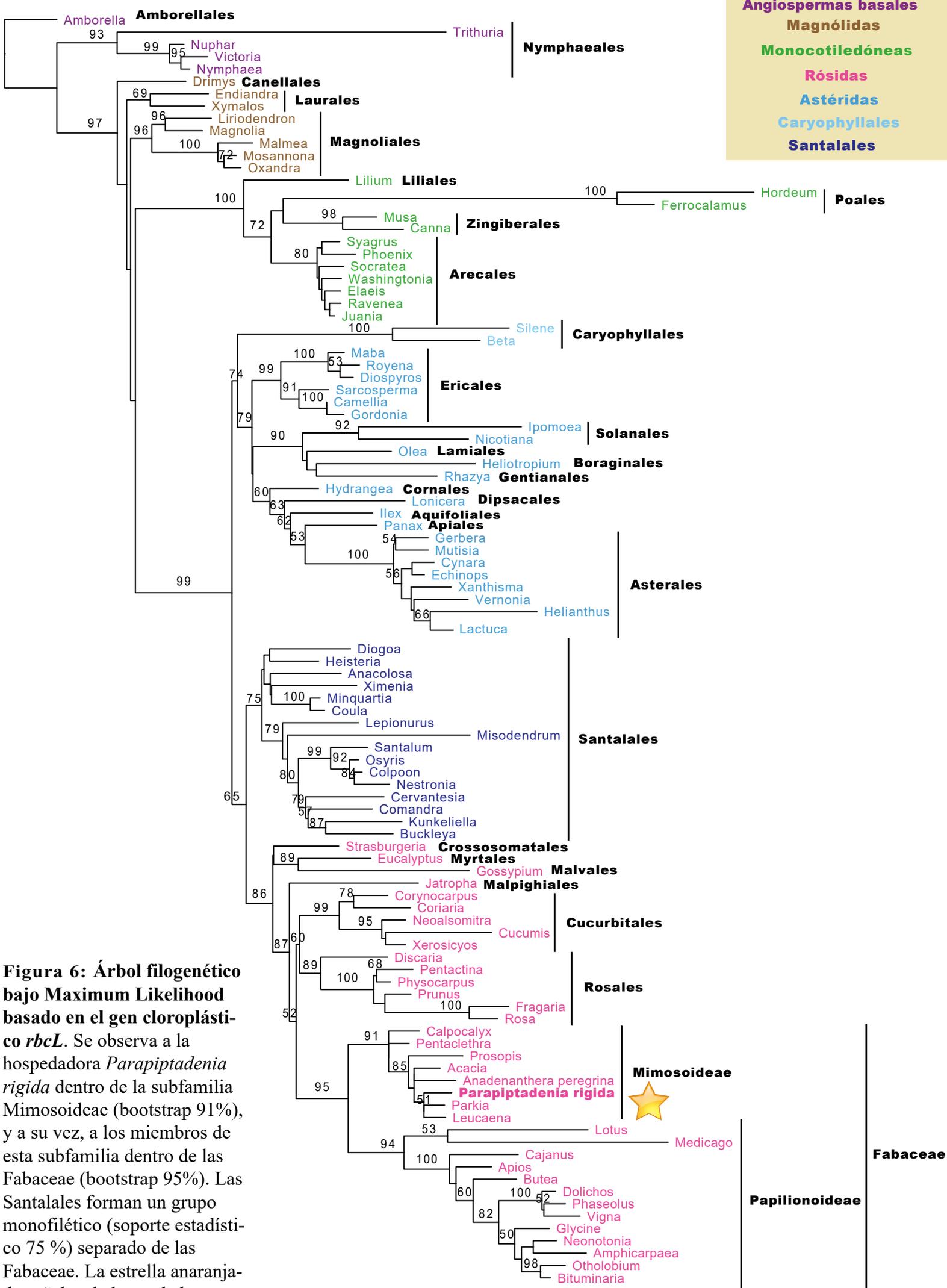
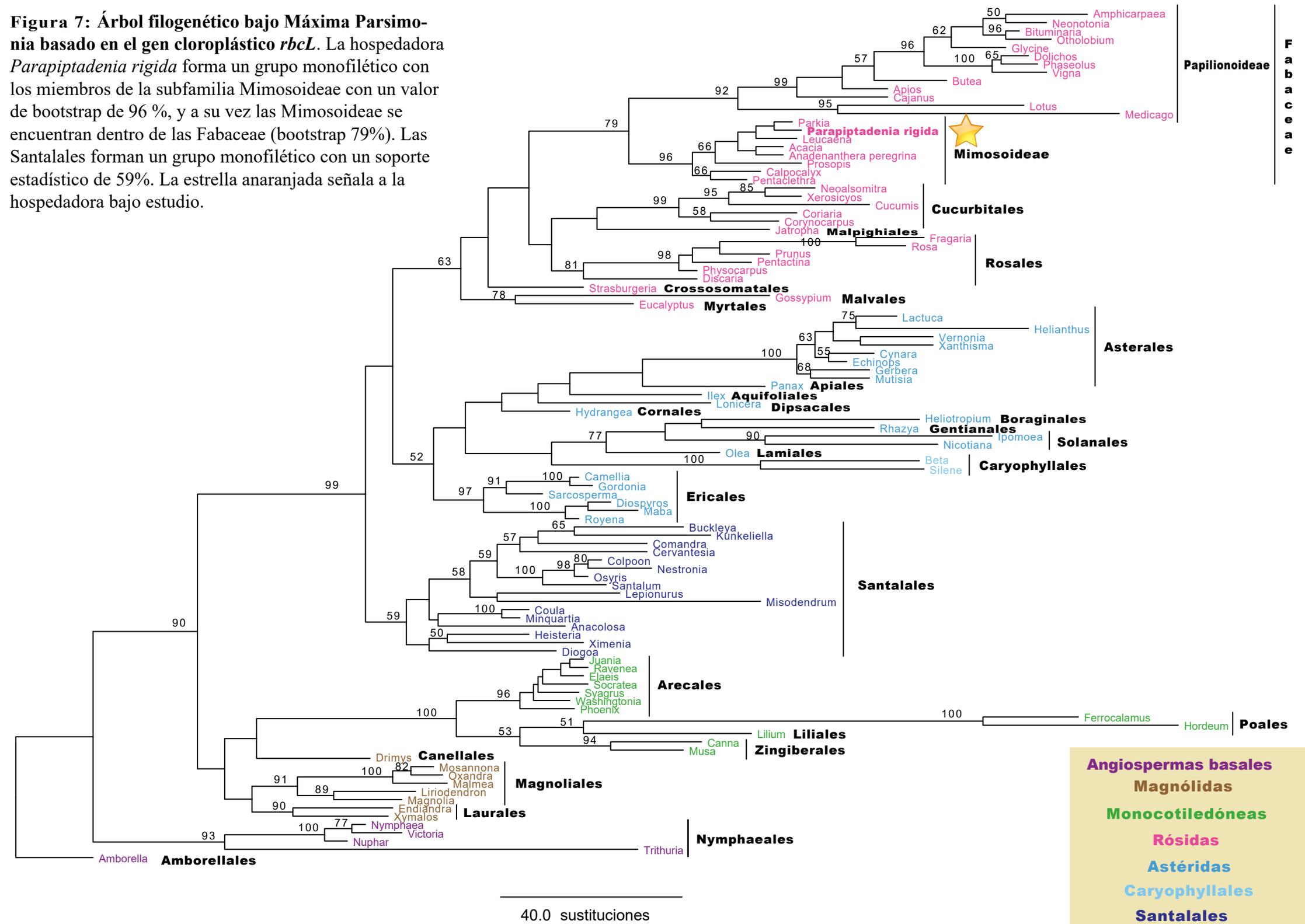


Figura 6: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen cloroplástico *rbcL*. Se observa a la hospedadora *Parapiptadenia rigida* dentro de la subfamilia Mimosoideae (bootstrap 91%), y a su vez, a los miembros de esta subfamilia dentro de las Fabaceae (bootstrap 95%). Las Santales forman un grupo monofilético (soporte estadístico 75 %) separado de las Fabaceae. La estrella anaranjada señala a la hospedadora bajo estudio.

0.04 sustituciones por sitio

Figura 7: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen cloroplástico *rbcL*. La hospedadora *Parapiptadenia rigida* forma un grupo monofilético con los miembros de la subfamilia Mimosoideae con un valor de bootstrap de 96 %, y a su vez las Mimosoideae se encuentran dentro de las Fabaceae (bootstrap 79%). Las Santalales forman un grupo monofilético con un soporte estadístico de 59%. La estrella anaranjada señala a la hospedadora bajo estudio.



III.3.3) Análisis evolutivos de genes mitocondriales

En la filogenia del gen *atp1* (Figuras 8 y 9) las plantas parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* (familia Balanophoraceae) se encuentran en un grupo monofilético y son hermanas de las especies de la subfamilia Mimosoideae, que incluye sus plantas hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida*. En este caso los soportes estadísticos corresponden al 69% para ML (Figura 8) y 62% para MP (Figura 9). A su vez, este grupo es hermano del grupo monofilético (BS=83% para ML y 80% para MP) que constituye la subfamilia Papilionoideae. Sin embargo, esta relación de hermandad entre las dos subfamilias tiene valores bajos de bootstrap (BS<50%). Es importante destacar que las especies del género *Lophophytum* no agrupan con otras especies de la familia Balanophoraceae (*Ombrophytum*) ni del orden Santalales (*Dendrophthoe*, *Buckleya* y *Nestronia*).

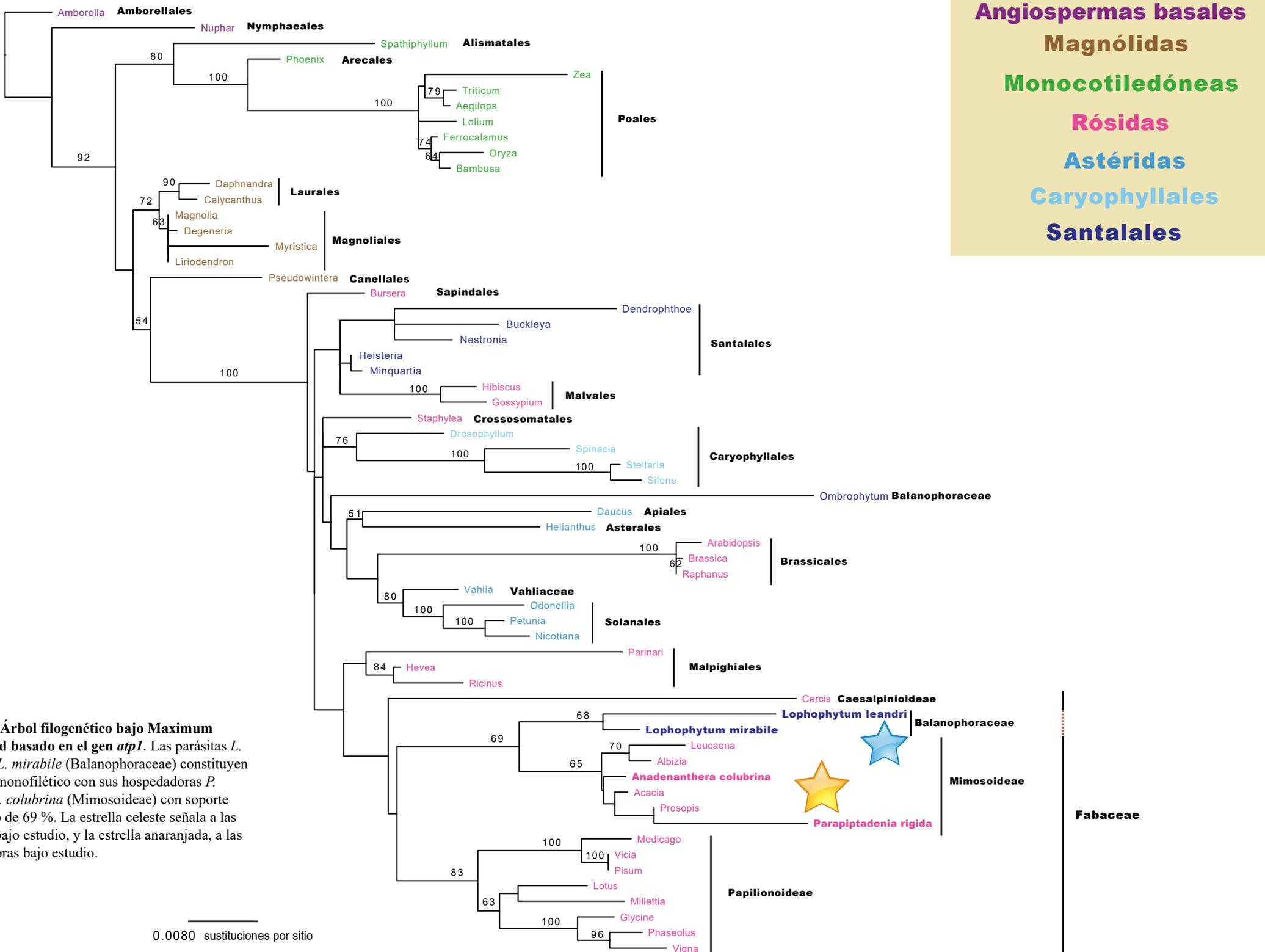


Figura 8. Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen *atp1*. Las parásitas *L. leandri* y *L. mirabile* (Balanophoraceae) constituyen un grupo monofilético con sus hospedadoras *P. rigida* y *A. colubrina* (Mimosoideae) con soporte estadístico de 69%. La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

