



Universidad Nacional de Cuyo



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

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

“ESTUDIOS EVOLUTIVOS DE LA PLANTA HOLOPARÁSITA *Ombrophytum
subterraneum*”

Alumna: Brenda Gabriela Ponce.

Directora: Dra. María Virginia Sánchez-Puerta.

Co-Directora: Dra. Laura Evangelina Garcia.

Año: 2016

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Virginia Sanchez-Puerta, por permitirme llevar a cabo este largo camino de grandes emociones, que conlleva la realización de una tesis de grado. También por brindarme su conocimiento académico y sobre todo por su trato personal y su confianza, que me hicieron sentir segura en cada etapa de este seminario.

A la Dra. Laura Garcia, que en este transcurso estuvo presente en cada momento con gran entusiasmo y compañerismo, predispuesta a brindarme su colaboración, enseñanza, aprendizaje, apoyo y confianza. Además, por dedicarme su tiempo extra laboral.

Al Dr. Hector Sato, por la búsqueda, recolección y envío de las plantas utilizadas en el presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio del IBAM, por ayudarme con sus conocimientos y técnicas, enriqueciendo mi experiencia. En especial a Josefina Wohlfeiler y Federico Ceriotti, quienes compartieron sus conocimientos y me ensañaron las técnicas utilizadas en este trabajo.

A los profesores conocidos en el transcurso de mi carrera, que me ayudaron a formarme profesionalmente y motivaron mi pasión por la Biología.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, por todo el apoyo incondicional de estos años. Por apoyarme, darme la oportunidad y brindarme siempre su mejor deseo para cada proyecto encarado en mi vida.

A mis amigas y amigos de la vida por estar presentes y por su apoyo incondicional en cada momento de nuestros años de amistad.

Estudios evolutivos de la planta holoparásita *Ombrophytum subterraneum*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Plantas parásitas	6
1.2 Orden Santalales y Familia Balanophoraceae	8
1.2.1 <i>Ombrophytum subterraneum</i>	9
1.3 Genomas mitocondriales.....	11
Edición del ARN	12
1.4 Transferencia Horizontal de Genes.....	12
1.4.1 THG entre bacterias y plantas	13
1.4.2 THG entre hongos, algas y plantas.....	13
1.4.3 THG planta-planta.....	14
1.5 Mecanismos de THG en plantas.....	17
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	19
2.1 OBJETIVOS	19
2.1.1 Objetivos generales	19
2.1.2 Objetivos específicos.....	19
2.2 HIPÓTESIS.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Material biológico	21
3.1.1 Obtención de las muestras.....	21
3.2 Extracción de ADN	21
3.3 Amplificación por PCR.....	22
3.3.1 Preparación de las muestras para secuenciación.....	23
3.4 Secuenciación y alineamiento	23
3.5 Análisis filogenéticos	23
3.5.1 Cálculo de distancias evolutivas entre <i>Ombrophytum subterraneum</i> y <i>Baccharis sp.</i>	24
3.6 Análisis de expresión de genes mitocondriales	24
3.6.1 Extracción de ARN	24

4. RESULTADOS	26
4.1 Extracción y purificación de ADN	26
4.2 Selección de los marcadores moleculares	27
4.3 Amplificación de genes por PCR, secuenciación y análisis	29
Edición de ARN.....	31
4.4. Análisis filogenéticos	31
4.4.1 Gen nuclear <i>ADNr 18S</i>	32
4.4.2 Gen mitocondrial <i>atp1</i>	35
4.4.3 Gen mitocondrial <i>atp8</i>	40
4.4.4 Gen mitocondrial <i>ccmC</i>	44
4.4.5 Gen mitocondrial <i>cob</i>	49
4.4.6 Gen mitocondrial <i>rpl5</i>	54
4.4.7 Gen mitocondrial <i>cox1</i>	58
4. 5 Distancias evolutivas entre <i>Ombrophytum subterraneum</i> y <i>Baccharis sp.</i>	66
4.6 Extracción de ARN	66
5. DISCUSIÓN	69
5.1 Ubicación taxonómica	69
5.2 Edición del ARN	71
5.3 Intrón del gen <i>cox1</i>	73
5.4 THG de genes mitocondriales.....	74
6. BIBLIOGRAFÍA.....	77
7. APÉNDICE	83
7.1 Protocolos	83
7.1.1. Extracción de ADN	83
7.1.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	85
7.1.3 Calculo de distancia por el método Modified Nei-Gojobori method (Jukes-Cantor) entre las secuencias de nucleótidos de <i>Ombrophytum subterraneum</i> y <i>Baccharis sp.</i>	85
7.1.4 Extracción de ARN	85
7.1.5 Reacción en cadena de la ADN polimerasa a partir del ADNc (RT-PCR) ..	89
7.2 Tablas.....	90

RESUMEN

La transferencia horizontal de genes (THG) es la transmisión de material genético entre especies distintas por mecanismos que difieren de la propagación vertical del organismo a través de la reproducción sexual o asexual. Es relativamente común en los genomas mitocondriales de plantas, especialmente en parásitas. En el presente trabajo se obtuvieron y analizaron genes mitocondriales y un gen nuclear de la especie holoparásita *Ombrophytum subterraneum* (familia Balanophoraceae) y de su hospedador *Baccharis sp.* (familia Asteraceae) para evaluar la incidencia de la THG.

Los análisis filogenéticos revelaron en primer lugar que las secuencias de los genes analizados de *O. subterraneum* presentan una alta tasa de sustitución. En la secuencia del gen *cox1*, se observó la presencia de un intrón del grupo I (común en plantas holoparásitas) y la ausencia del mismo en *Baccharis sp.* La secuencia del intrón, también está presente en la especie hermana de *Ombrophytum*, *Lophophytum mirabile* (Balanophoraceae). Estas observaciones indicarían que el ancestro de dichas parásitas obtuvo el intrón de otra angiosperma y este fue heredado de forma vertical en *Ombrophytum* y *Lophophytum*. En este caso, no es posible especificar el donante por el cual el ancestro obtuvo el intrón por THG.

Además, entre las restantes secuencias mitocondriales de *O. subterraneum* analizadas, se registró un segundo evento de adquisición horizontal. En este caso, el gen mitocondrial *ccmC* de *O. subterraneum* proviene de la familia de su hospedador. La baja tasa de sustituciones observada en la secuencia de *ccmC* de *Ombrophytum* y la presencia de sitios de edición indican, por un lado, que el evento de THG es relativamente reciente, y por otro, que la transferencia ocurrida entre hospedador-parasito habría sido a partir de un fragmento de ADN.

Por los resultados obtenidos para los genes mitocondriales *ccmC* y el intrón del gen *cox1*, se postula la existencia de dos eventos independientes de transferencia horizontal de genes. La correspondiente al intrón del gen *cox1* ocurrió en un ancestro de *Ombrophytum* y *Lophophytum* y la del gen *ccmC* durante la evolución de *Ombrophytum*, siendo una transferencia más reciente. Los otros genes mitocondriales estudiados y el gen nuclear muestran herencia vertical y son de

utilidad para conocer las relaciones evolutivas de la planta holoparásita *Ombrophytum subterraneum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plantas parásitas

El parasitismo ha evolucionado varias veces en casi todos los principales linajes de la vida (Bush *et al.*, 2001; Combes, 2001; Nikolov *et al.*, 2014) y constituye una exitosa estrategia de vida para diversos organismos (Poulin *et al.*, 2000).

Las plantas parásitas se caracterizan por su capacidad de alimentarse directamente de otras plantas, invadiendo las raíces o los tallos de sus anfitriones a través de estructuras especializadas llamadas haustorios. La función de los haustorios es la invasión y la redirección fisiológica de los recursos de la planta hospedadora a la planta invasora (Heide-Jørgensen, 2008; Kuijt, 1969; Mauseth *et al.*, 1992b; Westwood *et al.*, 2010). Las plantas parásitas se pueden clasificar en cuanto a su relación con la fotosíntesis. Las holoparásitas carecen de actividad fotosintética y obtienen todos sus compuestos carbonados del hospedador a través de las conexiones haustoriales; mientras que las hemiparásitas son fotosintéticamente competentes, aunque la eficiencia de la fotosíntesis varía considerablemente entre las diferentes especies (Heide-Jørgensen, 2008; Kuijt, 1969; Nickrent *et al.*, 1994; Nikolov *et al.*, 2014).

En cuanto a su diversidad, las plantas parásitas representan el 1% de las especies de angiospermas (Irving *et al.*, 2009; Nickrent *et al.*, 1998). Un estudio filogenético a partir de los genes mitocondriales *atp1*, *cox1* y *matR* (Barkman *et al.*, 2007) reveló que el parasitismo haustorial ha surgido independientemente por lo menos 11 veces en las angiospermas (Figura 1.1) (Barkman *et al.*, 2007; Nickrent *et al.*, 1998; Westwood *et al.*, 2010).

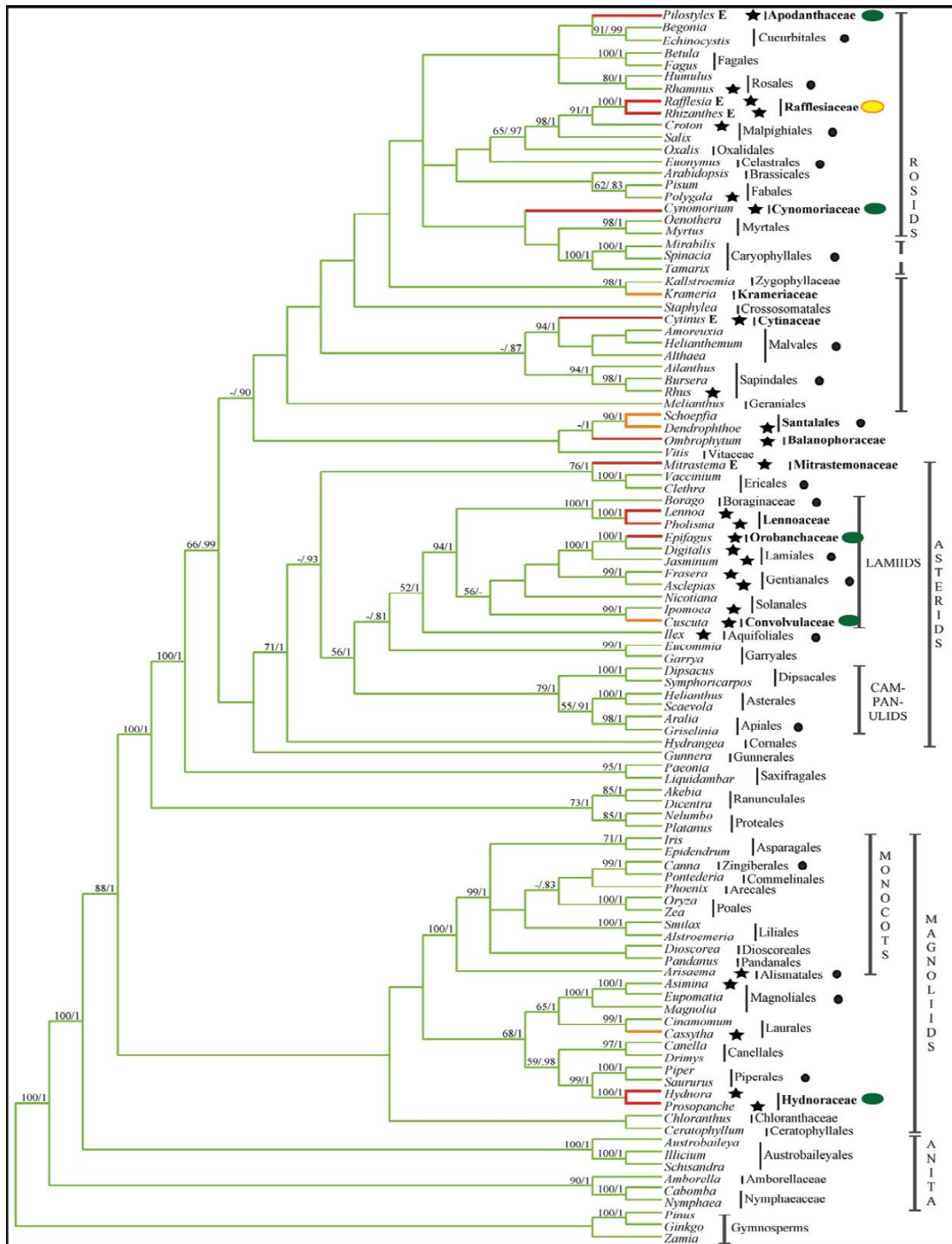


Figura 1.1. Árbol filogenético (ML) estimado a partir de 3 genes mitocondriales (*atp1*, *cox1* y *matR*) combinados indica al menos 11 orígenes de parasitismo en la filogenia de angiospermas. Las ramas verdes son plantas de vida libre, las ramas anaranjadas son en su mayoría hemiparásitas y las ramas rojas son linajes holoparásitos. Una estrella junto a un taxón representa la presencia del intrón *cox1* en las especies muestreadas. Un círculo negro relleno junto a un taxa representa la presencia del intrón del gen mitocondrial *cox1* basado en informes de la literatura. Un óvalo verde o amarillo junto a un taxón, representa la presencia o ausencia, respectivamente, de genomas cloroplastídicos en plantas holoparásitas examinadas. Figura tomada y modificada de Barkman *et al.*, 2007 y Bellot y Renner, 2016.

La evolución de las angiospermas holoparásitas ha conducido a adaptaciones morfológicas sin paralelo en otras plantas. La determinación de la posición filogenética de estas especies es extremadamente difícil debido a la pérdida generalizada de órganos como raíces, tallos y hojas (Kuijt, 1969; Davis *et al.*, 2015; Nickrent *et al.*, 1994) y a la alta divergencia (o ausencia) de secuencias del genoma del cloroplasto, que son ampliamente utilizadas para resolver relaciones filogenéticas entre angiospermas (Barkman *et al.*, 2007; Bellot y Renner, 2016; Davis *et al.*, 2015; dePamphilis *et al.*, 1990; Nickrent *et al.*, 1994; Su *et al.*, 2015). El genoma cloroplastídico, aunque reducido, generalmente se ha mantenido en las plantas no fotosintéticas estudiadas hasta el momento (Figura 1.1). Excepcionalmente, en la holoparásita *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae) no se detectaron secuencias del genoma de la organela, a pesar de haberse encontrado estructuras celulares plastídicas (Figura 1.1) (Bellot y Renner, 2016).

1.2 Orden Santalales y Familia Balanophoraceae

El orden Santalales es el grupo de angiospermas que posee el mayor número de plantas parásitas. Cuenta con especies ecológicamente diversas e incluye plantas de vida libre y plantas parásitas tanto de tallos como de raíces (Der *et al.*, 2008; Heide-Jørgensen, 2008; Malécot *et al.*, 2008). El modo de nutrición entre los miembros del Orden varía ampliamente, abarcando desde organismos autótrofos a hemiparásitos y holoparásitos (Balanophoraceae y Mysterpetalaceae, en este último caso) (Der *et al.*, 2008; Heide-Jørgensen, 2008).

El Orden Santalales incluye aproximadamente 179 géneros y 2.460 especies, distribuidas ampliamente en zonas tropicales y templadas de todo el mundo (Su *et al.*, 2015). Las características que unen a todas las Santalales incluyen hojas simples, perianto valvado, placentación pendular central libre (incluyendo derivaciones reducidas) y frutos de una sola semilla (Malécot *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015; Wanntorp *et al.*, 2009). Otro rasgo que identifica a muchos miembros del Orden Santalales es la presencia de ácidos grasos de 18 Carbonos acetilénicos (y de cadena más larga), como el ácido santálbico (Aitzetmüller, 2012; Malécot *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015; Wanntorp *et al.*, 2009).