Angiospermas basales

Magnólidas

Monocotiledóneas

Rósidas

Astéridas

Caryophyllales

Santales

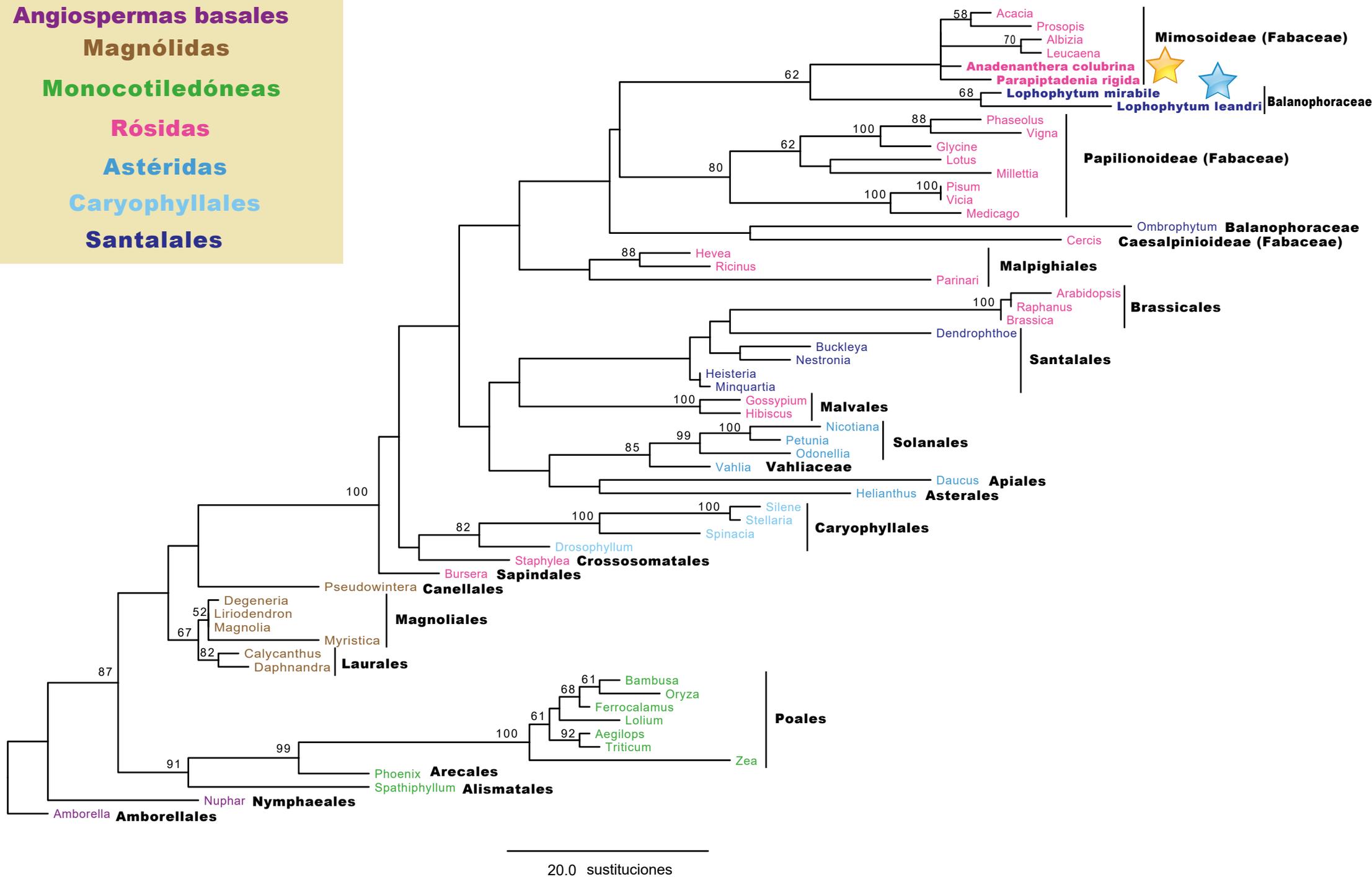


Figura 9. Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen *atpI*. Las parásitas *L. leandri* y *L. mirabile* (Balanophoraceae) constituyen un grupo monofilético con sus hospedadoras *P. rigida* y *A. colubrina* (Mimosoideae) con soporte de bootstrap moderado (62 %). La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

El árbol filogenético del gen *atp8* (Figuras 10 y 11) muestra un grupo monofilético integrado por las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* y las Mimosoideae (*Prosopis* y *Acacia*), con un valor de bootstrap moderado para el análisis de ML (BS=55%; Figura 10); y con un valor de BS=72% para MP (Figura 11). Este grupo resulta hermano, pero con soporte estadístico no significativo, del clado constituido por las Papilionoideae (BS=94% en ambos análisis). Las parásitas del género *Lophophytum* (Balanophoraceae) no agrupan con la única especie del orden Santalales disponible en las bases de datos (*Comandra*).

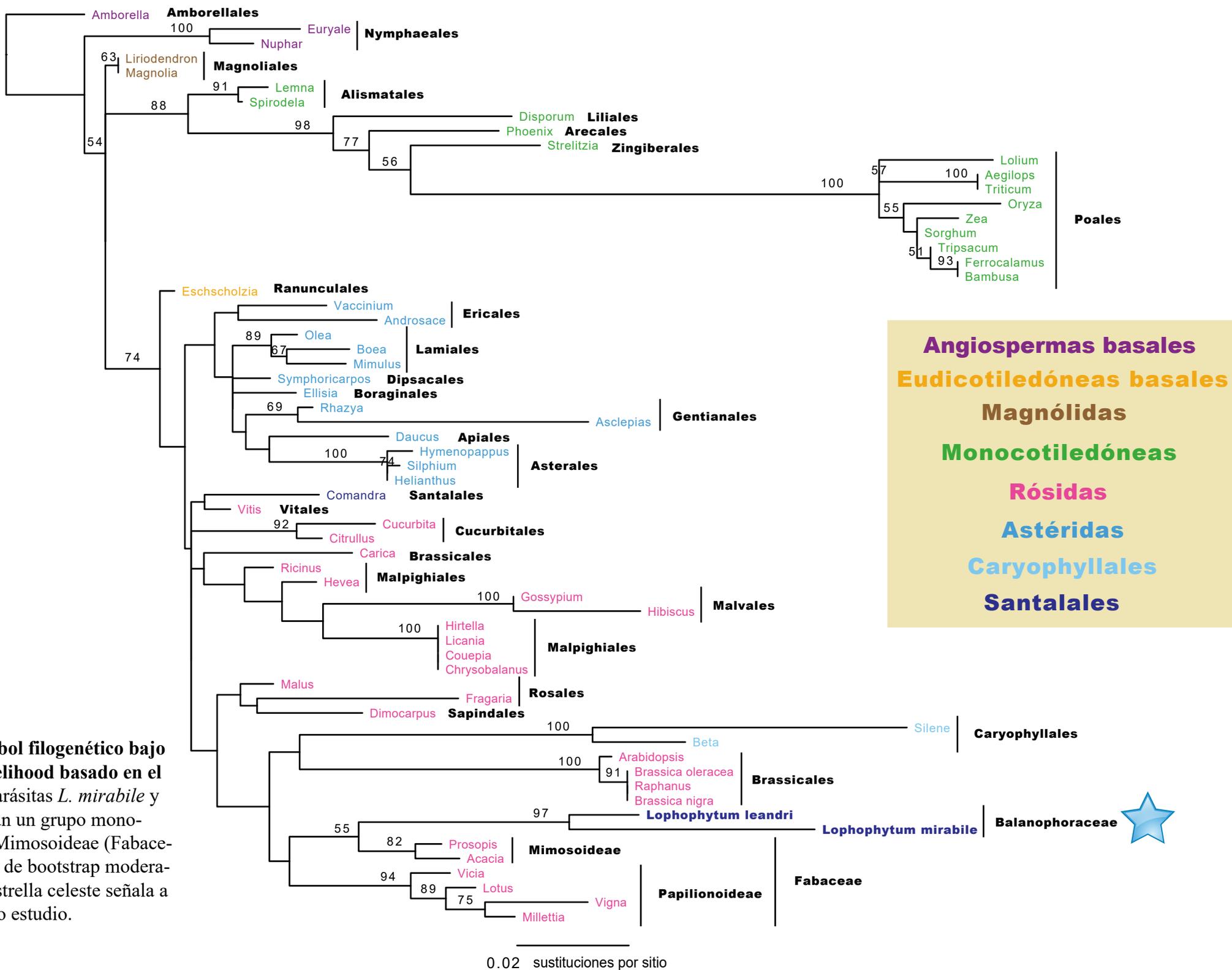


Figura 10: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen *atp8*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con las Mimosoideae (Fabaceae) con un valor de bootstrap moderado (55 %). La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio.

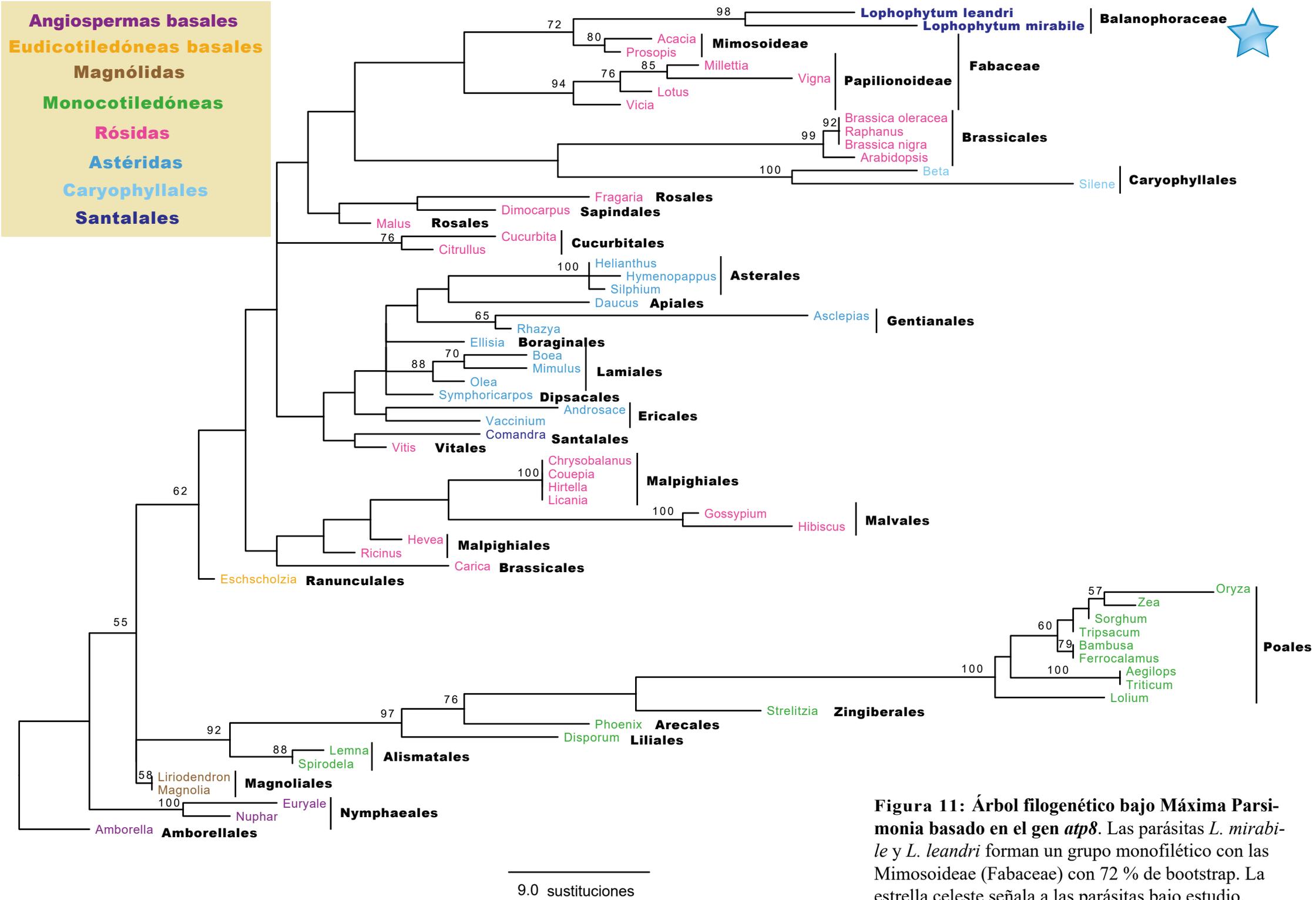


Figura 11: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen *atp8*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con las Mimosoideae (Fabaceae) con 72 % de bootstrap. La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio.

En la filogenia de *ccmC* (Figuras 12 y 13) las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con diversas especies de la familia Fabaceae, que incluyen a las hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida* (75% de bootstrap para ML y 78% para MP). La subfamilia Papilionoideae forma un clado con 96% de bootstrap para ML y 97% para MP. Es notable que las especies de *Lophophytum* no son hermanas en este árbol, sino que el género *Lophophytum* forma un grupo parafilético. No hay disponibles en la actualidad secuencias del gen *ccmC* en otras especies de la familia Balanophoraceae o del orden Santalales.

Angiospermas basales

Magnólidas

Monocotiledóneas

Rósidas

Astéridas

Santalales

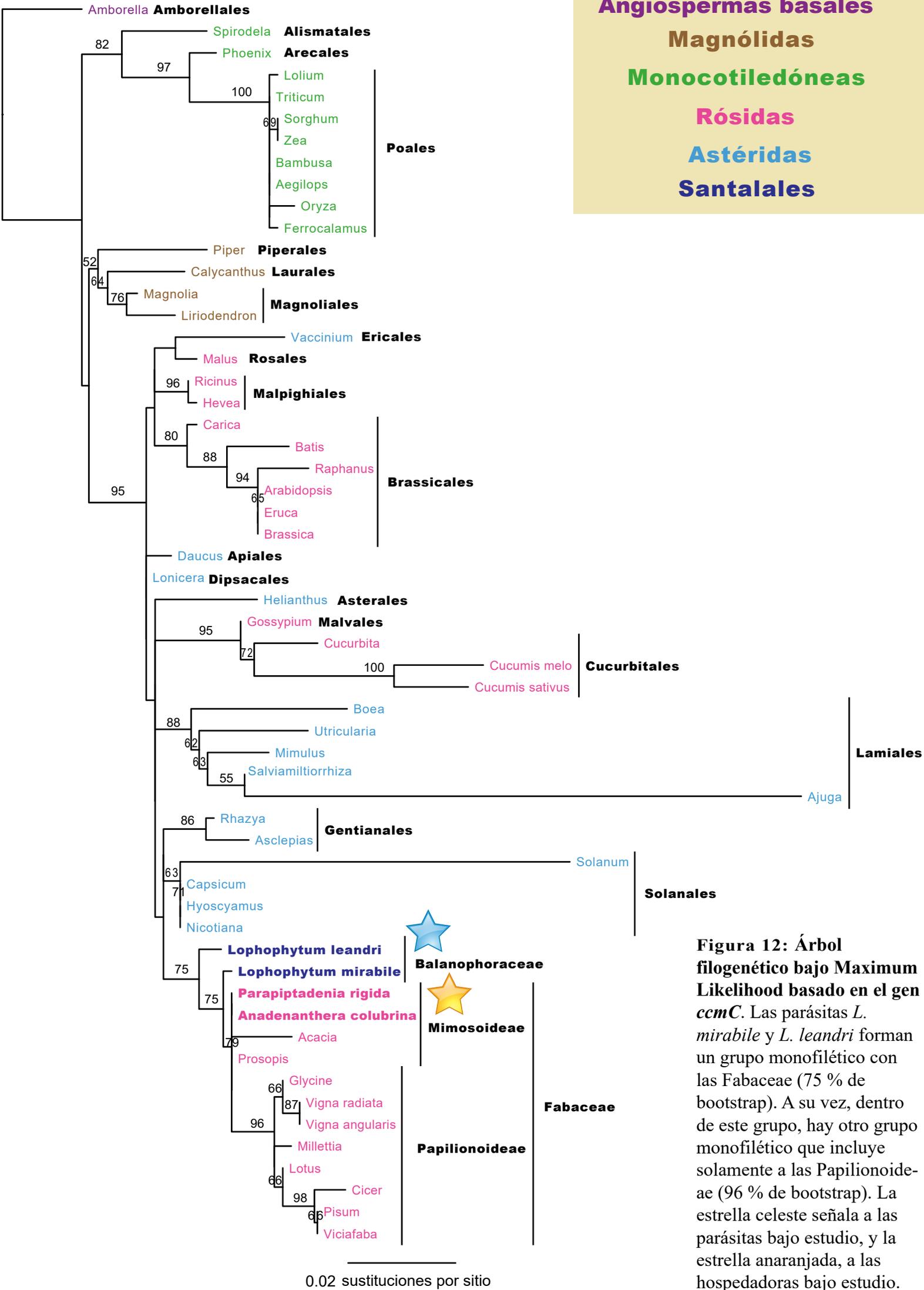


Figura 12: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen *gcmC*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con las Fabaceae (75 % de bootstrap). A su vez, dentro de este grupo, hay otro grupo monofilético que incluye solamente a las Papilionoideae (96 % de bootstrap). La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

Angiospermas basales
Magnóolidas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Santales

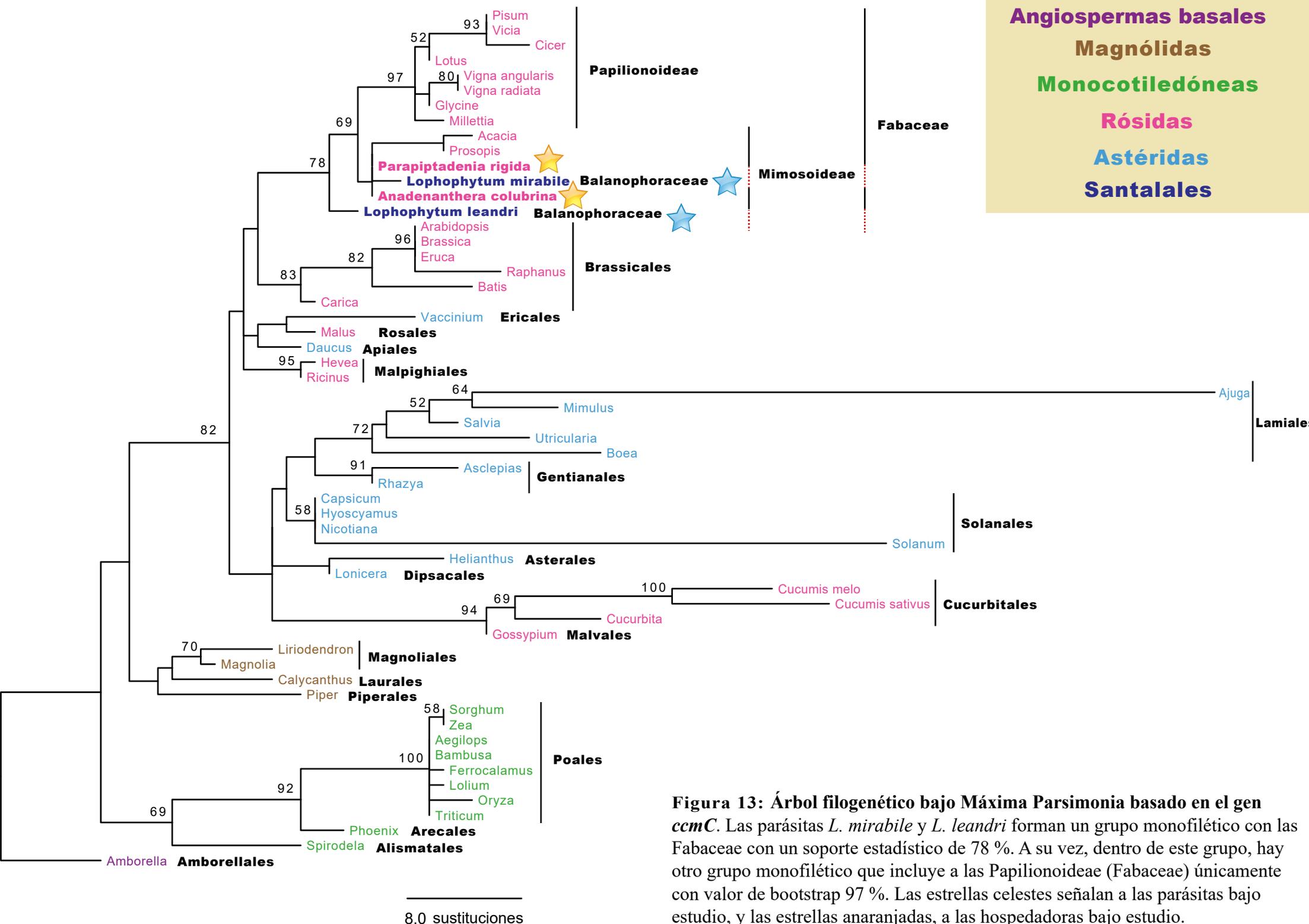


Figura 13: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen *ccmC*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con las Fabaceae con un soporte estadístico de 78 %. A su vez, dentro de este grupo, hay otro grupo monofilético que incluye a las Papilionoideae (Fabaceae) únicamente con valor de bootstrap 97 %. Las estrellas celestes señalan a las parásitas bajo estudio, y las estrellas anaranjadas, a las hospedadoras bajo estudio.

En el análisis filogenético del gen *cob* (figuras 14 y 15) se observa un grupo monofilético constituido por *Lophophytum mirabile*, *L. leandri* (BS=97% en ML y BS=100% en MP), y éste hermano de especies pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae que abarcan a *A. colubrina* y *P. rigida*. El soporte estadístico para este grupo es moderado, BS=56% en ML y BS<50% en MP. A su vez, *Lophophytum* + Mimosoideae forman un grupo monofilético con especies de otras dos subfamilias de la familia Fabaceae aunque con bajo soporte estadístico (BS=50% en ML y BS<50% en MP).