El Orden Santalales está bien soportado como un clado monofilético (Soltis *et al.*, 2000; Nickrent *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2015) y se reconocen al menos ocho

familias dentro del mismo (Barkman *et al.*, 2007; Der *et al.*, 2008; Heide-Jørgensen, 2008; Nickrent *et al.*, 2010; Wanntorp *et al.*, 2009). Análisis moleculares y filogenéticos (utilizando secuencias nucleares y mitocondriales) indican que la familia Balanophoraceae *sensu lato* estaría incluida en el orden Santalales, aunque la ubicación filogenética exacta no está determinada (Barkman *et al.*, 2007; Nickrent *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2015) y dichos análisis sólo incluyeron a algunos miembros de la familia (Barkman *et al.*, 2007; Nickrent *et al.*, 2005).

La familia Balanophoraceae *sensu lato* contiene 17 géneros y 44 especies (Heide-Jørgensen, 2008; Mauseth *et al.*, 1992b; Su *et al.*, 2015) y está formada exclusivamente por plantas holoparásitas, que se unen a las raíces de sus hospedadores mediante haustorios (Heide-Jørgensen, 2008; Kuijt, 1969; Nickrent *et al.*, 2002). Recientemente un estudio global abarcando gran parte de los géneros de la familia Balanophoraceae *sensu lato*, reveló que los mismos no forman un grupo monofilético y en cambio, se agrupan en dos clados, localizados ambos dentro del orden Santalales (Su *et al.*, 2015). Los clados poseen tasas de sustitución nucleotídicas muy diferentes y se clasifican como: i- clado A con tasas de sustitución elevadas y fue denominado Familia Balanophoraceae *sensu stricto* y ii- clado B con tasas de sustitución relativamente bajas y denominado Familia Mystropetalaceae (Su *et al.*, 2015).

1.2.1 *Ombrophytum subterraneum*

En la familia Balanophoraceae *s. str.*, se encuentra el género *Ombrophytum* (Mauseth *et al.*, 1992b; Mauseth *et al.*, 1992; Su *et al.*, 2015) que contiene 5 especies distribuidas en América del Sur, incluyendo las Islas Galápagos y la Guayana Francesa. Estas especies son *O. subterraneum* (Aspl.) B. Hansen, *O. violaceum* B. Hansen, *O. microlepis* B. Hansen, *O. peruvianum* Poepp. & Endl. y una especie recientemente descrita, *Ombrophytum guayanensis* P. G. Delprete (en la Guayana Francesa). A excepción del resto de los miembros de la familia, las especies del género *Ombrophytum* crecen en zonas áridas (Heide-Jørgensen, 2008; Sato, 2014).

Ombrophytum subterraneum (Asplund) B. Hansen (1980) (sinónimo: *Juelia subterranea*) (Heide-Jørgensen, 2008; Mauseth *et al.*, 1992) es el único representante del género en Argentina. Se encuentra en las provincias de Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán (Sato, 2014). Esta especie está aún poco

estudiada molecularmente. Es una planta holoparásita subterránea que ataca las raíces de diversas especies (Mauseth *et al.*, 1992), siendo *Baccharis sp.* el hospedador más común en Argentina (Dr. Héctor Sato, 2015; comunicación personal). El cuerpo vegetativo (Figura 1.2) está formado por tres partes: el tubérculo (T) o túber en la base, la velo (V), que se encuentra en la mitad de la longitud del cuerpo vegetativo y el pedúnculo de la inflorescencia (P). Posee una infrutescencia en forma de pequeñas esferas en la parte superior del cuerpo vegetativo (Heide-Jørgensen, 2008; Kuijt, 1969; Mauseth *et al.*, 1992; Sato, 2014). Esta especie ha perdido completamente sus hojas (Heide-Jørgensen, 2008).



Figura 1.2. *Ombrophytum subterraneum* y raíces de su hospedador. Barra de escala: 5 cm. Imagen tomada de Sato, 2014.

La infección por *O. subterraneum* provoca que las células del parásito proliferen en una masa subterránea esférica irregular denominada tubérculo que carece de la estructura típica de vástago. El tubérculo es una estructura compuesta por una matriz de parénquima del parásito en la cual se encuentran embebidas las hebras del tejido vascular de la planta hospedadora. Sin embargo, las células anfitrionas no se mezclan con las células parásitas (Mauseth *et al.*, 1992b).

1.3 Genomas mitocondriales

Estudios de las secuencias mitocondriales de animales, hongos, plantas y protistas proporcionan pruebas convincentes de que las mitocondrias surgieron de un solo evento endosimbiótico con éxito, hace más de mil millones años (Gray *et al.*, 1999). En general se acepta que las mitocondrias y los cloroplastos son descendientes de α -proteobacterias y cianobacterias, respectivamente (Gray, 1992; Keeling *et al.*, 2008). Después de dicho evento, gran parte de la información genética original del endosimbionte ancestral se perdió, se reorganizó masivamente o se transfirió al genoma nuclear, mientras que solo una pequeña fracción fue retenida en la organela. Las mitocondrias actuales contienen menos del 1% de la información genética presente en la bacteria que le dio origen (Kubo *et al.*, 2007).

Los genomas mitocondriales (ADNmt) de las angiospermas son los más grandes y complejos de los eucariotas (Adams *et al.*, 2003; Knoop *et al.*, 2011). Independientemente de la longitud del genoma, los ADNmt de plantas codifican entre 37-67 genes rodeados por largas regiones intergénicas, en su mayoría de origen desconocido con ninguna similitud con otras secuencias de ADN conocidas. Las regiones intergénicas son altamente variables en miembros de la misma familia o no comparten estas secuencias y por lo tanto no se pueden utilizar para análisis evolutivos (Mower *et al.*, 2012).

Estas grandes regiones intergénicas facilitan la adquisición de ADN foráneo, sin interrupción de la expresión de genes nativos (Sanchez-Puerta, 2014). Además, las mitocondrias de las plantas son capaces de importar ADN o ARN y experimentan fácilmente la fusión entre ellas (Arimura *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2011). Por otro lado, los ADNmt de las plantas muestran una elevada frecuencia de recombinación intragenómica, que actuaría como una fuente de variación genética, dando lugar a reordenamientos intragenómicos, variación estequiométrica en el número de copias y heteroplasmia en la población de mitocondrias (Oldenburg *et al.*, 2001; Woloszynska, 2010). Otra característica del ADNmt en las plantas es que los genes se editan luego de su transcripción (Bowe *et al.*, 1996; Knoop, 2011), alcanzando altas frecuencias de edición del ARN y con gran variabilidad en los patrones de edición en los diversos linajes de plantas (Knoop, 2011).

Los reordenamientos del ADNmt, en plantas, pueden ocasionar un impacto ecológico y evolutivo cuando se genera androestelidad citoplasmática (CMS), provocado por la aparición de genes quiméricos (Knoop, 2012).

Edición del ARN

La edición de ARN es un proceso posttranscripcional que altera la identidad de los nucleótidos en la molécula de ARN de modo que la secuencia presente en el ARN maduro difiere de la codificada por el ADN (Bowe *et al.*, 1996; Shikanai, 2006; Takenaka *et al.*, 2013). Este proceso es llevado a cabo por diversas proteínas codificadas en el genoma nuclear y cuya función está aún siendo dilucidada (Shikanai, 2006; Takenaka *et al.*, 2013). En las mitocondrias y cloroplastos de angiospermas, la edición de ARN convierte nucleótidos de Citosina (C) a Uracilo (U) (Knoop *et al.*, 2011; Kubo *et al.*, 2007). La edición del ARN constituye un paso necesario para la funcionalidad de muchos genes mitocondriales y cloroplastídicos de las angiospermas, principalmente genes que codifican proteínas, en los que se encuentran la mayoría de los sitios de edición (Kubo *et al.*, 2007; Shikanai, 2006). El rol que cumple la edición del ARN en las plantas, parece ser la restauración de las identidades de los codones conservados evolutivamente para crear proteínas funcionales (Knoop *et al.*, 2011). Cada especie de angiosperma presenta sitios de edición específicos (Handa, 2003). La mayoría de los eventos de edición de ARN se producen en la primera o segunda posición de los codones (Bowe *et al.*, 1996; Shikanai, 2006; Takenaka *et al.*, 2013). Por lo tanto, el ARN maduro codifica un aminoácido diferente del codificado por el ADN genómico (Bowe *et al.*, 1996; Shikanai, 2006; Takenaka *et al.*, 2013).

1.4 Transferencia Horizontal de Genes

La transferencia horizontal de genes (THG) es la transmisión de material genético entre genomas evolutivamente distintos por mecanismos diferentes a la propagación vertical del organismo que ocurre a través de medios sexuales o asexuales (Bergthorsson *et al.*, 2003; Keeling *et al.*, 2008; Mower *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2003). La THG se ha generalizado en procariotas y, en menor medida, en eucariotas unicelulares y multicelulares (Bergthorsson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2013; Knoop *et al.*, 2011; Mower *et al.*, 2010; Nikolaidis *et al.*, 2013; Rice *et al.*, 2013; Richardson *et al.*, 2007; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014; Xi *et al.*,

2012). Teniendo en cuenta los intercambios genéticos reportados entre eucariotas multicelulares, las plantas, específicamente las plantas con flor son las que han sufrido mayores transferencias (Bergthorsson *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004; Knoop *et al.*, 2011; Mower, *et al.*, 2004; Mower *et al.*, 2010; Rice *et al.*, 2013 Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2012). Además, se conoce que la incidencia de la THG en plantas varía notablemente de una especie a otra (Bergthorsson *et al.*, 2003).

1.4.1 THG entre bacterias y plantas

Las plantas participan como donantes o receptores en las THG entre los tres dominios de la vida (Furner *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 2013; Keeling *et al.*, 2008; Nikolaidis *et al.*, 2013; Renner *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2007). Se reconocen pocos casos de THG entre procariotas y eucariotas multicelulares (Furner *et al.*, 1986; Mower *et al.*, 2010; Nikolaidis *et al.*, 2013; Renner *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2007). Los ejemplos más conocidos de estas transferencias son los que se producen entre bacterias y plantas, siendo la bacteria el donante del material genético (Furner *et al.*, 1986; Mower *et al.*, 2010; Renner *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2007). También, se han registrado algunos casos donde las plantas se comportan como donante del material genético (Nikolaidis *et al.*, 2013). A pesar de su baja frecuencia, este tipo de eventos de transferencia pueden haber contribuido significativamente a la evolución de las especies procariotas y eucariotas (Keeling *et al.*, 2008; Nikolaidis *et al.*, 2013).

1.4.2 THG entre hongos, algas y plantas

Los estudios sobre la THG entre hongos y plantas de diversos taxa han detectado que la transferencia del material genético puede ser desde el hongo a la planta (Barkman, *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1999; Mower *et al.*, 2010; Renner *et al.*, 2012; Rice *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2009; Vaughn *et al.*, 1995) o en sentido inverso (Nikolaidis *et al.*, 2013; Renner *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2009). Por otro lado, son escasos los eventos reportados de THG de algas a plantas. Como caso extraordinario, la secuenciación completa del ADN mitocondrial de la angiosperma *Amborella trichopoda* reveló la presencia de genomas mitocondriales completos originarios de musgos y algas verdes, así como decenas de genes adquiridos de otras angiospermas. Se propone que la adquisición de este material,

fue por transferencias multigénicas o de genomas mitocondriales completos, en eventos independientes (Rice *et al.*, 2013).

1.4.3 THG planta-planta

La THG planta-planta puede involucrar cualquiera de los tres compartimentos que contienen ADN (núcleo, mitocondria, cloroplasto), aunque ciertos genomas son más propensos a intercambios genéticos que otros (Sánchez-Puerta, 2014) (Figura 1.3). La mayoría de los casos de THG de planta a planta comprenden secuencias mitocondriales (Barkman *et al.*, 2007; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014; Rice *et al.*, 2013). A pesar del número creciente de casos reportados de THG en plantas, los mecanismos, extensión y consecuencias de dichas transferencias siguen siendo en gran parte desconocidos (Mower *et al.*, 2010; Mower *et al.*, 2012).

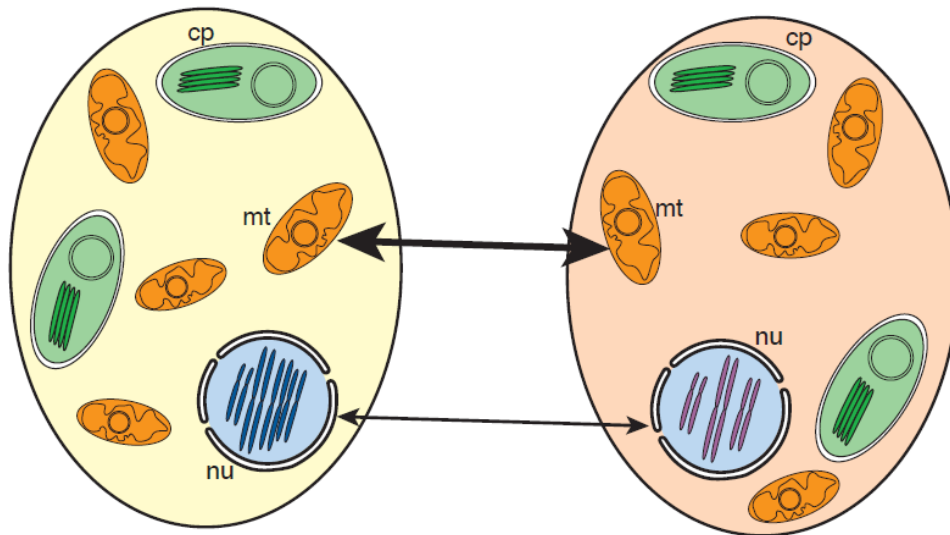


Figura 1.3. Transferencia horizontal de genes entre dos especies de plantas. El grosor de las líneas negras representa el número de eventos THG reportados entre los compartimentos celulares. Las líneas más gruesas indican eventos más frecuentes que las líneas más delgadas. La ausencia de líneas entre compartimentos indica la falta de evidencia para dichas transferencias. mt: mitocondria; cp: cloroplasto; nu: núcleo. (Figura adaptada de Sánchez-Puerta, 2014).

1.4.3.1 THG mitocondrial

La transferencia horizontal de genes es relativamente común en los genomas mitocondriales de plantas (Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2015; Mower *et al.*, 2010; Renner *et al.*, 2012; Rice *et al.*, 2013; Richardson *et al.*, 2007; Skippington *et al.*, 2015), y es especialmente común en las plantas parásitas (Sanchez-Puerta, 2014; Xi *et al.*, 2012).

Los genomas mitocondriales de las plantas son muy activos en la transferencia de material genético entre especies (Mower *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2007). La adquisición de genes mitocondriales foráneos generalmente resulta en una “duplicación génica” en el genoma receptor, donde se encuentran dos copias del gen en cuestión, la nativa y la foránea. Los genes foráneos comúnmente coexisten con sus homólogos nativos, como se observa en el genoma mitocondrial de *Amborella trichopoda* (Rice *et al.*, 2013). Los genes transferidos pueden (y es lo que ocurre con mayor frecuencia) convertirse en pseudogenes mientras que los genes nativos permanecen funcionales (Mower *et al.*, 2010; Sanchez-Puerta, 2014). Por otro lado, las copias foráneas y nativas pueden sufrir conversión génica generando copias quiméricas (Barkman *et al.*, 2007; Mower *et al.*, 2010; Sanchez-Puerta, 2014). Raramente, la copia nativa se pierde y solo permanece la copia foránea del gen que podría ser funcional. Otro escenario poco frecuente es que un gen que haya sido transferido funcionalmente al núcleo, sea readquirido en la mitocondria mediante un evento de THG que podría generar una copia funcional o no (Mower *et al.*, 2010; Sanchez-Puerta, 2014; Xi *et al.*, 2013). En general, no hay evidencias directas que demuestren la funcionalidad de los genes foráneos. Hasta el momento, la expresión y edición eficiente del ARN de genes foráneos indicarían que éstos podrían ser funcionales en la planta receptora.

El primer caso conocido de THG entre plantas implica al intrón del gen *cox1* (intrón del grupo I) en angiospermas, con una distribución desigual en los distintos taxa (Cho *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1999; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta *et al.*, 2011). Múltiples líneas de evidencia indican que este intrón, gen codificante de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa, ha sido adquirido horizontalmente numerosas veces durante la evolución de las angiospermas, desde la transferencia inicial del intrón proveniente de un hongo (Adams *et al.*, 1998; Barkman *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1999; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta *et al.*, 2011; Vaughn *et al.*, 1995).

Intrón del gen mitocondrial *cox1*

En las angiospermas, algunos genes mitocondriales están interrumpidos por intrones (Bonen *et al.*, 2001; Knoop *et al.*, 2011). El intrón del gen *cox1* de las angiospermas contiene un marco abierto de lectura conservado, que codificaría una

ADN endonucleasa “homing”, una enzima de sitio específico que facilita la propagación del intrón (por medio de la vía de reparación de dobles hebras dañadas) en sitios específicos (Figura 1.4). Luego de la ruptura específica de la doble hebra del ADN por la endonucleasa, continúa la degradación exonucleolítica del ADN y la activación de los mecanismos de reparación de las hebras dañadas, que como resultado conducen a la inserción del intrón (Lambowitz *et al.*, 1993). Además, durante este proceso las regiones que flanquean el sitio de inserción son degradadas en longitudes variables y este daño es reparado usando como molde la hebra que contiene el intrón. A los segmentos de exones flanqueantes en el genoma del receptor que son convertidos (por las secuencias del donante) durante este proceso, se los denomina trectos de co-conversión (CCT) (Caprara *et al.*, 2005; Jurica *et al.*, 1999). La extensión de dichos CCT, va a depender de la extensión de la actividad exonucleolítica y del número y la distribución de las diferencias de nucleótidos existente entre los alelos del donante y del receptor (Sanchez-Puerta *et al.*, 2011).

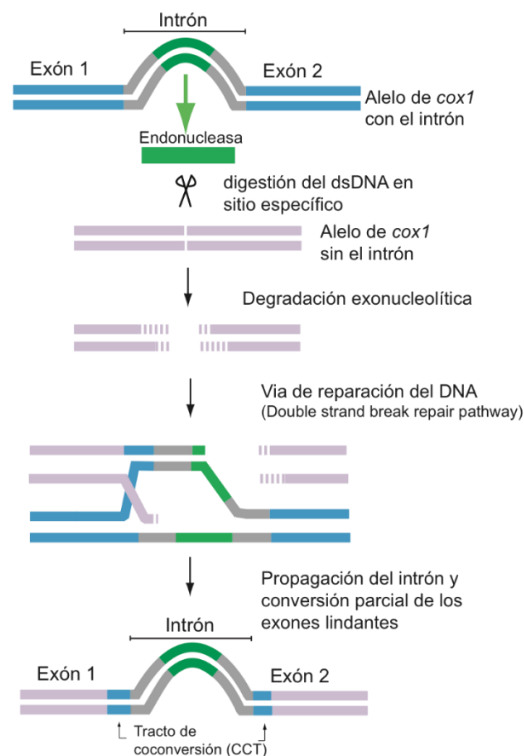


Figura 1.4. Mecanismo hipotético de propagación del intrón del gen *cox1*. Figura adaptada de Sanchez-Puerta *et al.*, 2011.

1.4.3.2 THG nuclear

El ADN nuclear tiene una organización fluida que parecería tener la capacidad para captar ADN foráneo. Se sabe que toma con frecuencia el ADN de los

genomas de las organelas a través de transferencias intracelulares (Bergthorsson *et al.*, 2004). Hasta el momento se han documentado un número limitado de eventos de transmisión horizontal de genes nucleares entre plantas (Davis *et al.*, 2015; Mower *et al.*, 2010; Renner *et al.*, 2012; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014). La THG núcleo a núcleo en plantas probablemente ocurre en una mayor frecuencia de lo que somos capaces de detectar en la actualidad (Bergthorsson *et al.*, 2004; Sanchez-Puerta, 2014), dada la escasez de secuencias del genoma nuclear de plantas disponibles para la comparación. (Sanchez-Puerta, 2014).

1.4.3.3 Genomas cloroplastídicos

Los genomas cloroplastídicos (ADNcp) de angiospermas son altamente resistentes a la adquisición de genes de otros compartimentos celulares, así como de otros organismos (Richardson *et al.*, 2007; Sanchez-Puerta, 2014). El genoma del cloroplasto de los eucariotas fotosintéticos raramente participa en la THG (Sanchez-Puerta, 2014). Probablemente esto no sea una subestimación, porque los ADNcp de plantas se han secuenciado extensamente en el árbol de la vida (Huang *et al.*, 2013; Bergthorsson *et al.*, 2004; Keeling *et al.*, 2008) y no existe prueba convincente disponible para THG entre los genomas plastídicos de angiospermas (Bergthorsson *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2007; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014).

1.5 Mecanismos de THG en plantas

Aunque no se conocen con certeza los mecanismos de THG entre plantas, se postulan diversas hipótesis para este proceso. Entre ellas se destacan: transmisión por contacto directo, como en las relaciones parásito-hospedador, injertos naturales, polinización ilegítima o por transmisión indirecta a través de vectores intermedios, tales como virus, bacterias, insectos u hongos (Barkman *et al.*, 2007; Bergthorsson *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005; Keelig *et al.*, 2008; Knoop *et al.* 2011; Mower, *et al.* 2010; Nickrent *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2013; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014; Won *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014).

Se considera que el contacto físico íntimo entre plantas, es decir, la interacción directa de célula a célula, facilita la transferencia horizontal de genes. Este contacto se lleva a cabo por ejemplo entre las plantas parásitas y sus

hospedadores, en particular entre las células del hospedador y las de los haustorios de las parásitas (Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2015; Knoop *et al.*, 2011; Mower, *et al.* 2010; Nickrent *et al.*, 2004; Nikolaidis *et al.*, 2013; Rice *et al.*, 2013; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014; Skippington *et al.*, 2015; Xi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Aunque muchos nutrientes y macromoléculas incluyendo ARNm (ARN mensajero), son objeto de tráfico entre huésped y parásito (Westwood *et al.*, 2009), la reciente evidencia de THG apunta principalmente a la captación de ADN, en lugar de ARNm (Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2015; Mower *et al.*, 2010; Sanchez-Puerta, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Esto se observa tanto en plantas autótrofas como en las asociaciones parásito-hospedador (Davis *et al.*, 2015). Las plantas parásitas suelen participar como donantes o receptores del material genético de sus hospedadores en las THG (Barkman *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005; Furner *et al.*, 1986; Mower *et al.*, 2004; Mower, *et al.* 2010; Nickrent *et al.*, 2004; Renner *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Dado que existe una elevada tasa de THG en las mitocondrias de angiospermas, y en particular en plantas parásitas, se planea investigar si la planta holoparásita *O. subterraneum* ha recibido genes mitocondriales de especies filogenéticamente no relacionadas, como podría ser de sus diversas plantas hospedadoras. En tales casos, se investigará si dichos genes son funcionales o no, si son redundantes con los genes nativos o si hubo recombinación entre alelos foráneos y nativos. Para lograr identificar genes foráneos debemos contrastar su evolución con la de genes nativos que presentan herencia vertical. Genes que generalmente poseen herencia vertical incluyen genes nucleares que codifican estructuras ribosomales y genes cloroplastídicos.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivos generales

1. Analizar comparativamente la evolución molecular de genes nucleares, mitocondriales y cloroplastídicos en *O. subterraneum* y su hospedador *Baccharis* sp.
2. Evaluar la incidencia de la transferencia horizontal de genes en el genoma mitocondrial de *O. subterraneum*.
3. Analizar la expresión de genes mitocondriales foráneos presentes en *O. subterraneum*.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Extraer ADN, amplificar y secuenciar los siguientes genes mitocondriales: *atp1*, *atp8*, *ccmC*, *cob*, *cox1*, *rpl5*; los genes cloroplásticos: *rbcl*, *matK* y el gen nuclear: *ADNr 18S* de la planta parasita *O. subterraneum* y su hospedador *Baccharis* sp.
2. Analizar las secuencias obtenidas en cuanto a la presencia de sitios de edición, tasa de sustitución y su origen a partir de árboles filogenéticos.
3. Extraer ARN, generar el ADNc, amplificar y secuenciar aquellos genes foráneos que hubiera.

2.2 HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas para este seminario de investigación son:

1. Los genes mitocondriales y cloroplastídicos de *Ombrophytum subterraneum* poseen una alta tasa de sustitución que dificulta la resolución de las relaciones evolutivas en análisis filogenéticos.
2. Debido a que la estrecha relación que se establece entre parásito y hospedador favorece el intercambio de material genético entre los mismos, las mitocondrias de *O. subterraneum* contienen genes que fueron transferidos horizontalmente.
3. Los genes mitocondriales foráneos se expresan y se editan eficientemente en *O. subterraneum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Se trabajó con dos ejemplares de las plantas parásitas de la especie *Ombrophytum subterraneum* y una ejemplar de su hospedador *Baccharis* sp. Los mismos fueron recolectados de su hábitat natural por el Dr. Héctor Sato el día 16 de mayo del 2015 (Figura 3.1), en la localidad Laguna, en campo del señor Mamani, Tres cruces, Humahuaca, Provincia de Jujuy y fueron enviadas por encomienda con los cuidados necesarios.

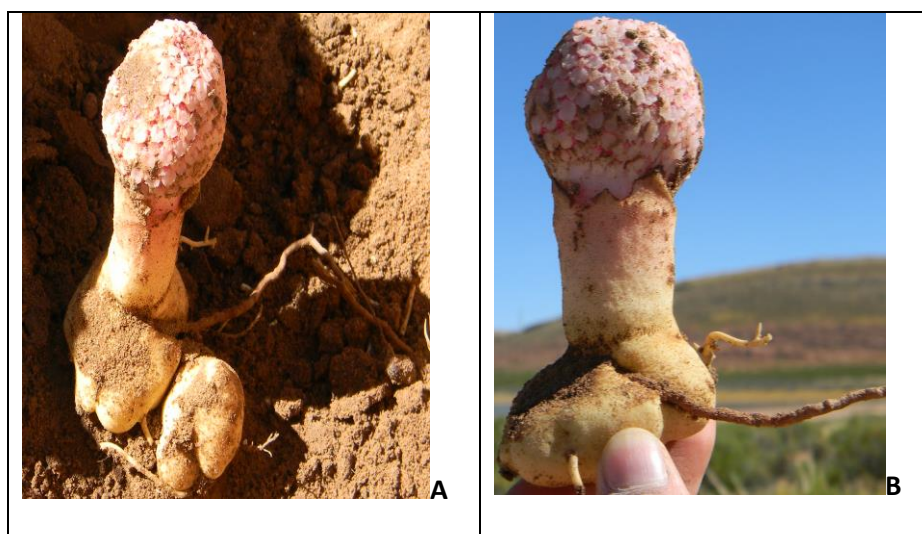


Figura 3.1. *Ombrophytum subterraneum* y raíces de *Baccharis* sp.. **A.** Antes de la recolección. **B.** Después de la recolección. Fotografía tomada por el Dr. Héctor Sato.

3.1.1 Obtención de las muestras

Una vez que los ejemplares llegaron al laboratorio se prepararon para ser utilizados en la extracción de ADN y ARN. De cada uno de los dos ejemplares de *O. subterraneum* se aislaron las raíces del hospedador *Baccharis* sp del tejido del túber. Las muestras fueron seccionadas en pequeños trozos para facilitar el manejo, congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas en freezer a -80°C en tubos Falcon de 50 ml.

3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico total de las plantas parásitas *O. subterraneum* se realizó a partir de tejido congelado proveniente de túber e inflorescencia, por separado. Se siguió el protocolo del Kit comercial DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN). Para poner a punto dicho protocolo se utilizaron 0,2 y 0,4 g de muestra. Además se

realizaron tres eluciones de 10 minutos, 15 minutos y 72 horas, respectivamente. Paralelamente, se realizó la extracción de Doyle & Doyle (1987) (método del CTAB) suplementado con PVP (polivinil pirrolidona). En este caso, se partió de 0,4 y 0,8 g de material tomado de túber y de inflorescencia (protocolos en apéndice).

Para la extracción de ADN total de *Baccharis sp.* se utilizó el método del CTAB suplementado con PVP (protocolo en apéndice), partiendo de 0,4 g de muestra de hojas. El método del CTAB es la técnica más utilizada para la extracción de ADN total en angiospermas.

Para evaluar la calidad y la concentración del ADN extraído por los dos métodos utilizados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (protocolo en apéndice). Las muestras se sembraron en el gel con buffer de siembra (glicerol al 30% con azul de bromofenol). Se realizó electroforesis del gel durante 45 minutos a 90 V y se tiñó con bromuro de etidio. Las bandas fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz UV en fotodocumentador UGENIUS (Syngene).

3.3 Amplificación por PCR

Con las muestras de ADN obtenidas se procedió a la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la DNA polimerasa) de los siguientes genes mitocondriales: *atp1* (subunidad 1 de la ATPasa), *atp8* (subunidad 8 de la ATPasa), *ccmC* (biosíntesis del Citocromo C), *cob* (citocromo oxidasa b), *cox1* (subunidad 1 de la citocromo c oxidasa) y *rpl5* (Proteína ribosomal L5); cloroplastídicos: *matK* (maturasa K) y *rbcL* (cadena larga de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa); y el gen nuclear *ADNr 18S*. Ver justificación de la selección de los genes en sección 4.2 de resultados.

Se utilizaron cebadores universales ya que estos genes poseen regiones altamente conservadas en todas las angiospermas (Tabla 7.1 del apéndice). En algunos casos se utilizaron cebadores diseñados especialmente para la familia Balanophoraceae (Tabla 7.1 del apéndice). Cada amplificación fue realizada bajo las especificidades y condiciones detalladas en el Apéndice.

Para el análisis de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se sembraron 5 µl de cada muestra más 1 µl de buffer de siembra y se realizó la corrida durante 45 minutos a 90 V. Luego de la tinción del gel con bromuro de etidio, las bandas fueron visualizadas bajo luz UV en el fotodocumentador. Para

estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó el marcador de peso molecular Quick-Load 1KB DNA Ladder (New England BioLabs) (protocolo en apéndice).

3.3.1 Preparación de las muestras para secuenciación

Para eliminar los cebadores y dNTPs no incorporados durante las reacciones de amplificación, se llevó a cabo el protocolo de Exosapit (Affymetrix), que incluye dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasa I y una fosfatasa alcalina. La primera remueve cebadores residuales de simple cadena y cualquier fragmento de ADN de simple cadena residual producido durante la reacción de amplificación y la segunda remueve los dNTPs excedentes de la mix de PCR. Se adicionaron 1,5 µl del reactivo al tubo con 15 µl de producto de la PCR y se incubó 15 minutos a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se inactivó por calentamiento a 80 °C durante 15 minutos en el termociclador (protocolos en apéndice). De esta manera las muestras estuvieron listas para enviar a secuenciar.

3.4 Secuenciación y alineamiento

Los productos de amplificación obtenidos y purificados fueron secuenciados mediante secuenciación automática (“Sanger sequencing”) usando el analizador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystem).

Las nuevas secuencias generadas fueron editadas con el programa Sequencher (Gene Codes). Para cada gen se realizó un alineamiento múltiple, incluyendo las nuevas secuencias y secuencias homólogas de diversas angiospermas provenientes de la base de datos GenBank (NCBI) a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Los alineamientos se realizaron con los programas MacClade y MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) que permiten alineación automática y manual de nucleótidos. Los sitios de edición de las secuencias fueron identificados utilizando el programa Prep-Mt (Mower, 2005). Dichos sitios fueron incluidos o excluidos de los alineamientos, previo a los análisis filogenéticos.