Angiospermas basales
Magnólidas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Caryophyllales
Santalales



Figura 14: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen *cob*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con las Mimosoideae (Fabaceae) con un soporte estadístico moderado (56 %). A su vez, las parásitas también forman un grupo monofilético con la familia Fabaceae (bootstrap 50 %). La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

0.02 sustituciones por sitio

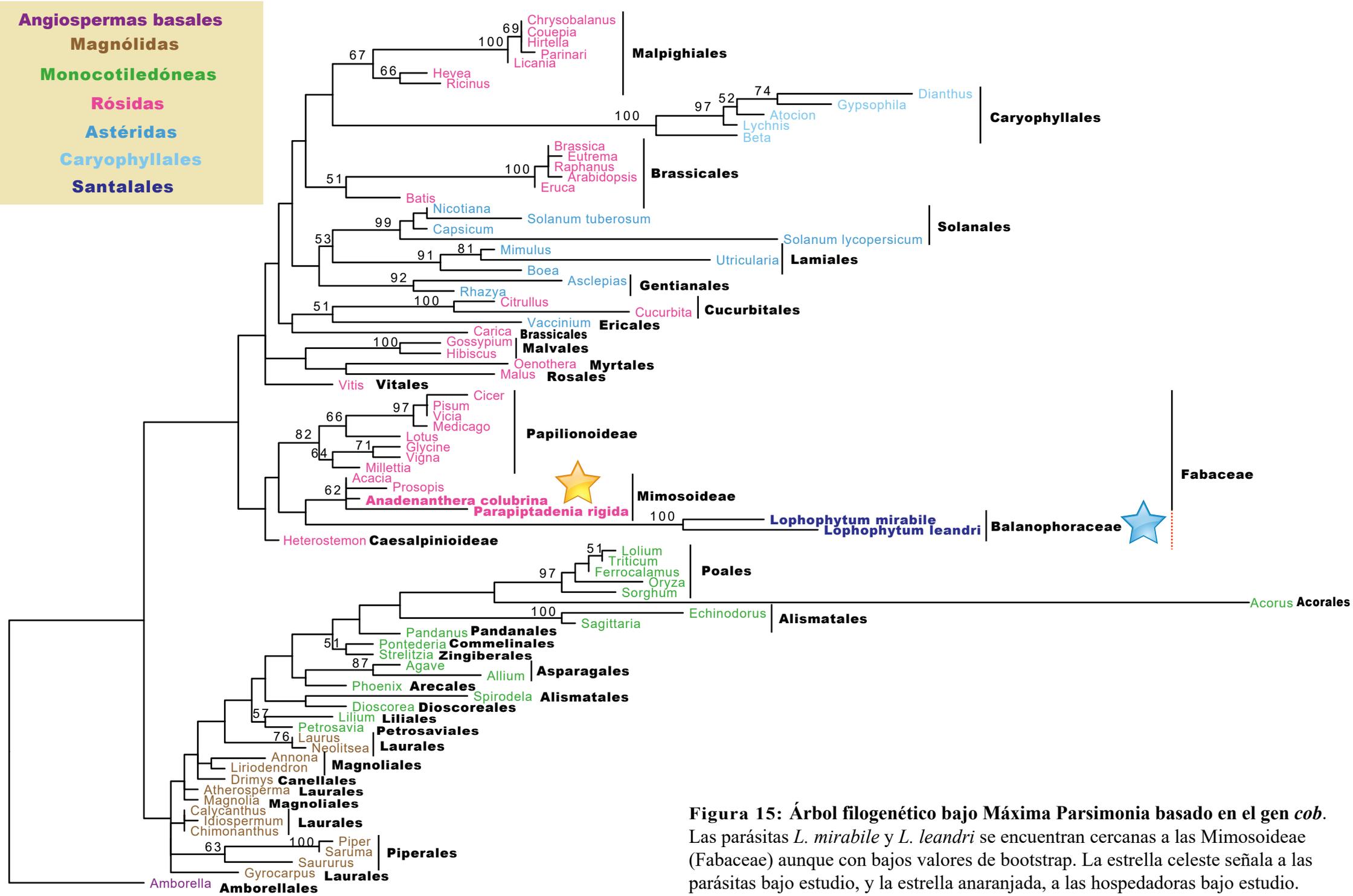


Figura 15: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen *cob*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* se encuentran cercanas a las Mimosoideae (Fabaceae) aunque con bajos valores de bootstrap. La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

10.0 sustituciones

En los análisis filogenéticos de las secuencias codificantes del gen *cox1* (Figuras 16 y 17) se observa un grupo monofilético integrado por las Balanophoraceae (*L. mirabile*, *L. leandri* y *Ombrophytum*), con 53% de bootstrap para ML (figura 16) y 64% para MP (figura 17). Las Balanophoraceae no agrupan con otras familias de Santalales como Loranthaceae (*Dendrophthoe*), Schoepfiaceae (*Schoepfia*) y Opiliaceae (*Lepionurus*). Sin embargo, tampoco se relacionan con otros linajes con soporte estadístico >50%. Por otro lado, *A. colubrina* y *P. rigida* se encuentran dentro de las Fabaceae con soportes estadísticos de 73% (ML) y 76% (MP). En el análisis de ML (Figura 16) las Mimosoideae forman un grupo monofilético que incluye a las hospedadoras estudiadas (BS= 71%).

Angiospermas basales
Magnólidas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Caryophyllales
Santales

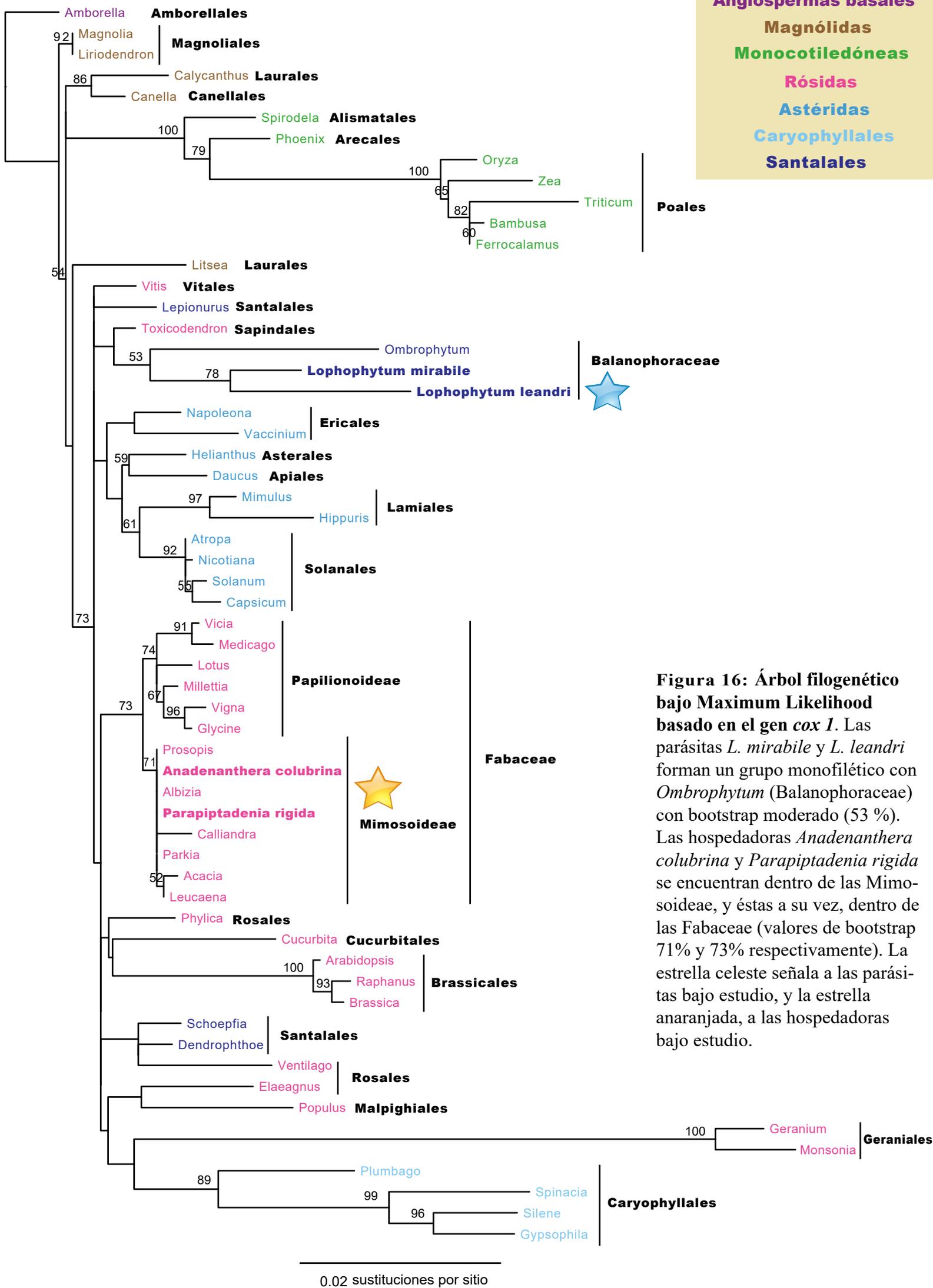


Figura 16: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen *cox 1*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con *Ombrophytum* (Balanophoraceae) con bootstrap moderado (53 %). Las hospedadoras *Anadenanthera colubrina* y *Parapiptadenia rigida* se encuentran dentro de las Mimosoideae, y éstas a su vez, dentro de las Fabaceae (valores de bootstrap 71% y 73% respectivamente). La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

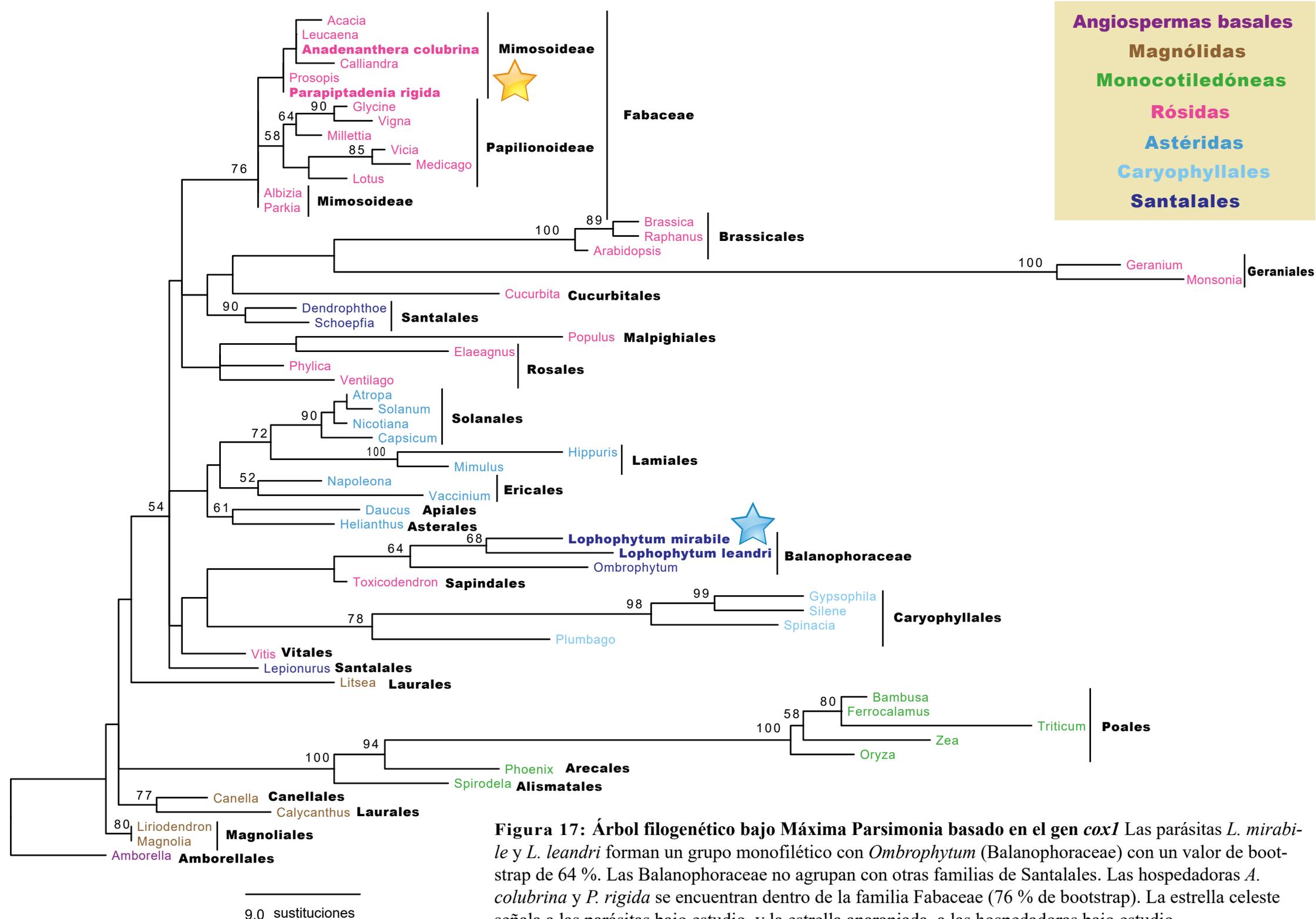


Figura 17: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen *coxI* Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con *Ombrophytum* (Balanophoraceae) con un valor de bootstrap de 64 %. Las Balanophoraceae no agrupan con otras familias de Santalales. Las hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida* se encuentran dentro de la familia Fabaceae (76 % de bootstrap). La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