3.5 Análisis filogenéticos

La reconstrucción de la historia evolutiva de los genes se realizó mediante análisis filogenéticos de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud basados en los alineamientos. Los análisis de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) de

cada uno de los alineamientos fueron realizados con el programa GARLI 0.951 (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference) (Zwickl, 2006), bajo el modelo general de tiempo reversible (GTR) considerando sitios invariables y tasas heterogéneas de sustitución con una distribución gama con cuatro categorías (GTR + I + G4). En cada análisis, fueron conducidas un total de 10 corridas independientes usando el criterio de terminación automático al llegar a las 5.000.000 de generaciones, para asegurar la convergencia a una topología similar. Para evaluar estadísticamente los árboles filogenéticos se realizaron 100 réplicas de bootstrap (BS) para establecer el soporte de las ramas. El bootstrapping es un método estadístico usado para estimar el nivel de confianza de una relación filogenética (Felsenstein, 1985). Los valores del análisis de “bootstrapping” fueron transferidos al mejor árbol obtenido bajo ML para identificar los nodos más fuertemente soportados (BS >70) de cada filogenia.

También se llevó a cabo un análisis filogenético bajo el criterio de Máxima Parsimonia (MP) utilizando el programa PAUP (Swofford, 2002). La estrategia de búsqueda de árboles se realizó mediante el algoritmo TBR con la opción MulTrees vigente. Los análisis de bootstrap de MP fueron realizados usando 1.000 réplicas. Los valores del análisis de “bootstrapping” fueron transferidos al mejor árbol obtenido bajo MP.

3.5.1 Cálculo de distancias evolutivas entre *Ombrophytum subterraneum* y *Baccharis sp.*

De cada uno de los genes obtenidos, se calculó la distancia evolutiva por el método Modificado de Nei-Gojobori (Jukes-Cantor) entre las secuencias de nucleótidos de *Ombrophytum subterraneum* y *Baccharis sp.* Utilizando el programa MEGA 6 y la función de compute Pairwise Distances. Se calcularon las distancias evolutivas para cada secuencia completa de los genes mitocondriales y del gen nuclear.

3.6 Análisis de expresión de genes mitocondriales

3.6.1 Extracción de ARN

La extracción y purificación del ARN de *O. subterraneum* (túber) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de extracción de TRIzol Reagent (Ambion) (protocolo en apéndice). Además, debido a la particularidad que presentan las muestras (material rígido y con muchos polisacáridos) se utilizó paralelamente un protocolo

específico para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos (Zeng *et al.*, 2002) (protocolo en apéndice). La calidad y concentración del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa. Para sembrar las muestras se utilizó buffer de siembra y se sembraron 10 µl de muestra. Se realizó la electroforesis durante 45 minutos a 90 V. Las muestras de ARN obtenidas se visualizaron a través de la tinción con bromuro de etidio.

Utilizando el ARN extraído se realizó la transcripción reversa del mismo seguida por amplificación por PCR (RT-PCR). En la etapa de retrotranscripción, el ARNm es copiado a ADNc (ADN complementario), que luego se utilizará para realizar la amplificación específica que se requiera mediante PCR (protocolos en apéndice).

A partir del ADNc que se obtuvo de la etapa de retro-transcripción, se procedió a una amplificación por PCR de los genes foráneos identificados (*ccmC*) y genes nativos como control (*cox1*). Se utilizaron cebadores universales ya que estos genes son altamente conservados en todas las angiospermas (Tabla 7.1 en apéndice). Cada amplificación fue realizada bajo las especificaciones y condiciones detalladas en el Apéndice.

4. RESULTADOS

En el presente trabajo se obtuvieron y analizaron las secuencias de genes mitocondriales, cloroplastídicos y nucleares de la especie *Ombrophytum subterraneum* y de su hospedador *Baccharis sp.* para evaluar la incidencia de la transferencia horizontal de genes.

4.1 Extracción y purificación de ADN

La figura 4.1, muestra el gel de agarosa que se obtuvo de la extracción de ADN total de las plantas holoparásitas que se realizó con el Kit DNeasy Plant. Como se observa en la Figura 4.1, se obtuvieron buenos resultados cuando se utilizó túbber como material de partida, sin embargo, no se obtuvo ADN a partir de la inflorescencia (0,2 o 0,4 g de muestra). Cuando se utilizaron 0,4 g de muestra de túbber, se observaron bandas fuertes en el gel inclusive en la tercera elución (72 horas). Cuando se partió de 0,2 g de muestra inicial, las bandas de la segunda y tercera elución fueron débiles.

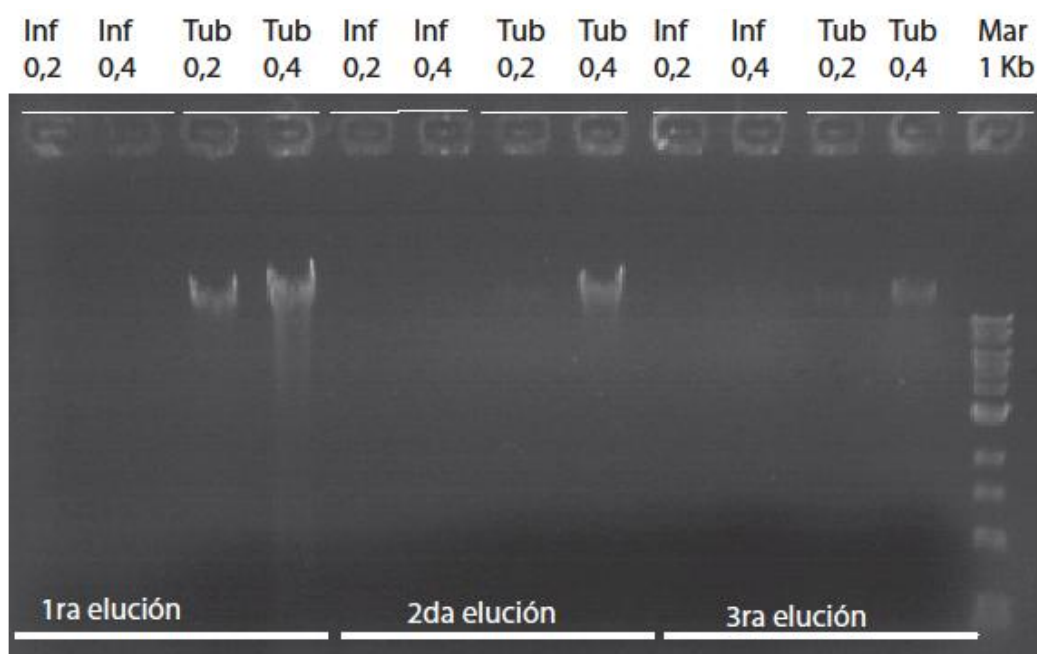


Figura 4.1. Gel de agarosa de la extracción ADN de túbber (Tub) e inflorescencia (Inf) de *O. subterraneum* realizada con el protocolo DNeasy Plant Mini kit. Se indican la 1^{ra}, 2^{da} y 3^{ra} elución y la cantidad de muestra inicial en gramos. Marcador (Mar), 1Kb ladder.

Paralelamente se realizó una extracción de ADN total de las muestras de *O. subterraneum* y de *Baccharis sp.* con el método del CTAB. Al igual que el método anterior, con este método se obtuvo ADN en *O. subterraneum* sólo cuando se utilizó

túber como material de partida, y además a partir de 0,8 g de muestra. Para *Baccharis sp.* se obtuvo ADN total en alta concentración (Figura 4.2).

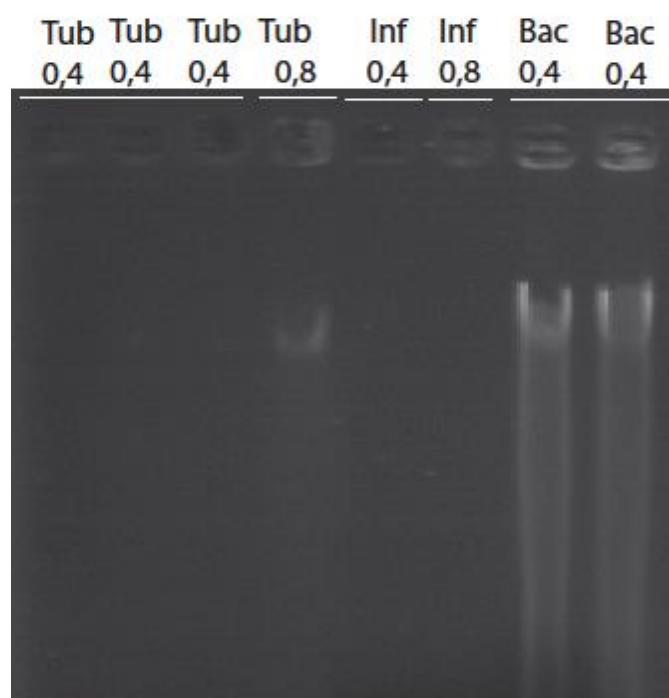


Figura 4.2. Gel de agarosa de la extracción ADN de túber (Tub) e inflorescencia (Inf) y *Baccharis sp.* (Bac) de *O. subterraneum* realizada con el método del CTAB suplementado con PVP. Se indica la cantidad de muestra inicial en gramos.

4.2 Selección de los marcadores moleculares

En primera instancia, fue necesario seleccionar los genes a estudiar, ya que es importante que reúnan ciertos requisitos. Por ejemplo, las regiones bajo estudio deben tener un tamaño apropiado para ser amplificadas por PCR y para que la información que proveen sea suficiente (tamaño deseable: 500-1500 pb), que posean regiones conservadas en los extremos para que los cebadores hibriden eficientemente y que existan datos comparativos de otras angiospermas para poder analizar la evolución de los mismos. Dado que se han secuenciado los genomas mitocondriales completos de diversas angiospermas pero ninguna perteneciente a organismos de la familia Balanophoraceae o del orden Santalales, realizamos una búsqueda en Genbank de las secuencias disponibles correspondientes a estos linajes para aquellos genes que reunían el resto de las condiciones de selección (Tabla 4.1). Para conocer las relaciones evolutivas de *Ombrophytum* y corroborar la identificación de la especie bajo estudio, seleccionamos el marcador molecular que ha sido utilizado mayoritariamente en estos linajes, el gen nuclear ADNr 18S (Tabla

4.1). En cuanto a las secuencias cloroplastídicas, los genes con mayores datos comparativos en las bases de datos son *rbcL* y *matK*, ambos son ampliamente utilizados en análisis taxonómicos. El gen *rbcL* codifica la subunidad mayor de la enzima Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxidasa (Rubisco) y *matK* codifica una proteína involucrada en la maduración del ARN. Sin embargo, ninguna secuencia cloroplastídica de la familia Balanophoraceae está disponible en Genbank.

Respecto a los genes mitocondriales, solo existen secuencias de los genes *atp1* y *cox1* para el género *Ombrophytum* dentro de la familia Balanophoraceae (Tabla 4.1). Aunque dichos genes estaban disponibles para la holoparásita bajo estudio, se desconoce la variabilidad intraespecífica que pudiera existir y decidimos analizar estos dos genes en los dos ejemplares de *O. subterraneum* que recolectamos. De los restantes genes mitocondriales, seleccionamos algunos de los que cumplieran con el resto de las condiciones nombradas anteriormente. Todos, menos *rpl5*, codifican diversas proteínas relacionadas con la respiración celular, mientras que el gen *rpl5* codifica una proteína ribosomal (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Disponibilidad de secuencias en las bases de datos públicas de géneros pertenecientes al orden Santalales y a la familia Balanophoraceae hasta junio 2015.

Genes	Número de géneros de Santalales disponibles en GenBank	Número de géneros de Balanophoraceae s. str. disponibles en GenBank
<i>ADNr 18S</i>	25	5 (<i>Balanophora</i> , <i>Corynaea</i> , <i>Helosis</i> , <i>Ombrophytum</i> , <i>Scybalium</i>)
<i>atp1</i>	14	1 (<i>Ombrophytum</i>)
<i>cox1</i>	4	1 (<i>Ombrophytum</i>)
<i>atp8</i>	1	0
<i>ccmC</i>	0	0
<i>Cob</i>	0	0
<i>rpl5</i>	0	0
<i>matK</i>	0	0
<i>rbcL</i>	0	0

Quisieramos además remarcar que la escasez de datos mitocondriales y cloroplastídicos disponibles de la familia Balanophoraceae y también del orden Santalales resalta la importancia de generar información nueva de linajes cuya evolución y particularidades son aún desconocidas.

En la base de datos de GenBank, no se encontraron secuencias de especies de *Baccharis*, de los genes en estudio.

4.3 Amplificación de genes por PCR, secuenciación y análisis

Para amplificar los genes mitocondriales, cloroplastídicos y nucleares se utilizaron cebadores específicos como se indica en Materiales y Métodos. En *Ombrophytum*, para 8 de los 9 genes en estudio se logró la amplificación de fragmentos que fueron del tamaño esperado. No se obtuvieron bandas dobles o de tamaño heterogéneo. Del gen cloroplastídico *matK* no se obtuvo amplificación, a pesar de repetir en varias oportunidades la PCR correspondiente, con diferentes concentraciones de ADN y de los dos ejemplares. Estos resultados negativos pueden deberse a diferencias en la secuencia de *matK* en *Ombrophytum* o la ausencia total de dicho gen en la parásita.

En *Baccharis sp.*, se amplificaron los seis genes mitocondriales y el gen nuclear. Los siete fragmentos que resultaron de estas PCR, fueron del tamaño esperado. No se realizaron las reacciones de PCR correspondientes a los genes cloroplastídicos, al tener resultados negativos en la especie holoparásita.

Los productos de amplificación obtenidos de la planta parásita *O. subterraneum* y su hospedador *Baccharis sp.* fueron purificados y secuenciados mediante el método de Sanger con Applied Biosystem 3730XL. Las secuencias fueron ensambladas y editadas con Sequencher 4.8, donde se evaluó la calidad de las mismas.

Para el gen *rbcl*, se obtuvo un producto de amplificación de un tamaño aproximado a lo esperado, en uno de los ejemplares de *Ombrophytum*. La secuenciación del producto del gen *rbcl*, tuvo una similitud del 99% con *Vittadinia australis* (KT626797). Esta especie pertenece a la misma tribu que la planta hospedadora *Baccharis sp.* de la cual no hay datos del gen *rbcl* en la base de datos de GenBank. Por esto, se infiere que la secuencia de *rbcl* amplificada en

Ombrophytum probablemente provenga del hospedador ya sea por contaminación de la muestra del parásito con tejido del hospedador o por THG del hospedador al parásito. Repeticiones posteriores de la PCR del gen *rbcL* en ambos ejemplares de *O. subterraneum* dieron resultados negativos, sugiriendo que la secuencia obtenida fue el resultado de contaminación.

De las restantes amplificaciones se generaron 20 nuevas secuencias de buena calidad correspondientes a 6 genes mitocondriales y a un gen nuclear, de *O. subterraneum* y *Baccharis sp.* Las secuencias de genes mitocondriales (*atp1*, *atp8*, *ccmC*, *cob*, *cox1* y *rpl5*) obtenidas de dos ejemplares de *O. subterraneum* en paralelo resultaron idénticas. Por ello, se utilizó solo una de ellas para los análisis posteriores.

Para realizar los estudios comparativos y evolutivos de cada una de las secuencias editadas se realizó una búsqueda de secuencias homólogas provenientes de otras angiospermas en la base de datos de GenBank, mediante Blast. Se seleccionó una secuencia de cada género, presente en la base de datos pública hasta el mes de Junio del 2015. Al utilizarse las secuencias presentes en la base de datos GenBank (NCBI), para realizar los alineamientos múltiples, la cantidad de secuencias seleccionadas varía según el gen (Tabla 4.2).

Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron agrupadas en archivos multifasta junto con las secuencias de la base de datos de GenBank, generando un alineamiento múltiple para cada gen (Tabla 4.2). Se conoce que el gen mitocondrial *cox1* de algunas especies, ha sufrido la inserción de un intrón por THG; para este gen se realizaron dos alineamientos. Uno de estos consiste solamente en las secuencias del intrón (alineamiento del intrón del gen *cox1*) y el otro contiene sólo las secuencias codificantes (alineamiento de los exones del gen *cox1*).

Tabla 4.2. Datos de las secuencias y alineamientos de los genes mitocondriales y nuclear.

Genes	<i>ADN 18S</i>	<i>atp1</i>	<i>atp8</i>	<i>ccmC</i>	<i>Cob</i>	<i>cox 1</i>	<i>rpl5</i>
Longitud de la secuencia de <i>O. subterraneum</i>	737 pb	1166 pb	404 pb	577 pb	949 pb	2232 pb	472 pb
Sitios de edición predichos para <i>O. subterraneum</i>	-----	5	2	29	12	31	6
Número de géneros de angiospermas incluidos en cada alineamiento	89	82	77	72	53	140	57
Longitud del alineamiento completo	1831 pb	1501 pb	577 pb	943 pb	1572 pb	2672 pb	677 pb
Sitios de edición eliminados del alineamiento completo	-----	15	6	37	22	31	12
Longitud de la secuencia de <i>Baccharis sp.</i>	812 pb	899 pb	400 pb	600 pb	938 pb	1355 pb	475 pb
Sitios de edición predichos para <i>Baccharis sp.</i>	-----	5	8	29	5	13	2

Edición de ARN

Para analizar el efecto que podrían tener los sitios de edición del ARN en los análisis filogenéticos, se construyeron alineamientos que incluían o excluían los sitios de edición. Los sitios de edición fueron predichos utilizando el programa Prep-Mt (Mower, 2005). La cantidad de sitios de edición predichos varía según el gen (Tabla 4.2).

4.4. Análisis filogenéticos

El estudio de la historia evolutiva de cada uno de los genes fue llevado a cabo mediante análisis filogenéticos. Los mismos se realizaron utilizando dos alineamientos para cada gen (con y sin sitios de edición). Los árboles filogenéticos fueron construidos bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML). Además, se realizaron análisis filogenéticos bajo el criterio de Máxima Parsimonia (MP) solamente de los alineamientos sin sitios de edición. Se obtuvieron 16 árboles filogenéticos bajo el criterio de ML y 9 árboles filogenéticos bajo el criterio de MP, basados en los alineamientos de cada gen, con los correspondientes soportes nodales obtenidos mediante el análisis de “bootstrapping” (Figuras 4.3-4.24).

En general, se observó que las secuencias de *O. subterraneum* mostraron una alta tasa de sustitución en los genes mitocondriales y en el gen nuclear analizados.

Se observó, además a *O. subterraneum* con relaciones evolutivas indefinidas, en la mayoría de los árboles filogenéticos.

4.4.1 Gen nuclear *ADNr 18S*

La secuencia correspondiente al gen *ADNr 18S* de *O. subterraneum* obtenida en este trabajo tuvo una longitud de 737 pb. En este alineamiento, no se consideraron las secuencias de los géneros *Balanophora* y *Helosis* (obtenidos de GenBank), porque sus ramas en los árboles filogenéticos son muy largas (Su *et al.*, 2015), dificultando de esta manera la ubicación y taxonomía de los demás géneros.

Cabe aclarar que los genes nucleares de angiospermas no poseen sitios de edición. Para el gen nuclear *ADNr 18S* se obtuvieron dos árboles filogenéticos uno realizado bajo el criterio de ML (Figura 4.3) y otro bajo el criterio de MP (Figura 4.4). Dichos árboles presentaron diferencias entre sí y varias similitudes. En ambos análisis, la planta hospedadora *Baccharis* sp. se ubicó dentro del orden Asterales que forman un grupo monofilético, con un alto soporte de bootstrap (100%). Además, la secuencia de *O. subterraneum* obtenida, resultó ser hermana de la secuencia del *O. subterraneum* presente en GenBank con un fuerte soporte de bootstrap (BS=100%) y se encontró formando un clado con géneros de la familia Balanophoraceae *s. str.* con alto soporte de bootstrap (BS=99%). Las secuencias de *O. subterraneum* difieren en 1 nucleótido y 4 indels de 1 nucleótido cada uno. El largo de las ramas de los taxa de la familia Balanophoraceae *s. str.* indicó que tienen una alta tasa de sustitución.

En cuanto a las diferencias observadas, en el árbol de ML (Figura 4.3) la familia Balanophoraceae *s. str.* se encontró separada del resto de los miembros del Orden Santalales (inclusive lejos de la familia Mystropealaceae – previamente considerada Balanophoraceae), aunque sin apoyo estadístico. En cambio, en el árbol de MP (Figura 4.4), se observó a todos los taxa del Orden Santalales formando un grupo monofilético con bajo soporte de bootstrap (BS=57%). Dentro del Orden Santalales, la familia Balanophoraceae *s. str.* se encontró separada de la familia Mystropealaceae.



Figura 4.3. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen nuclear *ADNr 18S*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

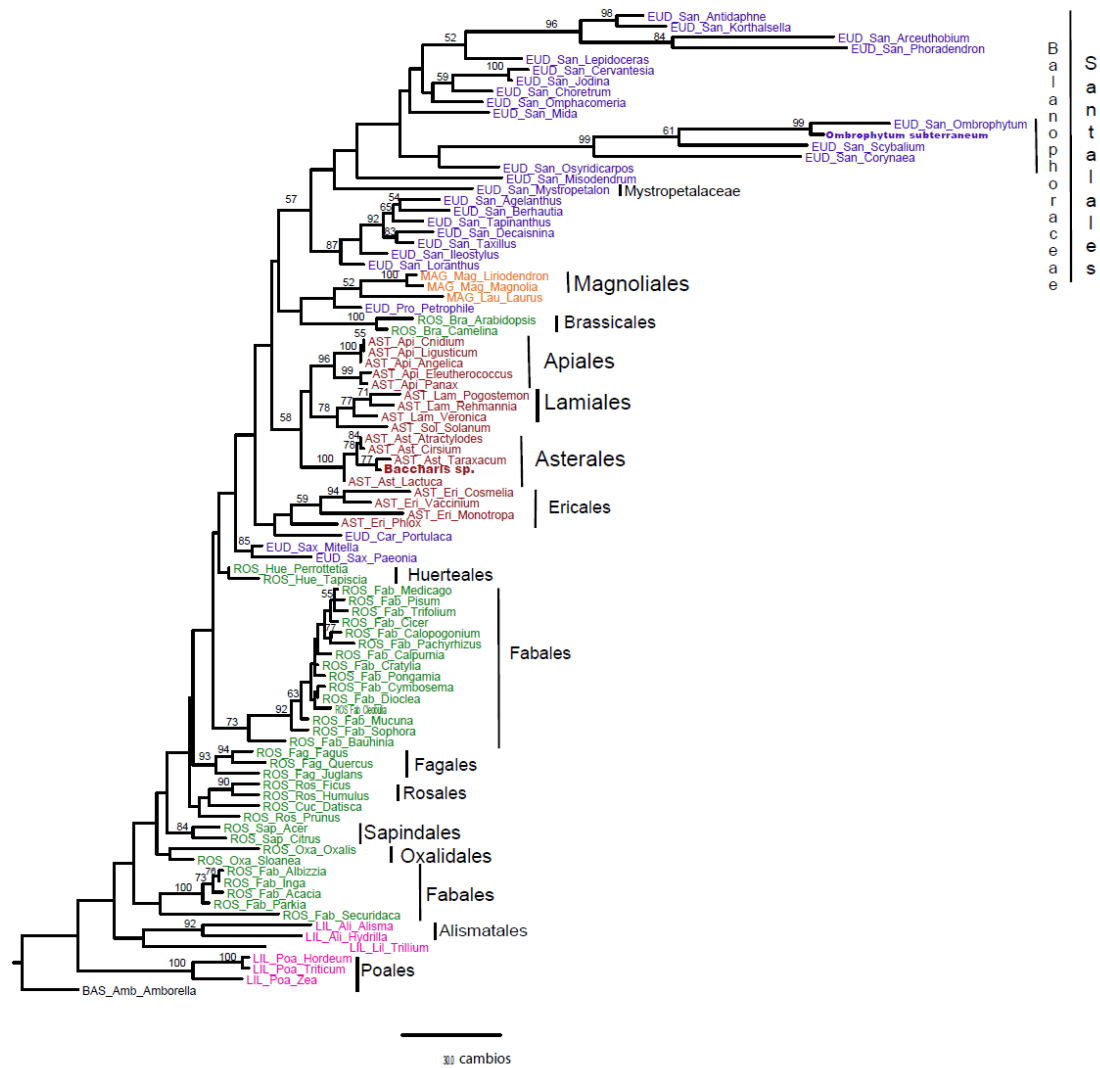


Figura 4.4. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el gen nuclear *ADNr 18S*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.4.2 Gen mitocondrial *atp1*

La secuencia del gen *atp1* de *O. subterraneum* obtenida en este trabajo tiene una longitud de 1.166 pb, donde se predijeron 5 sitios de edición (Tabla 4.2). La evolución del gen *atp1* fue evaluada con y sin los sitios de edición.

Para el primer análisis, se eliminaron 15 sitios de edición del alineamiento completo (Tabla 4.2). Los análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud (Figura 4.5) y Máxima Parsimonia (Figura 4.6) para el gen *atp1* sin sitios de edición fueron idénticos. La secuencia de *O. subterraneum*, obtenida en este trabajo fue hermana de la secuencia de *O. subterraneum* presente en Genbank (BS=100%). Las secuencias de *O. subterraneum* se diferencian en 2 nucleótidos. *O. subterraneum* es hermana de especies de Cucurbitales pero sin apoyo estadístico significativo (BS<50%). El resto de las especies del Orden Santalales se observaron formando dos grupos, ninguno relacionado con *O. subterraneum*. La secuencia de *Baccharis* fue hermana de *Helianthus* (BS=100%); ambos géneros se agruparon dentro de la familia Asteraceae. El resto de sus relaciones filogenéticas no tuvieron apoyo de bootstrap significativo.

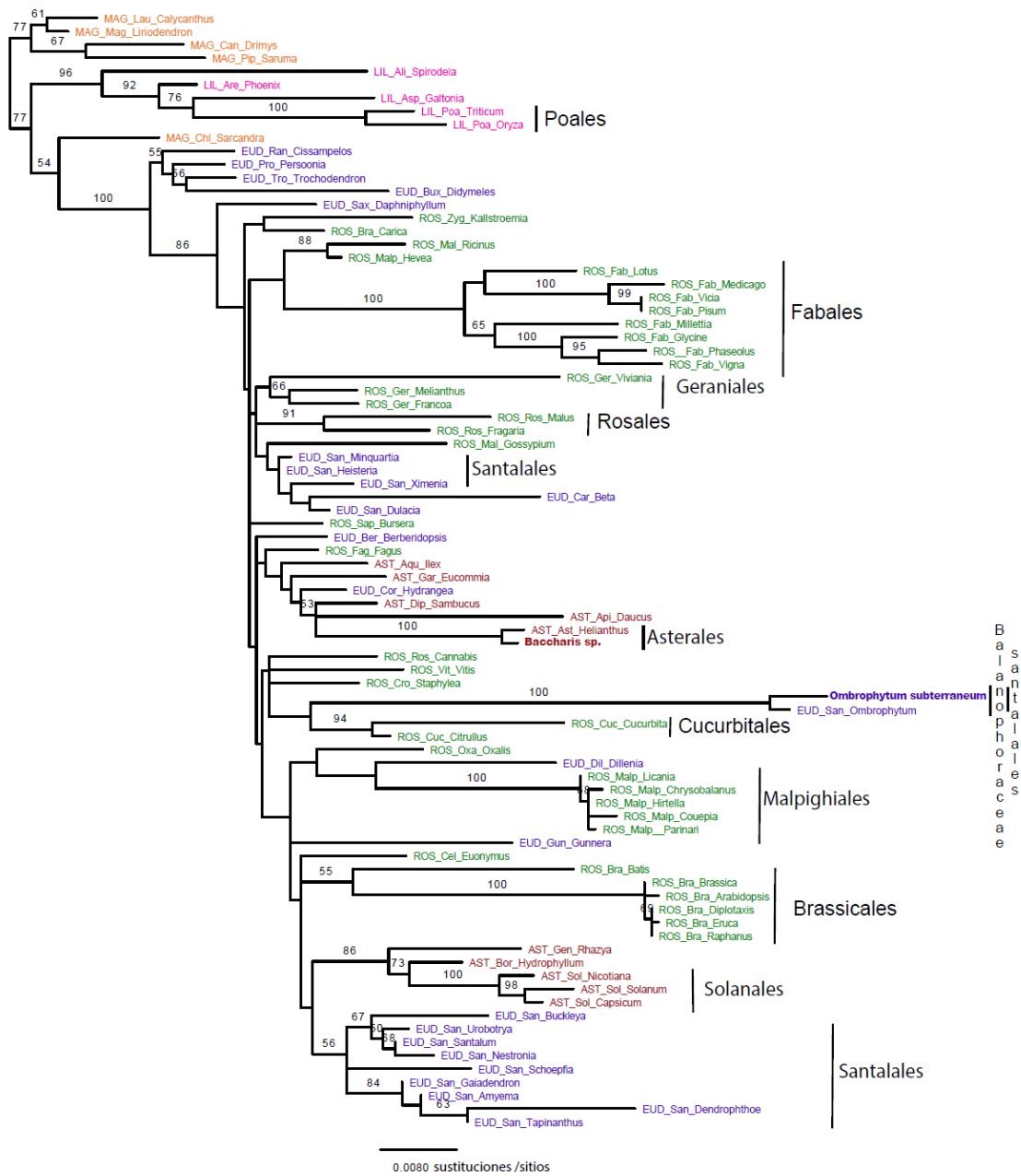


Figura 4.5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *atp1*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas).