En las Figuras 18 y 19 se observa la filogenia del intrón de *cox1*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* son hermanas de *Ombrophytum* (Balanophoraceae) con altos valores de bootstrap (88% en el análisis de ML en la Figura 18; y 96% en MP, Figura 19), pero no se relacionan con los intrones de las dos especies de Santalales que lo poseen, *Dendrophthoe* y *Lepionurus*. Además, las relaciones filogenéticas entre distintos órdenes y familias no son las que se conocen entre las angiospermas. En muchos casos, estas afiliaciones inesperadas están apoyadas por valores de bootstrap moderados a altos. Por ejemplo: *Pilea* (Rosales) es hermana de cuatro géneros del orden Lamiales con 82% y 76% de bootstrap en ML y MP, respectivamente. Otro ejemplo aún más llamativo es el clado formado por especies del orden de monocotiledóneas Zingiberales, dos especies de *Polygala* (Familia Fabaceae) e *Hydrocotyle* (Apiales) con máximos valores de bootstrap (100% en ML y MP).

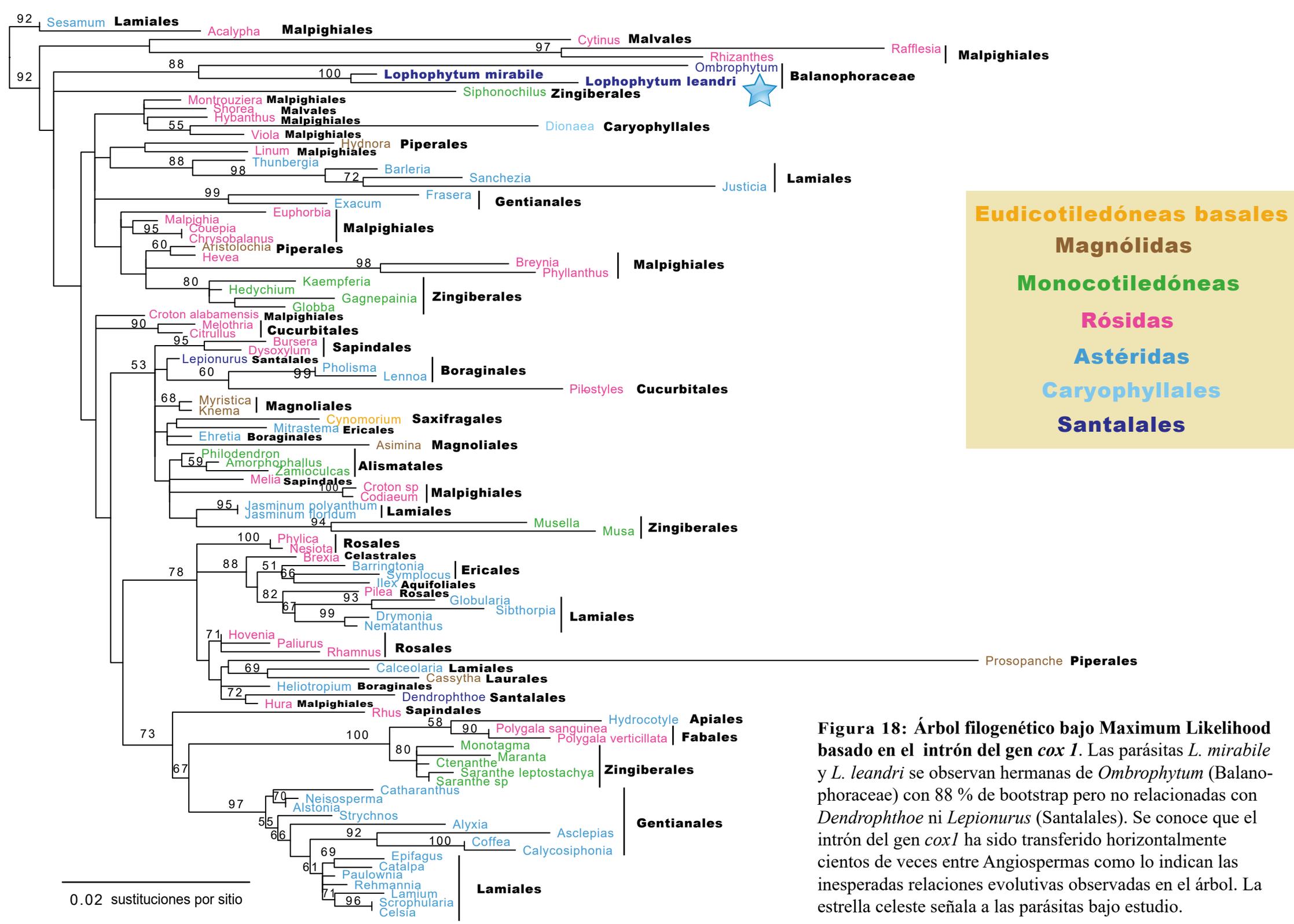
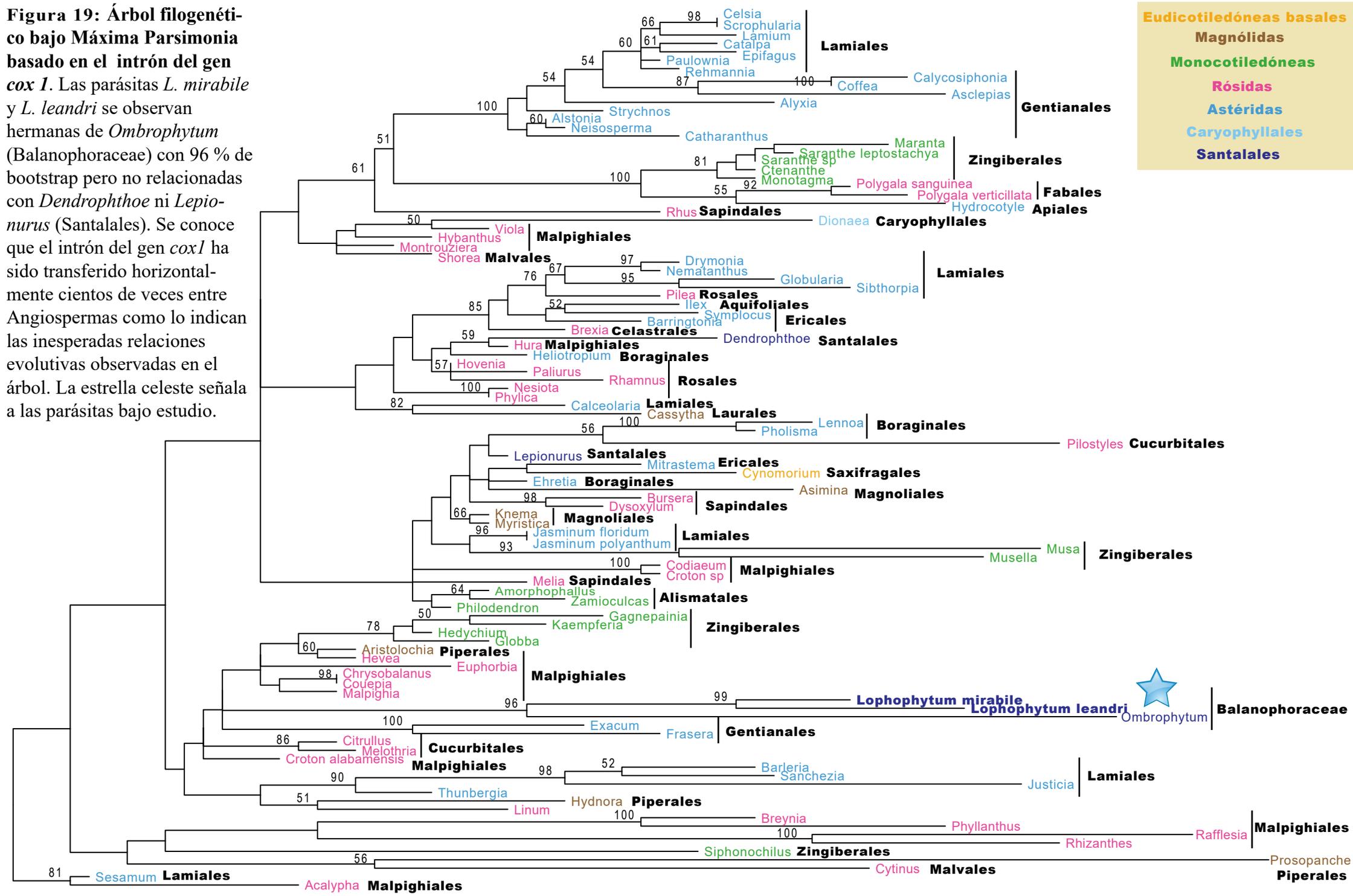


Figura 19: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el intrón del gen *cox I*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* se observan hermanas de *Ombrophytum* (Balanophoraceae) con 96 % de bootstrap pero no relacionadas con *Dendrophthoe* ni *Lepionurus* (Santalales). Se conoce que el intrón del gen *cox I* ha sido transferido horizontalmente cientos de veces entre Angiospermas como lo indican las inesperadas relaciones evolutivas observadas en el árbol. La estrella celeste señala a las parásitas bajo estudio.

Eudicotiledóneas basales
Magnóolidas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Caryophyllales
Santalales



10.0 sustituciones

Al estudiar la filogenia del gen mitocondrial *rpl5* (Figuras 20 y 21) se observa que las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* se agrupan con las especies pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae (que incluye a las hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida*) formando un grupo monofilético con alto soporte estadístico para ambos métodos (76% para ML, Figura 20 y 83% para MP, Figura 21). La mayoría de las relaciones más ancestrales no poseen apoyo estadístico.