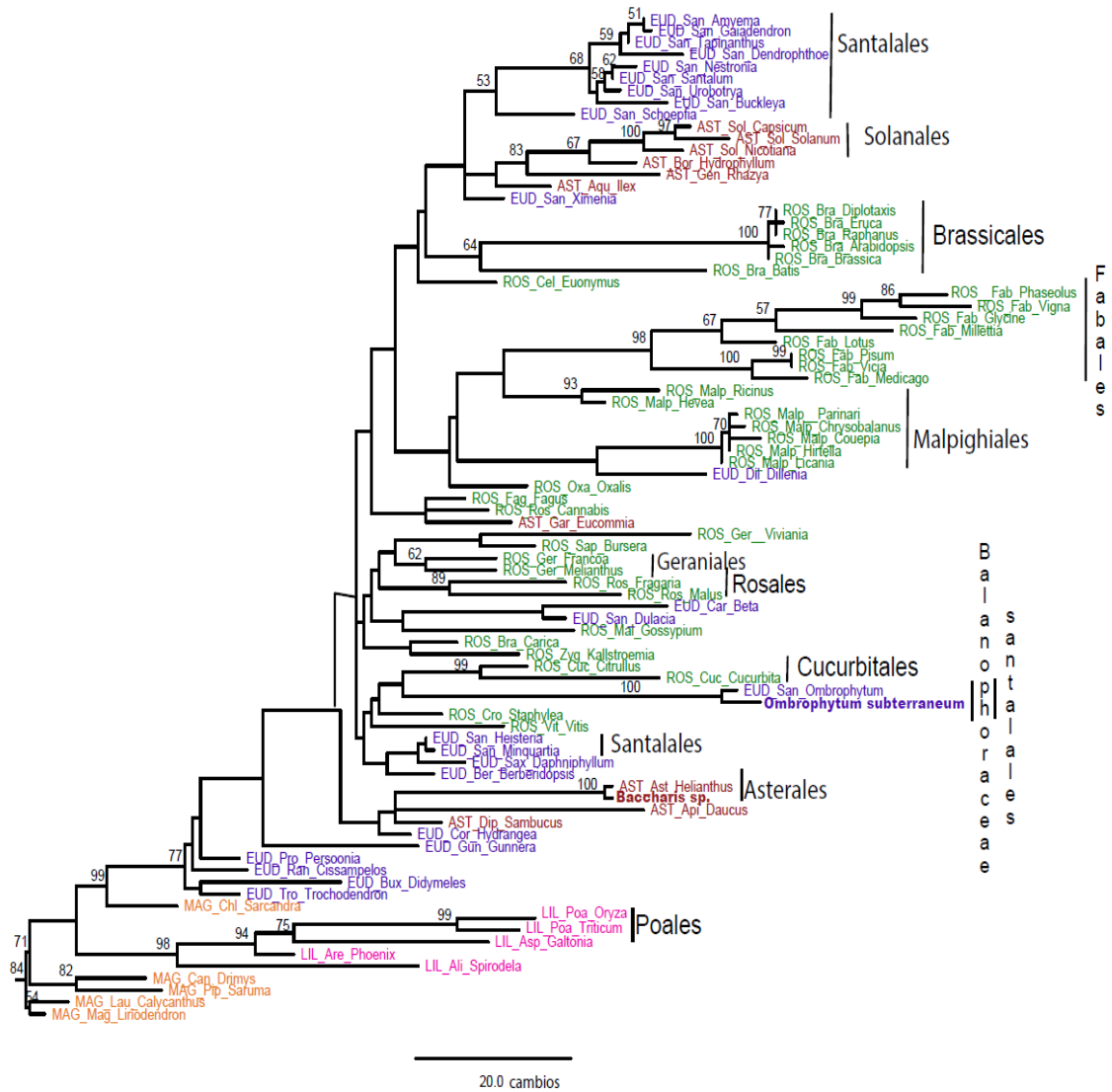


Figura 4.6. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el gen mitocondrial *atp1*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas).

Cuando se realizaron los análisis filogenéticos de ML incluyendo los sitios de edición (Figura 4.7), se observaron las mismas relaciones de *O. subterraneum* y *Baccharis sp.* respecto a los demás taxa del árbol, comparado a los árboles sin sitios de edición. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en la ubicación de los miembros del Orden Santalales, aunque sin soporte de bootstrap.

En ambos árboles de Máxima Verosimilitud (Figura 4.5 y 4.7), se observó que las ramas que sostienen las secuencias de *O. Subterraneum*, son muy largas, indicando alta tasa de sustitución.

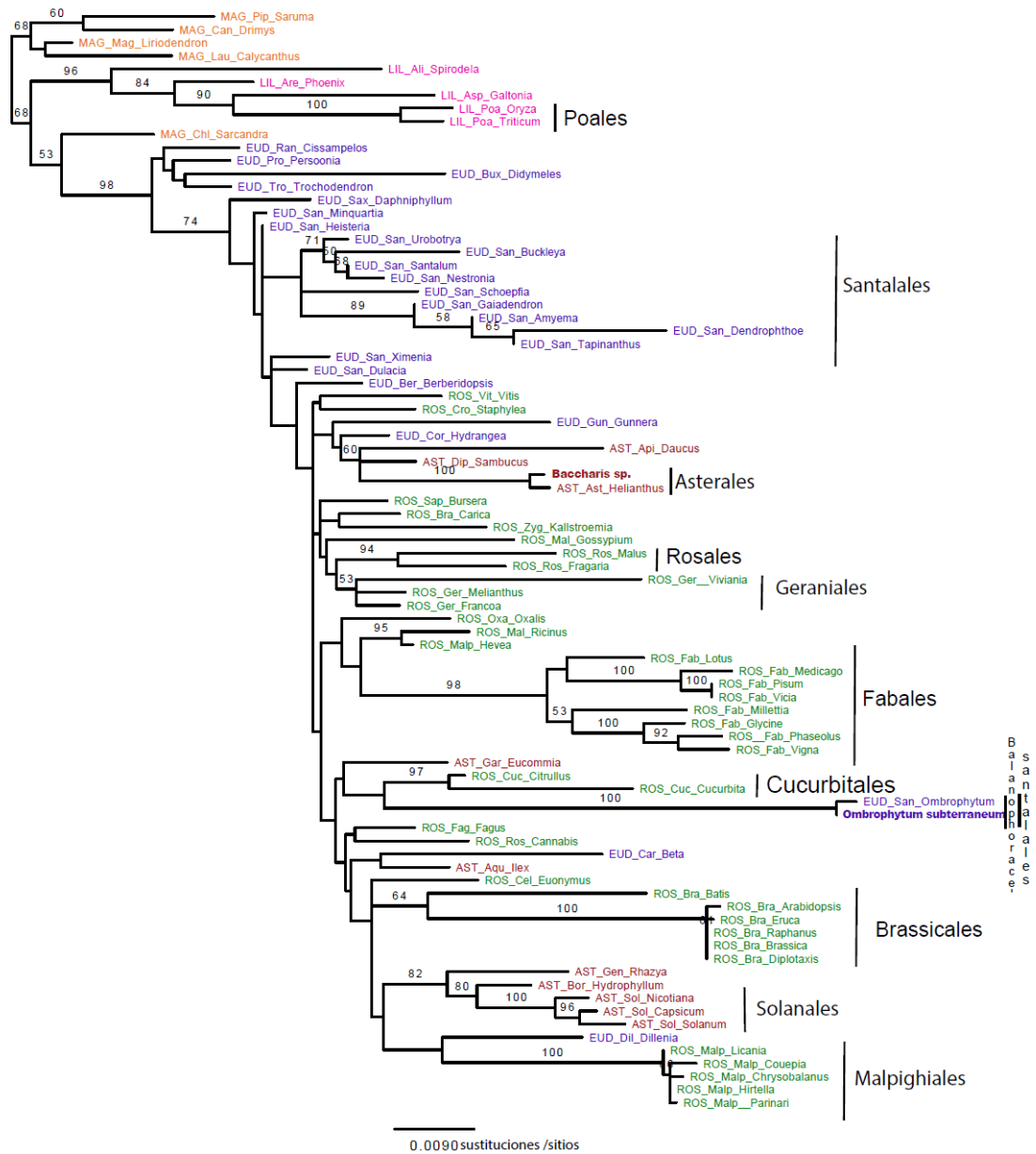


Figura 4.7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *atp1*. Con sitios de edición. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas).

4.4.3 Gen mitocondrial *atp8*

La secuencia obtenida del gen mitocondrial *atp8* de *O. subterraneum* tuvo una longitud de 404 pb y se predijeron 2 sitios de edición. Se realizaron análisis filogenéticos con el alineamiento completo y luego se eliminaron 6 sitios de edición del alineamiento (Tabla 4.2). Los tres árboles filogenéticos (Figuras 4.8-4.10) no presentaron diferencias. Se observó a *O. subterraneum* (único representante de Balanophoraceae) como hermano de las especies del Orden Rosales pero sin apoyo de bootstrap (BS<50%). En los árboles, además, se incluyó un género perteneciente al Orden Santalales (*Comandra*), el cual no se relacionó con *O. subterraneum*. La secuencia de *Baccharis* fue hermana del linaje que incluye a los géneros *Lactuca* y *Tragopogon* (Asteraceae); y a su vez los tres géneros se agrupan cómo hermanos de *Helianthus* (BP= 100%). De esta manera la familia Asteraceae se presenta como un grupo monofilético.

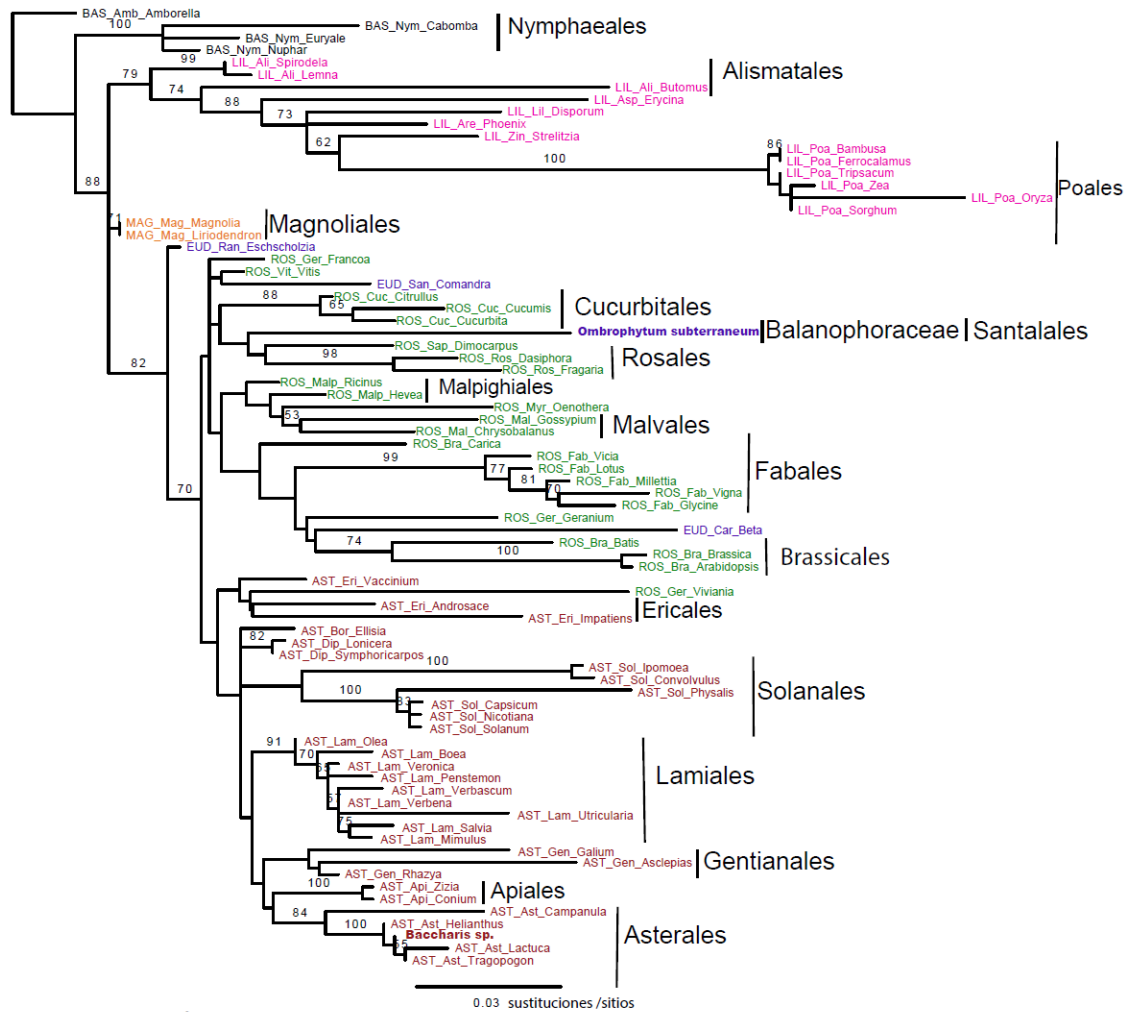


Figura 4.8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *atp8*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

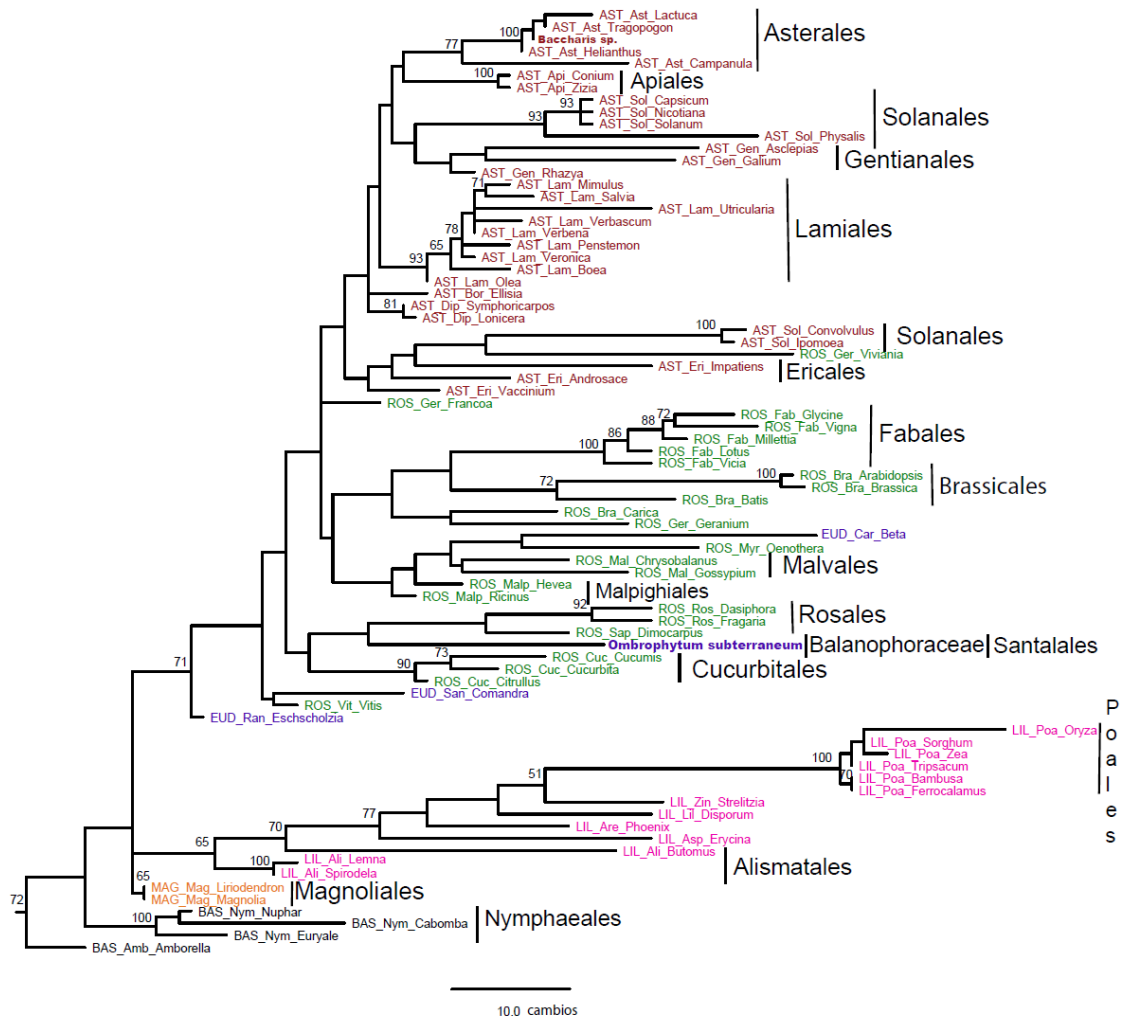


Figura 4.9. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el gen mitocondrial *atp8*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).



Figura 4.10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *atp8*. Con sitios de edición. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.4.4 Gen mitocondrial *ccmC*

La secuencia obtenida del gen *ccmC* de *O. subterraneum* tuvo una longitud de 577 pb con 29 sitios de edición (Tabla 4.2). En las secuencias del alineamiento completo se predijeron 37 sitios de edición (Tabla 4.2). Los árboles filogenéticos correspondientes al gen *ccmC* sin sitios de edición de ML (Figura 4.11) y MP (Figura 4.12) no mostraron diferencias marcadas. Se observó a *Baccharis* como hermana de *Helianthus* (ambas Asteraceae, agrupando a la familia) con soporte estadístico bajo (BS=51% en el árbol de MP). Por otro lado, la secuencia de *ccmC* de *O. subterraneum* (único representante de Balanophoraceae y Santalales) es hermana de estas dos Asteraceae con el máximo apoyo (BS=100%).