Angiospermas basales
Magnólidas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Caryophyllales
Santales

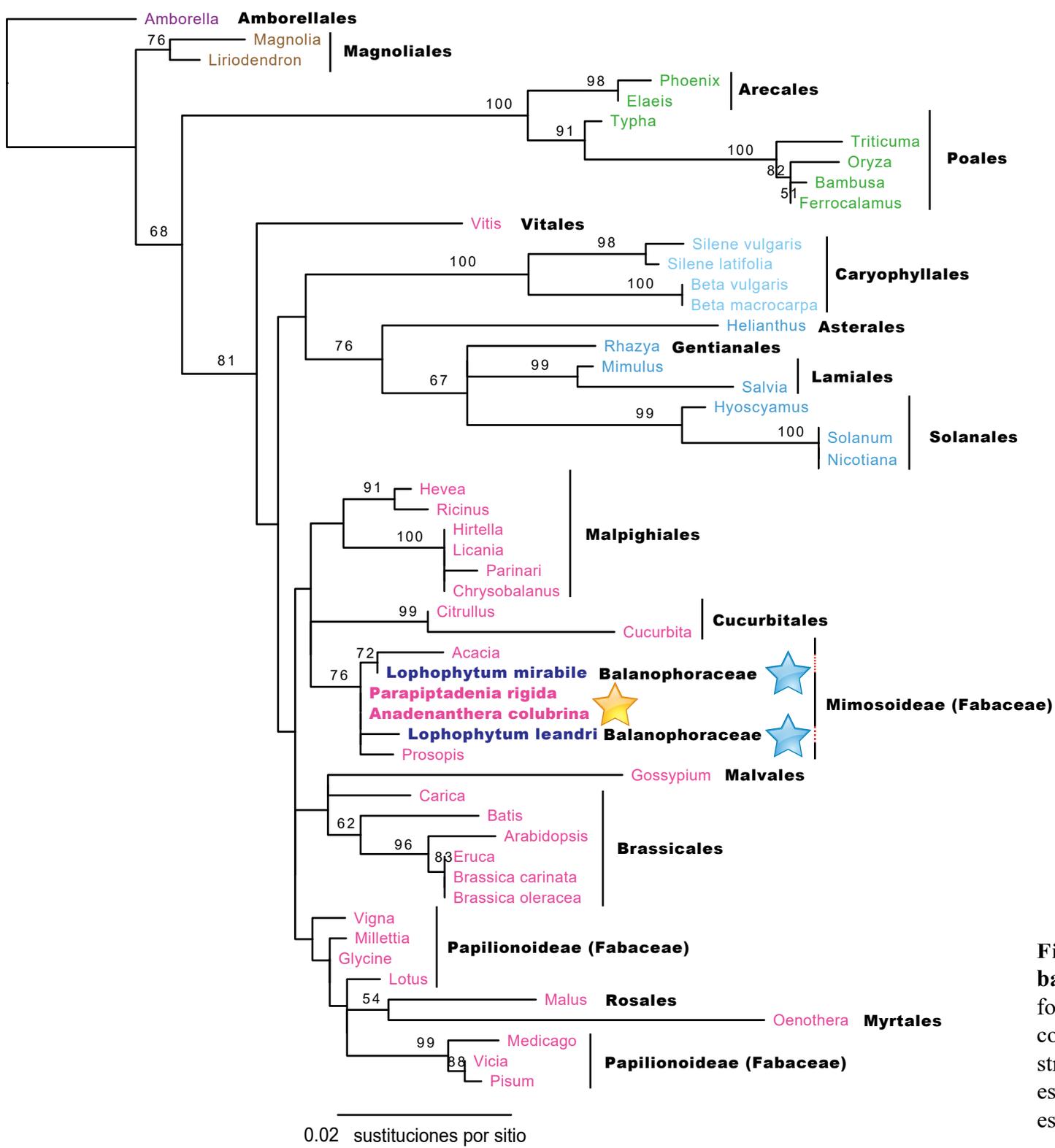
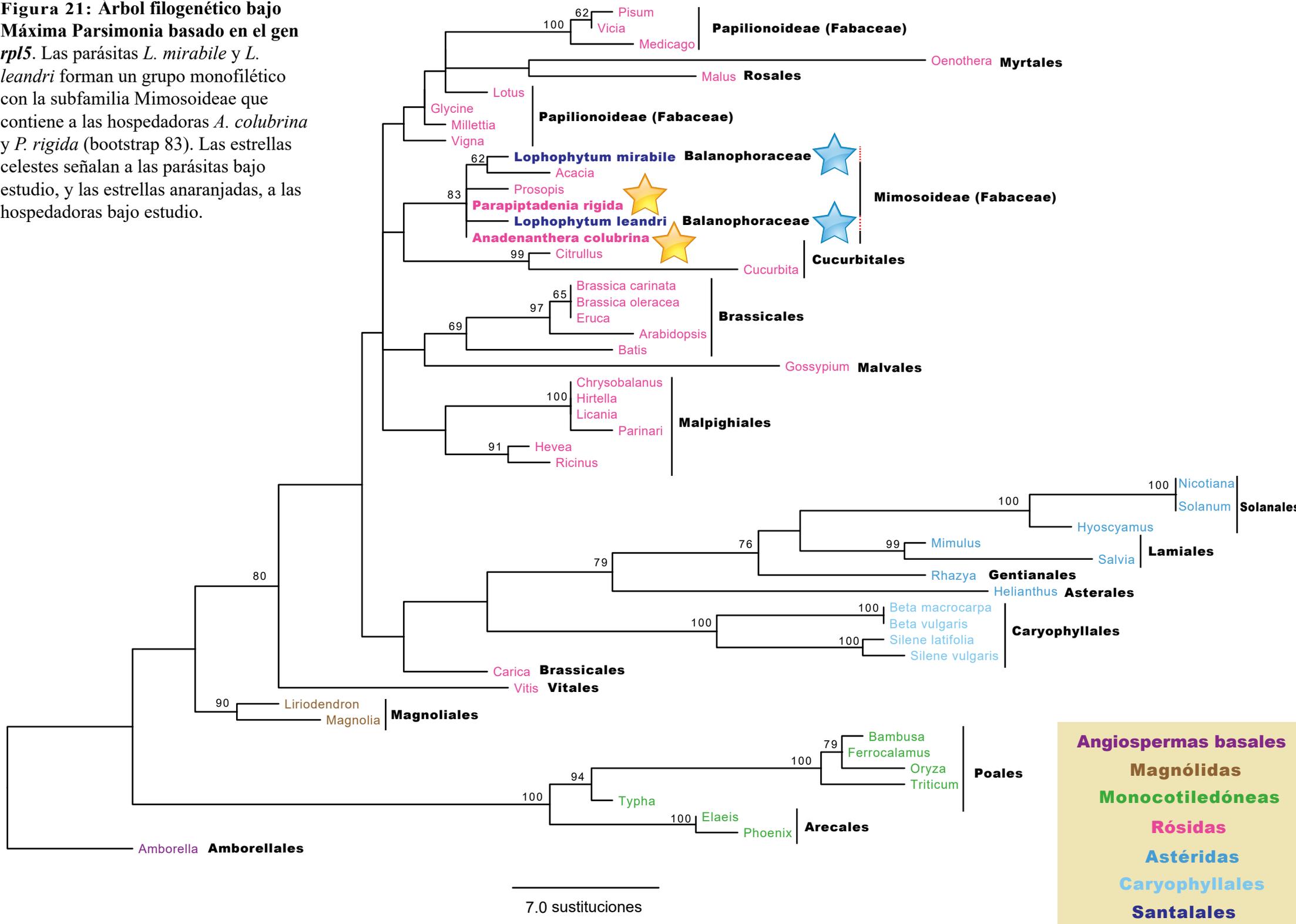


Figura 20: Árbol filogenético bajo Maximum Likelihood basado en el gen *rpl5*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con las Mimosoideae que contiene a las hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida* (bootstrap 76). Las estrellas celestes señalan a las parásitas bajo estudio, y la estrella anaranjada, a las hospedadoras bajo estudio.

Figura 21: Árbol filogenético bajo Máxima Parsimonia basado en el gen *rpl5*. Las parásitas *L. mirabile* y *L. leandri* forman un grupo monofilético con la subfamilia Mimosoideae que contiene a las hospedadoras *A. colubrina* y *P. rigida* (bootstrap 83). Las estrellas celestes señalan a las parásitas bajo estudio, y las estrellas anaranjadas, a las hospedadoras bajo estudio.



Angiospermas basales
Magnólidas
Monocotiledóneas
Rósidas
Astéridas
Caryophyllales
Santalales

III.3.4) Análisis de bootstrap de los árboles filogenéticos

En la Tabla 6 se muestran los valores de bootstrap de los grupos monofiléticos formados entre las especies de plantas analizadas en este trabajo, para cada gen por separado. Por un lado, las parásitas del género *Lophophytum* y la subfamilia Mimosoideae; y por otro lado, estas parásitas y los miembros de la familia Fabaceae (leguminosas).

Tabla 6) Valores de soporte de bootstrap de las relaciones entre las especies del género *Lophophytum* y las leguminosas.

Grupo monofilético	Valor de bootstrap	Gen								
		Nu		Cp		Mitocondriales				
		18S	rbcL	atp1	atp8	ccmC	cob	cox1	intrón cox1	rpl5
<i>Lophophytum</i> y Mimosoideae	ML	-	-	69	55	-	56	-	-	76
	MP	-	-	62	72	-	<50	-	-	83
<i>Lophophytum</i> y Fabaceae	ML	-	-	<50	<50	75	50	-	-	-
	MP	-	-	-	<50	78	<50	-	-	-

Abreviaturas: Nu, nuclear; Cp, cloroplastídico.

III.4) Southern Blot

Se realizaron hibridaciones de Southern Blot de *Lophophytum mirabile* y *L. leandri* utilizando dos sondas (*cob* y *atp1*) para evaluar la presencia y el número de copias de cada gen. El experimento de Southern Blot muestra la hibridación positiva de una única copia del gen *cob* y del gen *atp1* en *L. mirabile* (Figura 22). No se observó ninguna banda de *L. leandri* posiblemente por una baja concentración de ADN o falla en la transferencia del ADN a la membrana.

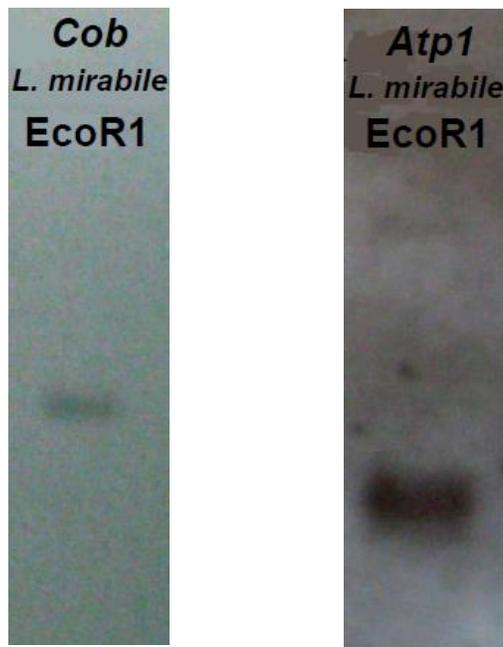


Figura 22) Southern Blot de los genes *cob* (recuadro izquierda) y *atp1* (derecha) para *Lophophytum mirabile*. En ambos casos, resulta una única copia del gen en *L. mirabile*. El tamaño de los fragmentos es de 1,1 kb para *cob*, y 1,3 kb para *atp1*.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

La presente tesis se focaliza en el estudio genético y evolutivo de las plantas holoparásitas *Lophophytum mirabile* y *L. leandri* (Balanophoraceae) y sus plantas hospedadoras *Anadenanthera colubrina* y *Parapiptadenia rigida* (Mimosoideae, Fabaceae). En particular, está centrada en la transferencia horizontal de genes (THG) mitocondriales en las plantas parásitas del género *Lophophytum*. En primer lugar, fue necesario evaluar las relaciones evolutivas del género *Lophophytum* y la familia Balanophoraceae en relación al orden Santalales para luego poder identificar eventos de THG a partir de discordancias en los árboles filogenéticos entre genes.

IV.1) Filogenia de Santalales, Balanophoraceae y *Lophophytum*

Se mencionó anteriormente que, según estudios morfológicos, el género *Lophophytum* pertenecería a la familia Balanophoraceae (González & Mauseth, 2010), pero no hay análisis moleculares al respecto. En este estudio se generaron las primeras secuencias nucleotídicas de dos especies del género *Lophophytum*. A partir de ellas, se realizaron estudios filogenéticos para conocer la evolución de los genes y de los organismos.

El análisis filogenético del gen ADNr *18S*, así como también el de *cox1* y el intrón de *cox1* señalan a la Balanophoraceae *Ombrophytum* como hermana del género *Lophophytum*. Para el caso del gen nuclear ADNr *18S* por Maximum Likelihood esta afiliación tiene soporte estadístico medianamente alto, mientras que para el método de Máxima Parsimonia, no es significativo. Por su parte, para *cox1*, en ambos métodos, el soporte estadístico para esta relación es moderado. Y para el intrón de *cox1*, el valor de soporte estadístico es alto. En conjunto, este análisis sugiere que el grupo hermano del género *Lophophytum* es el género *Ombrophytum* y confirma que *Lophophytum* pertenece a la familia Balanophoraceae.

A su vez, estudios anteriores han sugerido que miembros de la familia Balanophoraceae están relacionados filogenéticamente con las plantas del orden Santalales (Nickrent *et al.*, 2005), sin embargo, estas relaciones son controversiales. En el presente análisis filogenético del gen nuclear ADNr *18S* observamos que las especies de la familia Balanophoraceae formaron 2 grupos monofiléticos separados, indicando que la familia es polifilética. Cinco géneros de Balanophoraceae (*Scybalium*, *Corynaea*, *Helosis*, *Ombrophytum* y *Lophophytum*) formaron un clado con alto soporte estadístico; dicho grupo no mostró afinidad por ningún otro linaje de las angiospermas incluidas en el análisis. Por otro lado, los géneros holoparásitos *Hachettea*, *Dactylanthus* y *Mystropetalon* conformaron un clado con alto soporte estadístico (BS= 83 y 84% ML y MP respectivamente) relacionado con el orden Santalales. Estos resultados concuerdan con el reciente análisis realizado por Su *et al.* (2015), el cual encuentra dos clados de Balanophoraceae bien diferenciados, ambos cercanos a distintas familias del orden Santalales. El primero, compuesto por siete géneros (*Corynaea*, *Helosis*, *Ombrophytum*, *Lophophytum*, *Sarcophyte*, *Thonningia* y *Balanophora*) que conforman la familia Balanophoraceae *sensu stricto*. El segundo clado, constituido por tres géneros: *Dactylanthus*, *Hachettea* y *Mystropetalon*, que conforman la familia Mystropetalaceae. Esta inferencia no monofilética de las Balanophoraceae indica que el holoparasitismo ha evolucionado independientemente

en dos oportunidades en el orden Santalales (Su *et al.*, 2015). Estas observaciones reafirman la hipótesis de Nickrent *et al.* (2005) que manifiesta que las Balanophoraceae se originan de las Santalales (es decir, el ancestro de las Balanophoraceae es una Santalales) y estos grupos no son hermanos.

IV.2) Transferencia horizontal de genes mitocondriales entre parásitas y hospedadoras

Los genes mitocondriales de plantas son propensos a la transferencia horizontal (Bergthorsson *et al.*, 2003; Won & Renner, 2003; Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis & Wurdack, 2004; Nickrent *et al.*, 2004; Barkman *et al.*, 2007). Estudios previos señalan sucesos de THG en la mayoría de los linajes de plantas parásitas conocidos hasta el momento, e involucran predominantemente ADN mitocondrial (Davis & Xi, 2015).

Revisando los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos de los seis genes mitocondriales estudiados (*atp1*, *atp8*, *cob*, *ccmC*, *rpl5* y *cox1*) se pueden detectar cinco casos de genes foráneos probablemente obtenidos por transferencia horizontal: *atp1*, *atp8*, *cob*, *ccmC* y *rpl5*. En general, se observa en cada árbol, un grupo monofilético que abarca a las parásitas del género *Lophophytum* y especies pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae (Fabaceae); o bien, a las parásitas *Lophophytum* y miembros de la familia Fabaceae. En ambos casos, están incluidas las hospedadoras *Anadenanthera colubrina* y *Parapiptadenia rigida* (excepto para *atp8* que no se secuenciaron). El apoyo estadístico para estas relaciones inesperadas entre *Lophophytum* y leguminosas fue moderado (*atp1*, *atp8*, *cob*) a alto (*rpl5*, *ccmC*).

Como conclusión, las inconsistencias observadas en los árboles de estos cinco genes mitocondriales, puntualmente en la ubicación de las parásitas del género *Lophophytum*, sugieren eventos de transferencia horizontal de genes, en sentido hospedador-parásito. La razón de optar por esta direccionalidad es que, en todos los casos, la inconsistencia se exhibe en las parásitas.

En lo que concierne al momento evolutivo en el cual pueden haber tenido lugar los eventos de transferencia horizontal, nuevamente analizamos los árboles filogenéticos de estos cinco genes mitocondriales probablemente adquiridos por THG. Para ello, se plantean dos posibles escenarios *a priori*: uno representa la THG anterior a la divergencia de las especies del género *Lophophytum*, y el otro, la THG posterior a la especiación de las mismas. En el primer escenario, se espera observar en el árbol filogenético un clado con las dos especies de *Lophophytum*, y este grupo a su vez, hermano del grupo monofilético que contiene a las hospedadoras. En tal caso, se podría afirmar que la THG ocurrió en el ancestro de *Lophophytum*, que luego divergió en al menos dos nuevas especies (*L. mirabile* y *L. leandri*). La segunda alternativa propone que, luego de la divergencia del género *Lophophytum* ocurrió el evento de THG. Por lo tanto, se espera observar en el árbol filogenético a cada parásita hermana de su correspondiente hospedadora, es decir, *L. leandri* hermana de *Parapiptadenia rigida*, y *L. mirabile* hermana de *Anadenanthera colubrina*. Con base en los resultados obtenidos, se deduce que, para *atp1*, *atp8* y *cob*, el primer escenario es el adecuado, es decir, en estos casos, la THG fue anterior a la divergencia del género *Lophophytum*. Y por otro lado, para los genes *ccmC* y *rpl5* la segunda opción podría ser la apropiada. La THG habría ocurrido luego de la divergencia de *Lophophytum*.

Analizando el intrón del gen *cox1*, se puede ver claramente que éste ha sido transferido horizontalmente cientos de veces entre las angiospermas, como lo indican las inesperadas relaciones evolutivas observadas en el árbol y estudios anteriores (Adams *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1998; Cho & Palmer, 1999; Sánchez-Puerta *et al.*, 2008; Sánchez Puerta *et al.*, 2011). Particularmente, *L. mirabile* y *L. leandri* se observan hermanas de *Ombrophytum*, y se puede decir, que en este caso, la adquisición del intrón fue anterior a la divergencia entre los géneros *Lophophytum* y *Ombrophytum*.

IV.2.1) ¿Son funcionales los genes foráneos en las parásitas?

Otro aspecto importante a discutir es la posible funcionalidad de los genes transferidos. Es decir, si el material genético adquirido por la planta se trata de pseudogenes o genes intactos, y si la planta parásita los utiliza para realizar ciertas funciones de la célula. Como ya se mencionó, la mayoría de los genes mitocondriales transferidos corresponden a intrones y pseudogenes no funcionales (Renner & Bellot, 2012; Davis & Xi, 2015). Estos últimos coexisten con el gen homólogo nativo que es funcional (Kelling & Palmer, 2008). Además, han sido descritos algunos casos de recombinaciones entre la copia del gen foráneo y la copia nativa resultando en un gen quimérico (Bergthorsson *et al.*, 2003; Barkman *et al.*, 2007); así como también casos de recaptura de un gen perdido anteriormente del genoma mitocondrial (Bergthorsson *et al.*, 2003). Existen también, escasos ejemplos en los que se pierde la copia nativa una vez adquirida la foránea, posiblemente como resultado de la recombinación homóloga entre ambas copias (Xi *et al.*, 2013).

Los ensayos de Southern Blot realizados para los genes *atp1* y *cob* muestran una única copia del gen, en cada caso, para *Lophophytum mirabile*. Ahora bien, al ser foránea la única copia que posee la planta (de acuerdo a los resultados de los árboles), y al ser estos genes mitocondriales de vital importancia para la célula (ya que codifican proteínas implicadas en la respiración celular), esta única copia foránea es por tanto la que utiliza la planta parásita. Esto quiere decir que, por un lado, *Lophophytum mirabile* retuvo los genes adquiridos (foráneos), y por otro lado que perdió sus genes nativos. Al perder los genes nativos, indefectiblemente deberá utilizar los foráneos. En definitiva, se podría tratar de casos de transferencia funcional. Sin embargo, es importante tener en cuenta que mediante la técnica de Southern Blot es posible que se subestime el número de copias de los genes.

IV.3) Gen cloroplastídico *rbcL* en plantas parásitas

Para ambas plantas parásitas estudiadas en esta tesis, *Lophophytum mirabile* y *L. leandri*, se intentó amplificar el gen *rbcL* y no se logró. Más aún, en el análisis de la secuenciación por Illumina de *L. mirabile* no se encontraron secuencias cloroplastídicas. De acuerdo con la bibliografía, los genomas cloroplastídicos de plantas parásitas secuenciados hasta ahora presentan pérdida de genes fotosintéticos (Bellot & Renner, 2015) y además, existe un caso de pérdida total del genoma cloroplastídico (Molina *et al.*, 2014). En las plantas holoparásitas los genes relacionados con la fotosíntesis no son requeridos, y, por lo tanto, pueden derivar en pseudogenes y ser eliminados, resultando en una reducción física y funcional del genoma plastídico. Por lo tanto, una de las consecuencias de la transición hacia la heterotrofía es la disminución en la presión evolutiva para conservar los procesos fotosintéticos, que resulta en pérdidas de genes cloroplastídicos y en consecuencia, en una

producción primaria reducida (Krause, 2008). Los resultados de la presente tesis apoyan esta hipótesis.

CAPÍTULO V: BIBLIOGRAFÍA

- Adams, K. L., M. J. Clements & J. C. Vaughn (1998). The *Peperomia* mitochondrial *cox1* group I intron: timing of horizontal transfer and subsequent evolution of the intron. *Journal of Molecular Evolution* 46:689–696.
- Arimura, S., J. Yamamoto, G. P. Aida, M. Nakazono & N. Tsutsumi. (2004). Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7805-7808.
- Barkman, T. J., J. R. Mc Neal, S. Lim, G. Coat, H. B. Croom, N. D. Young & C. W. dePamphilis. (2007). Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evol Biol* 7 (1): 248.
- Baum, D. A. & K. L. Shaw. (1995). Genealogical perspectives on the species problem. *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* 53:289-303.
- Bellot, S. & S. S. Renner. (2015). The Plastomes of two species in the endoparasite genus *Pilostyles* (Apodanthaceae) each retain just five or six possibly functional genes. *Genome Biol. Evol.* 8(1):189-201.
- Bergthorsson, U., K. L. Adams, B. Thomason & J. D. Palmer. (2003). Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 424:197-201.
- Bergthorsson, U., A. Richardson, G. Young, L. Goertzen & J. D. Palmer. (2004). Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17747-17752.
- Bock, R. (2009). The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. *Trends Plant Sci* 15(1):11–22.
- Bowe, L. M. & C. W. dePamphilis. (1996). Effects of RNA editing and gene processing on phylogenetic reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 13(9):1159-1166.
- Brennicke, A. & C. J. Leaver. (2007). Mitochondrial genome organization and expression in plants. *Encyclopedia of life Science*.
- Cho, Y., Y-L. Qiu, P. Kuhlman & J. D. Palmer. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14244–14249.
- Cho, Y. & J. D. Palmer. (1999). Multiple acquisitions via horizontal transfer of a group I intron in the mitochondrial *cox1* gene during evolution of the Araceae family. *Mol Biol Evol* 16:1155–1165.
- Davis, C. C. & Wurdack, K. J. (2004). Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales. *Science* 305:676-678.
- Davis, C. C., W. R. Andersen, & K. J. Wurdack. (2005). Gene transfer from a parasitic flowering plant to a fern. *Proc. R. Soc. Lond. B* 272:2237-2242.
- Davis, C. C. & Z. Xi. (2015). Horizontal gene transfer in parasitic plants. *Current Opinion in Plant Biology* 26:14-19.
- dePamphilis, C. W. & J. D. Palmer. (1990). Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* 348:337-39.
- Estabrook, E. M. & J. I. Yoder. (1998). Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. *Plant Physiology* 116: 1-7.