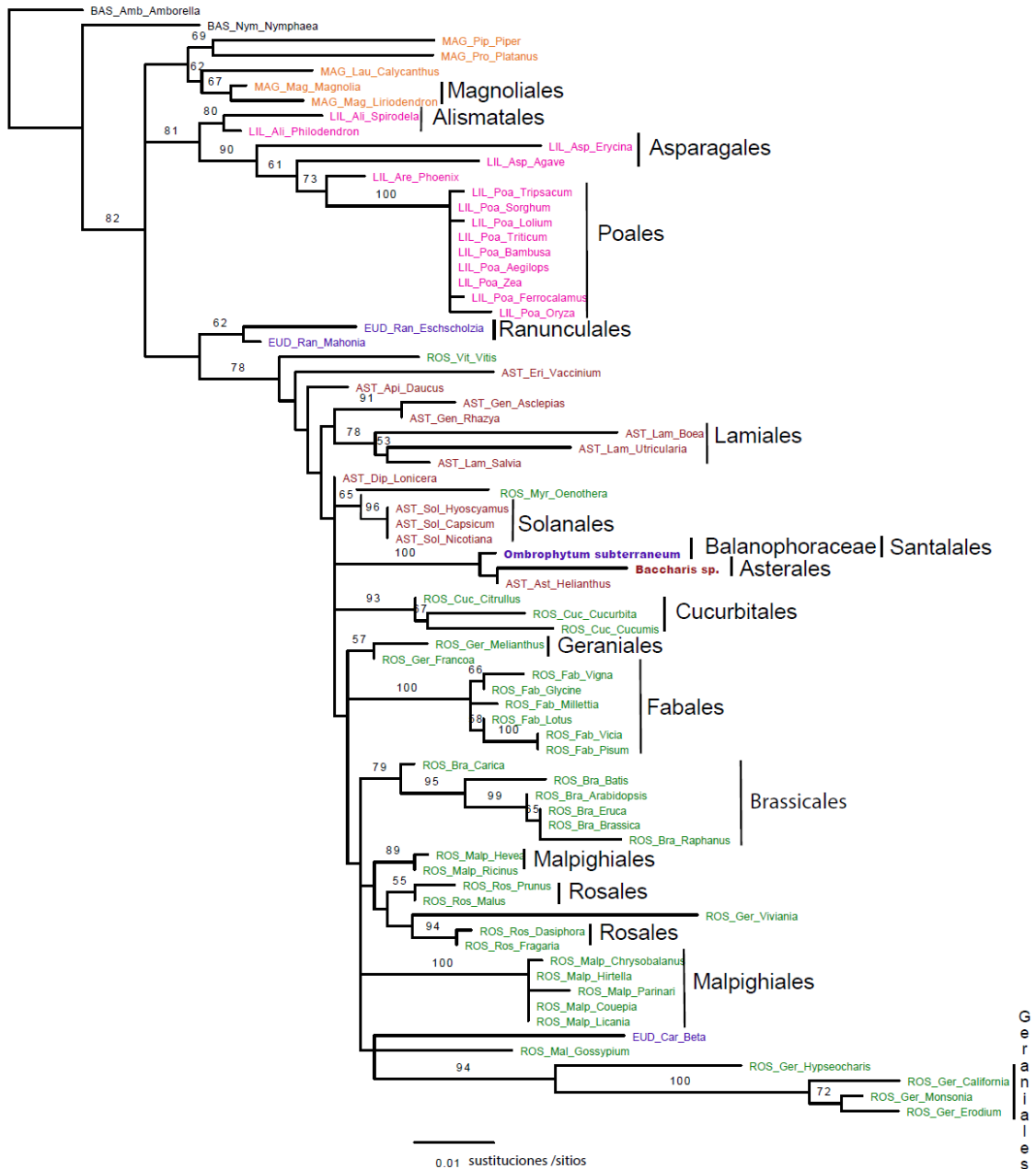


Figura 4.11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *ccmC*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

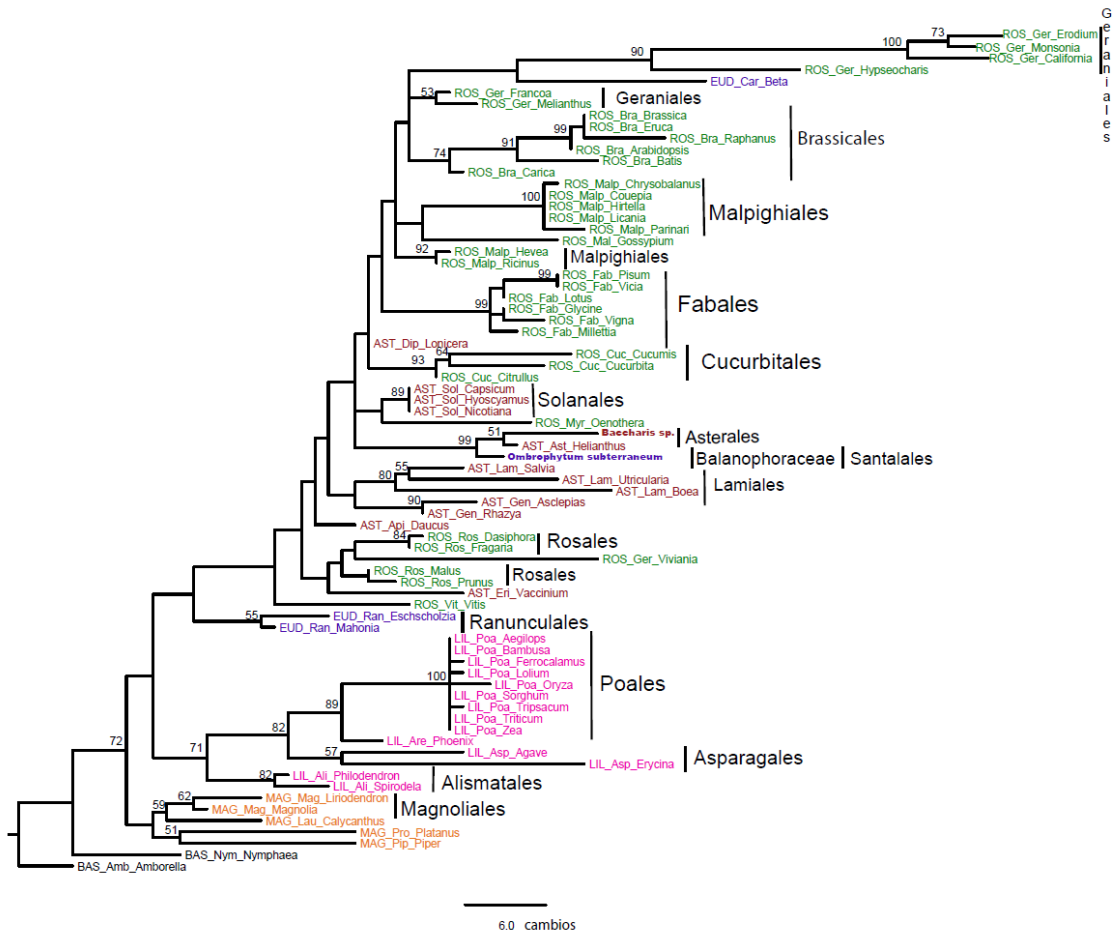


Figura 4.12. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el gen mitocondrial *ccmC*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

En el árbol de ML con sitios de edición (Figura 4.13), se observó una pequeña variación con respecto a los árboles sin sitios de edición. La secuencia de *O. subterraneum* fue hermana de *Helianthus* (Asteraceae) con apoyo significativo (61%); y *Baccharis* fue hermana de este clado con el máximo apoyo (BS=100%).

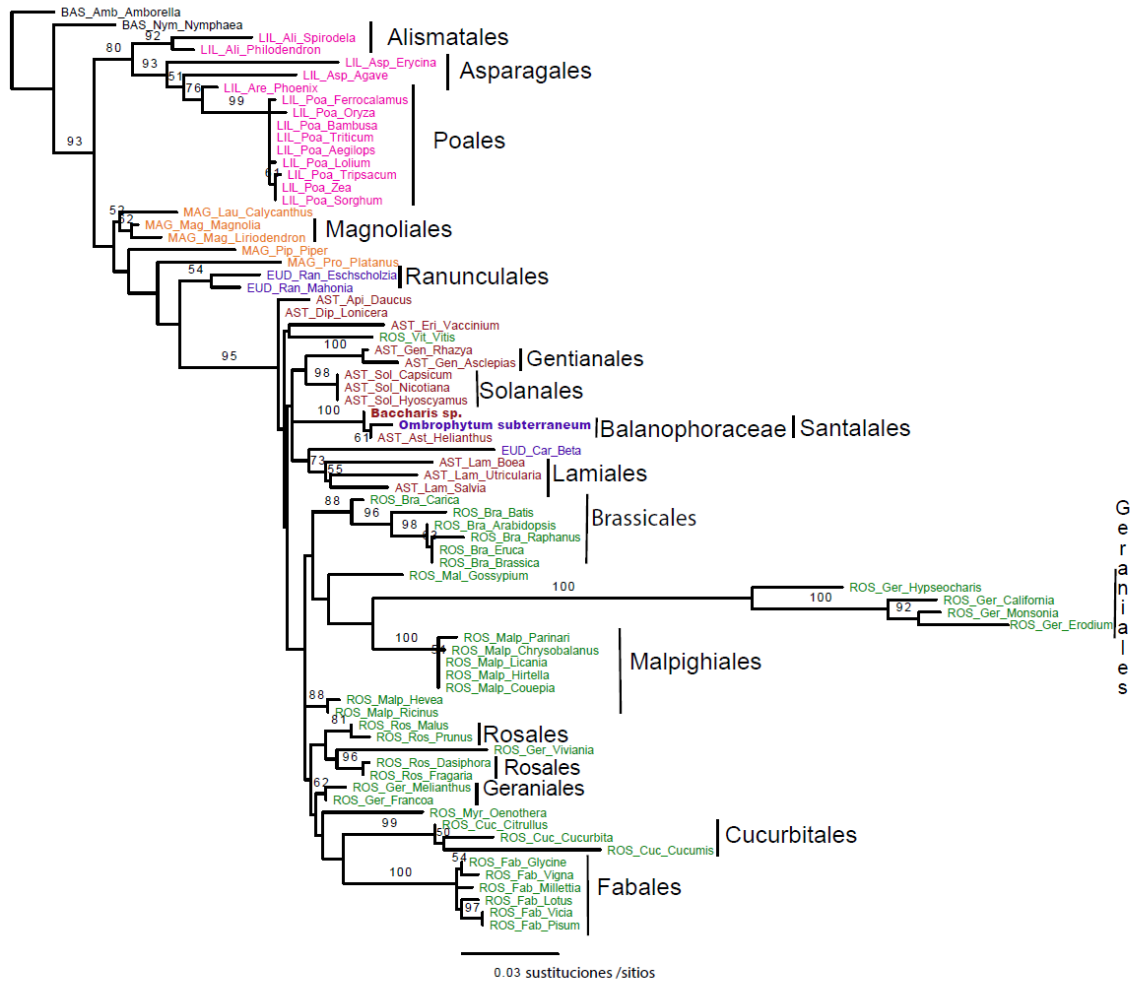


Figura 4.13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *ccmC*. Con sitios de edición. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.4.5 Gen mitocondrial *cob*

La secuencia obtenida correspondiente al gen *cob* de *O. subterraneum* tuvo una longitud de 949 pb incluyendo 12 sitios de edición (Tabla 4.2). En el alineamiento completo se predijeron 22 sitios de edición (Tabla 4.2). Los árboles filogenéticos de ML del gen *cob* sin y con sitios de edición (Figura 4.14 y Figura 4.15) presentaron diferencias entre sí y varias similitudes. En ambos análisis, se observó que *O. subterraneum* (único representante de Balanophoraceae y Santalales) fue hermano de las Asterids pertenecientes a los órdenes Ericales, Asterales, Apiales y Dipsacales, pero con apoyo de bootstrap menor al 50%. En ese clado de Asterids, se encontró a *Baccharis* como hermana de *Helianthus* (ambas Asteraceae), con alto apoyo estadístico (BS= 95% en el árbol de ML sin sitios de edición). El largo de la rama que sostiene a *O. subterraneum* sugiere una alta tasa de sustitución.

Una diferencia marcada, que se observó en ambos árboles son las ubicaciones y las relaciones filogenéticas de los géneros: *Calycanthus* y *Vaccinium* que pertenecen a dos grupos muy distantes de angiospermas: Magnoliids y Asterids, respectivamente. En el árbol sin sitios de edición (Figura 4.14), los géneros no están relacionados directamente. Sin embargo, en el árbol con sitios de edición (Figura 4.15), ambos géneros se presentan inesperadamente como hermanos con bootstrap de 68%. Esto es debido a que las secuencias de los dos géneros han perdido de forma paralela todos sus sitios de edición excepto uno. Es decir, que comparten numerosas timinas en aquellos sitios en que sus hermanas poseen citosinas que requieren ser editadas. Dichas timinas son homoplasias que hacen que los géneros se observen incorrectamente como hermanos en el árbol con sitios de edición (Figura 4.15). Es por ello que se suele recomendar excluir los sitios de edición previo a los análisis filogenéticos (Bowe *et al.*, 1996 Hiesel *et al.*, 1994).

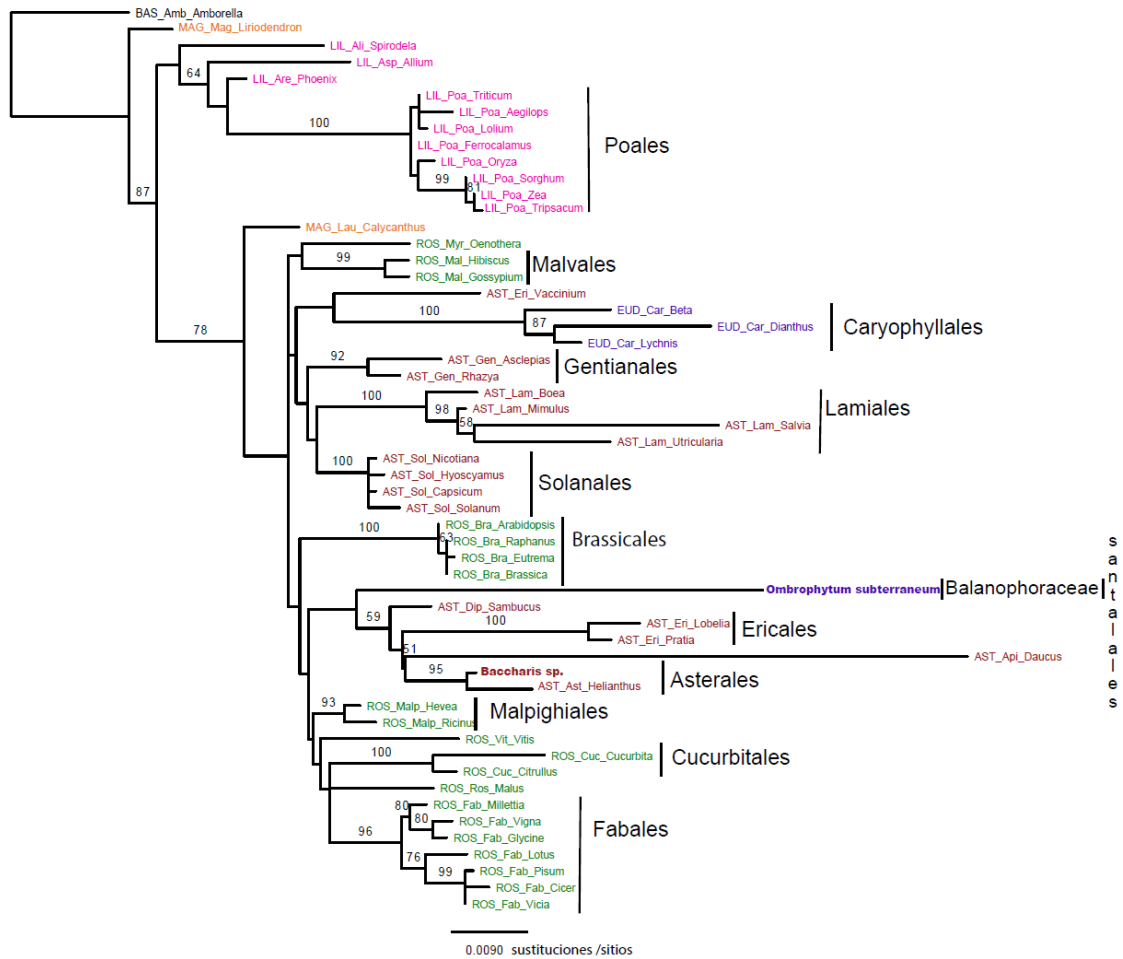


Figura 4.14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *cob*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