- Filipowicz, N. & S. S. Renner. (2010). The worldwide holoparasitic Apodanthaceae confidently placed in the Cucurbitales by nuclear and mitochondrial gene trees. *BMC Evolutionary Biology* 10(1):219.
- Fournier, G. P., C. P. Andam & J. P. Gogarten. (2015). Ancient horizontal gene transfer and the last common ancestors. *BMC Evol. Biol.* 15:70.
- Frackman, S., G. Kobs, D. Simpson & D. Storts. (1998). Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes* 65, 27.
- Futuyma, D. J. (2013). *Evolution*. Sunderland, Massachusetts USA, Sinauer Associates, Inc.
- González, A. M. & J. D. Mauseth. (2010). Morphogenesis is highly aberrant in the vegetative body of the holoparasite *Lophophytum leandrii* (Balanophoraceae): all typical vegetative organs are absent and many tissues are highly modified. *Int. J. Plant Sci.* 171:499-508.
- Green M. R., J. Sambrook (2012). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hansen, B. (1980). Balanophoraceae. *Flora Neotrópica* 23:1-80.
- Heide- Jørgensen, H. (2008). *Parasitic flowering plants*. Brill.
- Hotopp, J. C., M. E. Clark, D. C. Oliveira, J. M. Foster, P. Fischer, M. C. Muñoz Torres, J. D. Giebel, N. Kumar, N. Ishmael, S. Wang, J. Ingram, R. V. Nene, J. Shepard, J. Tomkins, S. Richards, D. J. Spiro, E. Ghedin, B. E. Slatko, H. Tettelin & J. H. Werren. (2007). Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317:1753-1756.
- Kelling, P. J. & J. D. Palmer. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 9:605-618.
- Koonjul, P. K., W. F. Brandt, J. M. Farrant & G. G. Lindsey. (1998). Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Oxford University Press* 27, 3:915-916.
- Koulintchenko, M., Y. Konstantinov & A. Dietrich. (2003). Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J* 22:1245-1254.
- Krause, K. (2008). From chloroplast to "cryptic" plastids: evolution of plastid genomes in parasitic plants. *Curr. Genet.* 54:111-21.
- Krause, K. (2012). Plastid genomes of parasitic plants: a trail of reductions and losses. In: Bullerwell CE, editor. *Organelle genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. p. 79–103.
- Kubo, T & K. J. Newton. (2007). Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 8(1), 5-14.
- Li, X., T-C Zhang, Q. Qiao, Z. Ren, J. Zhao, T. Yonezawa, M. Hasegawa, M. J. C. Crabbe, J. Li & Y. Zhong. (2013). Complete chloroplast genome sequence of holoparasite *Cistanche deserticola* (Orobanchaceae) reveals gene loss and horizontal gene transfer from its host *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae). *PLoS One*, 8: e58747.
- Molina, J., K. M. Hazzouri, D. Nickrent, M. Geisler, R. S. Meyer, M. M. Pentony, J. M. Flowers, P. Pelsler, J. Barcelona, S. A. Inovejas, I. Uy, W. Yuan, O. Wilkins, C-I. Michel, S. LockLear, J. P. Concepcion & M. D. Purugganan. (2014). Possible

- loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Molecular Biology and Evolution* 31(4): 793-803.
- Mower, J. P., S. Stefanovic, G. J. Young & J. D. Palmer. (2004). Gene transfer from parasitic to host plants. *Nature* 432:165-166.
 - Mower, J. P. (2009). The PREP suite: predictive RNA editors for plant mitochondrial genes, chloroplast genes and user-defined alignments. *Nucleic Acids Research* 37: 253-259.
 - Mower, J. P., S. Stefanovic, W. Hao, J. S. Gummow, K. Jain, D. Ahmed & J. D. Palmer. (2010). Horizontal acquisition of multiple mitochondrial genes from a parasitic plant followed by gene conversion with host mitochondrial genes. *BMC Biology* 8:150.
 - Nickrent, D. L., Y. Ouyang, R. J. Duff & C. W. dePamphilis. (1997). Do nonasterid holoparasitic flowering plants have plastid genomes? *Plant Mol. Biol.* 34:717-29.
 - Nickrent, D. L. (2002a). Parasitic plants of the world, in JA Lopez-Saez, P Catalan, and L Saez (eds.). *Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands* (Madrid: Mundi-Prensa Libros), 7-27.
 - Nickrent, D. L. (2002b). Phylogenetic origins of parasitic plants, in JA Lopez-Saez, P Catalan, and L Saez (eds.), *Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands* (Madrid: Mundi-Prensa Libros), 29-56.
 - Nickrent, D. L. & L. J. Musselman. (2004). Introduction to parasitic flowering plants. *The Plant Health Instructor* 13:300-315.
 - Nickrent, D. L., A. Blarer, Y-L. Qiu, R. Vidal-Russell & F. E. Anderson. (2004). Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evol. Biol.* 4, 40.
 - Nickrent, D. L., J. P. Der & F. E. Anderson. (2005). Discovery of the photosynthetic relatives of the "Maltese mushroom" *Cynomorium*. *BMC Evol. Biol.* 5, 38.
 - Nickrent D. L., V. Malécot, R. Vidal-Russell & J. P. Der. (2010). A revised classification of Santalales. *Taxon* 59:538–558.
 - Novick, P. A., J. D. Smith, M. Floumanhaft, D. A. Ray & S. Boissinot. (2010). The evolution and diversity of DNA transposons in the genome of the lizard *Anolis carolinensis*. *Genome Biol. Evol.* 3:1-14.
 - Palmer, J. D. & L. A. Herbon. (1988). Plant mitochondrial-DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *J. Mol. Evol.* 28: 87-97.
 - Park, J. M., J. F. Manen & G. M. Schneeweiss. (2007). Horizontal gene transfer of a plastid gene in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 43:874-985.
 - Petersen G., A. Cuenca & O. Seberg. (2015). Plastome Evolution in Hemiparasitic Mistletoes. *Genome Biology and Evolution* 7(9): 2520-2532.
 - Press, M. & G. Phoenix. (2005). Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytol.* 166: 737-51.
 - Renner, S. S. & S. Bellot (2012). Horizontal gene transfer in eukaryotes: fungi-to-plant and plant-to-plant transfers of organellar DNA. Pp. 223-235 in R. Bock & V. Knoop, eds., *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria*. Springer, Heidelberg.
 - Rice, D. W., A. J. Alverson, A. O. Richardson, G. J. Young, M. V. Sánchez Puerta, J. Munzinger, K. Barry, J. L. Boore, Y. Zhang, C. W. dePamphilis, E. B. Knox & J.

- D. Palmer. (2013). Horizontal transfer of entire genomes via mitochondrial fusion in the angiosperm *Amborella*. *Science* 342:1468-1473.
- Richardson, A. O. & J. D. Palmer. (2007). Horizontal gene transfer in plants. *Journal of Experimental Botany* 58(1), 1-9.
 - Richardson, A. O., D. W. Rice, G. J. Young, A. J. Alverson & J. D. Palmer. (2013). The “fossilized” mitochondrial genome of *Liriodendron tulipifera*: ancestral gene content and order, ancestral editing sites, and extraordinarily low mutation rate. *BMC Biology* 11:29.
 - Roney, J., P. Khatibi & J. Westwood. (2007). Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant Dodder. *Plant Physiol.* 143:1037-1043.
 - Salzberg, S. L., O. White, J. Peterson & J. A. Eisen. (2001). Microbial genes in the human genome: Lateral transfer or gene loss? *Science* 292:1903-1906.
 - Sánchez-Puerta, M. V., Y. Cho, J. P. Mower, A. J. Alverson & J. D. Palmer. (2008). Frequent, phylogenetically local horizontal transfer of the *coxI* group I intron in flowering plant mitochondria. *Mol Biol Evol* 25:1762–1777.
 - Sánchez-Puerta, M. V., C. C. Abbona, S. Zhuo, E. J. Tepe, L. Bohs, R. G. Olmstead & J. D. Palmer. (2011). Multiple recent horizontal transfers of the *coxI* intron in Solanaceae and extended coconversion of flanking exons. *BMC Evol Biol* 11:277.
 - Sato H. A. & A. M. González. (2013). Anatomía y desarrollo de la flor estaminada, microsporogénesis y microgametogénesis en especies de *Lophophytum* (Balanophoraceae) en la Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 48 (1):59-72.
 - Sato H. A. (2014). Anatomía reproductiva de las especies de *Lophophytum* Schott & Endl. (Balanophoraceae) de la Argentina y revisión taxonómica del género en América. PhD (Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes).
 - Sheahan, M. B, D. W. McCurdy & R. J. Rose. (2005). Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell differentiation through massive mitochondrial fusión. *The Plant Journal* 44, 744-755.
 - Skippington, E., T. J. Barkman, D. W. Rice & J. D. Palmer. (2015). Miniaturized mitogenome of the parasitic plant *Viscum scurruloideum* is extremely divergent and dynamic and has lost all *nad* genes. *PNAS* 112(27), 3515-3524.
 - Su, H-J, J-M Hu, F. E. Anderson, J. P. Der & D. L. Nickrent. (2015). Phylogenetic relationships of Santalales with insights into the origins of holoparasitic Balanophoraceae. *International Association for Plant Taxonomy* 64 (3):491-506.
 - Takenaka, M., A. Zehrmann, D. Verbitskiy, B. Härtel & A. Brennicke. (2013). RNA editing in plants and its evolution. *The Annual Review of Genetics* 47:335-52.
 - Westwood, J. H., J. I. Yoder, M. P. Timko & C. W. dePamphilis. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 227-35.
 - Woese C. R., O. Kandler & M. L. Wheelis. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4576-4579.
 - Won, H. & S. Renner. (2003). Horizontal gene transfer from flowering plants to *Gnetum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10824-10829.
 - Xi Z, R. K. Bradley, K. J. Wurdack, K. Wong, M. Sugumaran, K. Bomblies, J. S. Rest, C. C. Davis. (2012). Horizontal transfer of expressed genes in a parasitic flowering plant. *BMC Genomics* 2012, 13:227.

- Xi, Z., Y. Wang, R. Bradley, M. Sugumaran, C. Marx, J. Rest & C. C. Davis. (2013). Massive mitochondrial gene transfer in a parasitic plant clade. *PloS Genet.* 9:e1003265.
- Yoshida S, S. Maruyama, H. Nozaki & K. Shirasu. (2010). Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science* 328:1128.
- Zhang, Y., M. Fernández-Aparicio, E. K. Wafula, M. Das, Y. Jiao, N. J. Wickett, L. A. Honaas, P. E. Ralph, M. F. Wojciechowski, M. P. Timko, J. I. Yoder, J. H. Westwood & C. W. dePamphilis. (2013). Evolution of a horizontally acquired legume gene, albumin 1, in the parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* and related species. *BMC Evol. Biol.* 13:48.
- Zhang, D., J. Qi, J. Yue, J. Huang, T. Sun, S. Li, J-F Wen, C. Hettenhausen, J. Wu, L. Wang, H. Zhuang, J. Wu & G. Sun. (2014). Root parasitic plant *Orobanche aegyptiaca* and shoot parasitic plant *Cuscuta australis* obtained Brassicaceae specific strictosidine synthase-like genes by horizontal gene transfer. *BMC Plant Biology* 14:19.