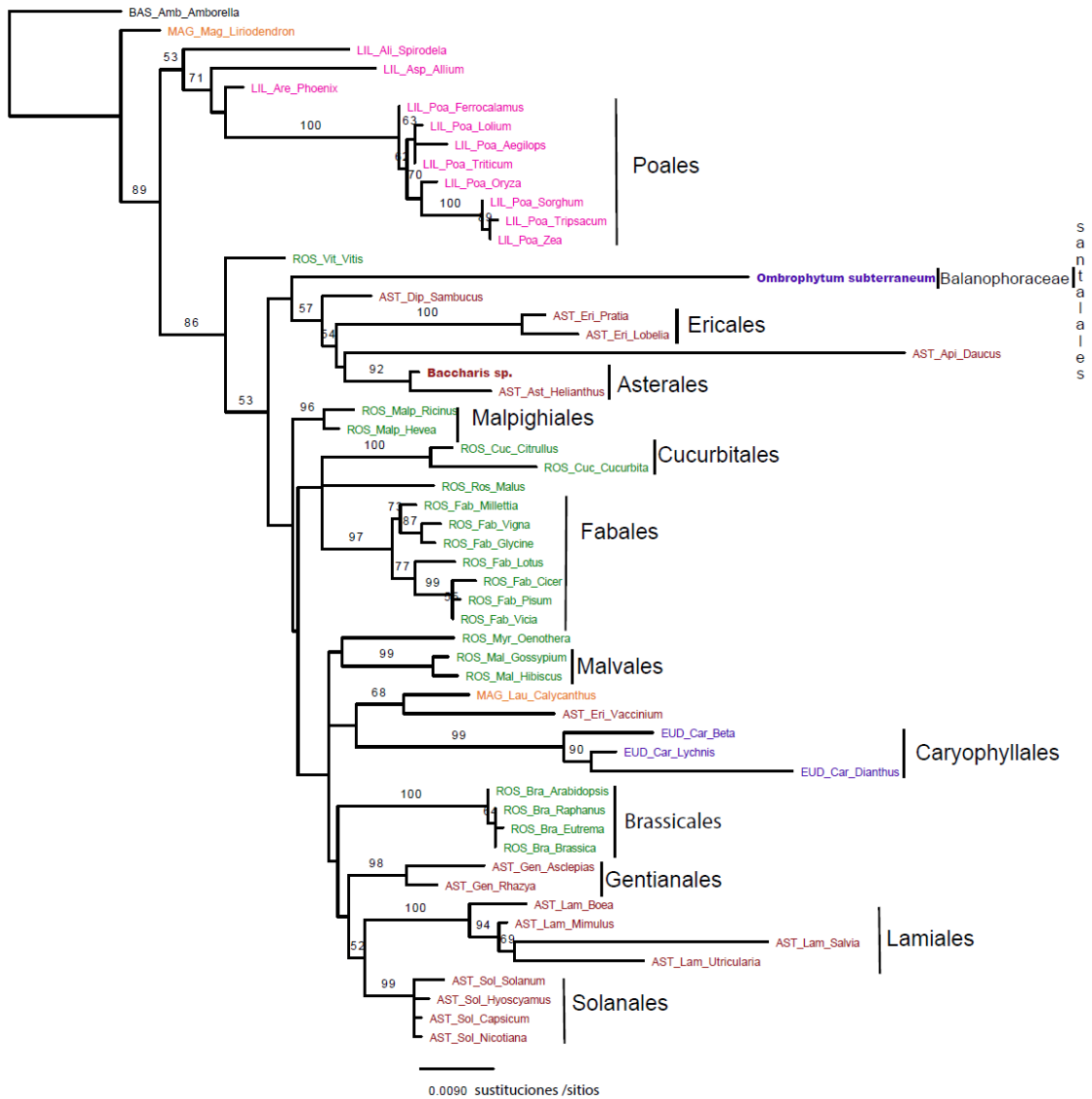


Figura 4.15. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *cob*. Con sitios de edición. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

En el árbol de MP (Figura 4.16), se observó que *O. subterraneum* (único representante de Balanophoraceae y Santalales) fue hermano de las Asterids pertenecientes a los órdenes Ericales, Asterales, Apiales y Dipsacales, pero con apoyo de bootstrap menor al 50%. En ese clado de Asterids, se encontró a *Baccharis* como hermana de *Helianthus* (ambas Asteraceae), con alto apoyo estadístico (BS= 81%). A diferencia de los árboles de ML, en este árbol los grandes grupos Asterids y Rosids, se encuentran bien diferenciados y no mezclados como se observan en los árboles de ML.

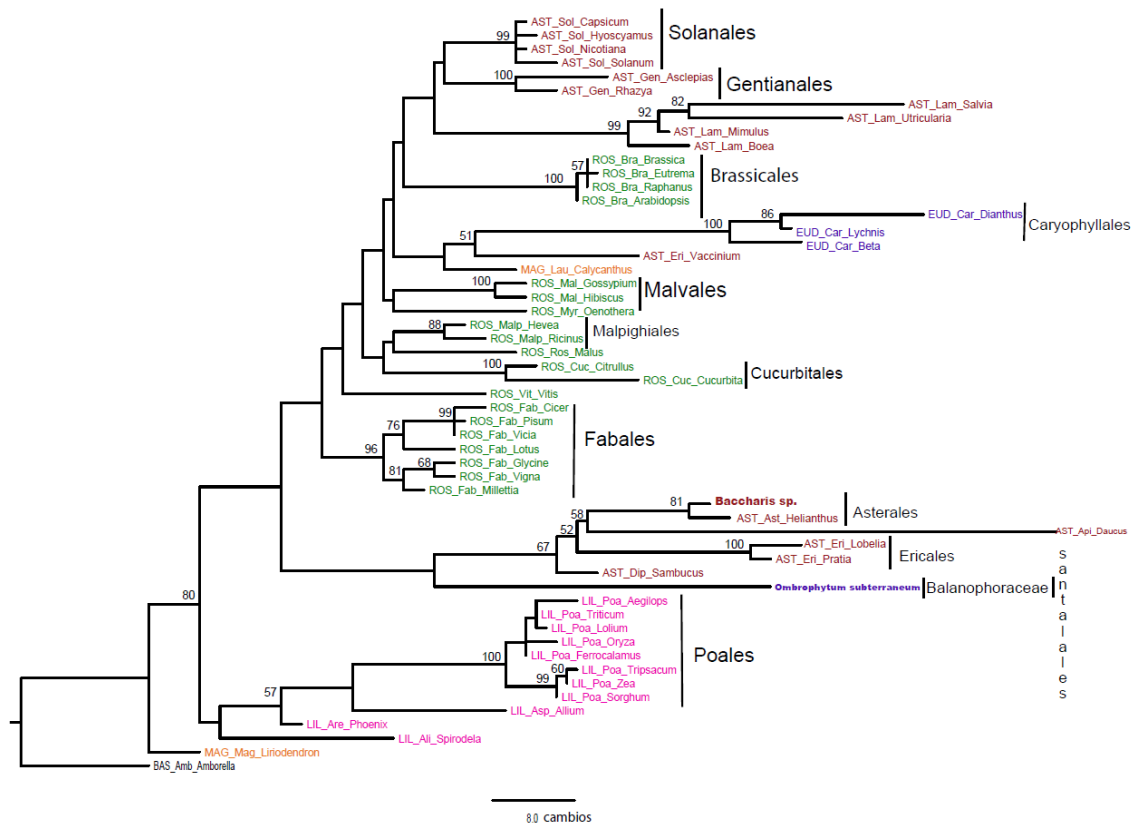


Figura 4.16. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el gen mitocondrial *cob*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.4.6 Gen mitocondrial *rpl5*

La longitud de la secuencia obtenida para al gen *rpl5* de *O. subterraneum* fue de 472 pb, con 6 sitios de edición (Tabla 4.2). Del alineamiento completo se predijeron 12 sitios de edición (Tabla 4.2). Los árboles filogenéticos de las secuencias sin sitios de edición tanto el de ML (Figura 4.17) como el de MP (Figura 4.18) o del alineamiento completo con sitios de edición (Figura 4.19), no presentaron diferencias. Se observó a *O. subterraneum* (único representante de Balanophoraceae y Santalales) como hermano de las especies del Orden Malpighiales con apoyo de bootstrap menor al 50%. *Baccharis* sp. se encontró como hermana de *Helianthus* con bootstrap máximo (BS= 100%), ambas de la familia Asteraceae.

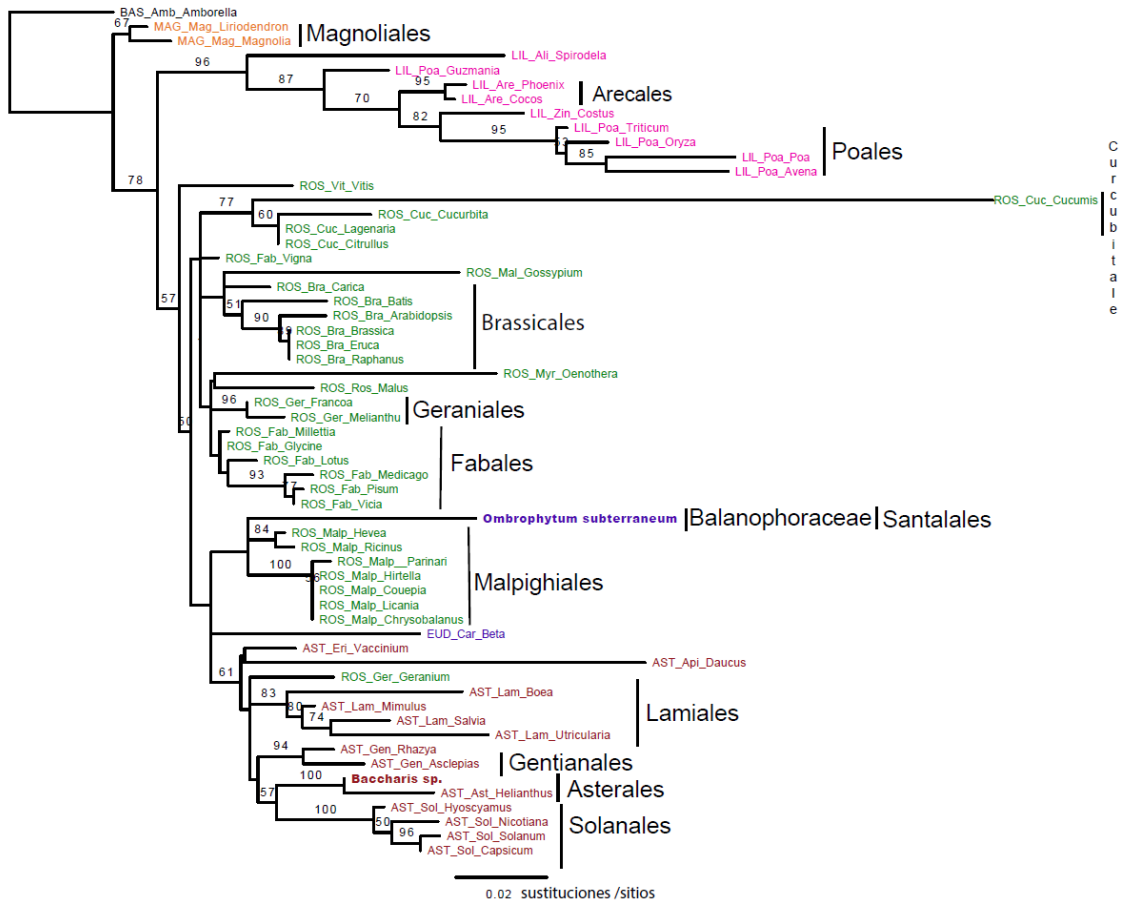


Figura 4.17. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *rpl5*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

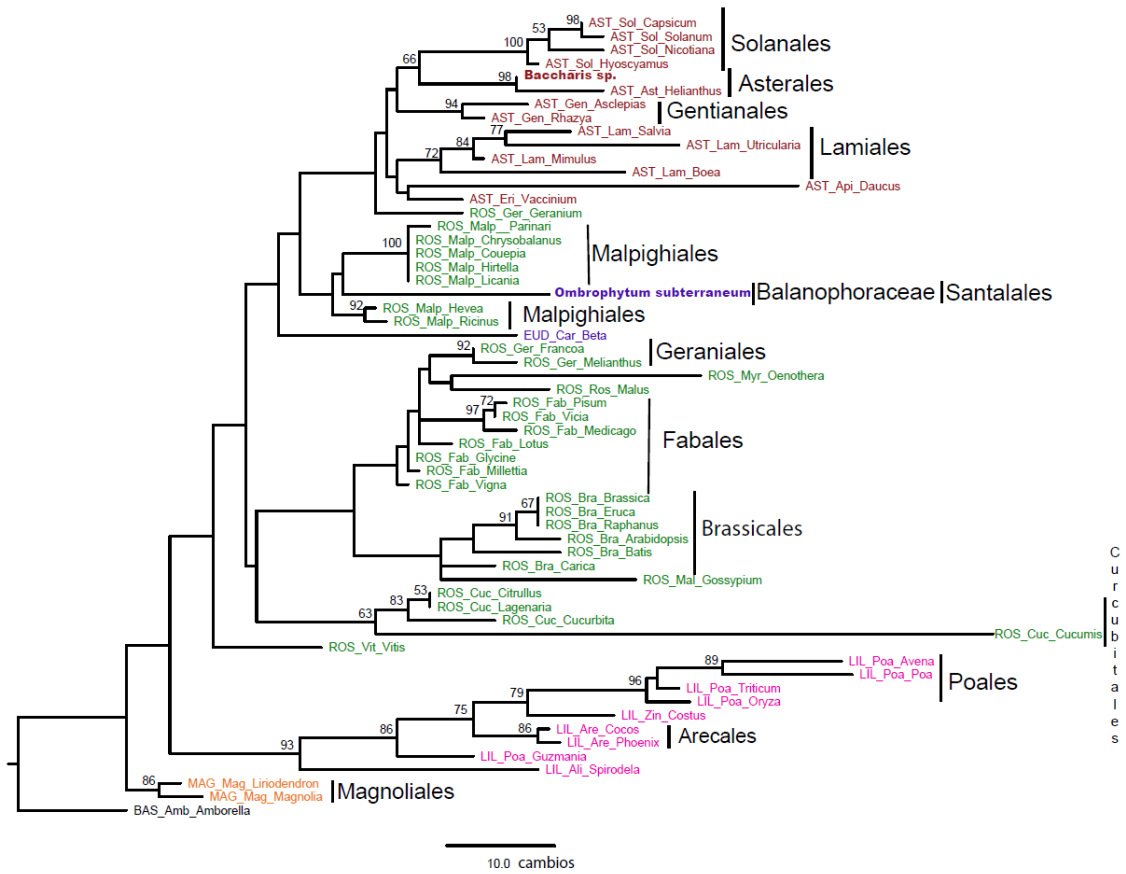


Figura 4.18. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el gen mitocondrial *rpl5*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

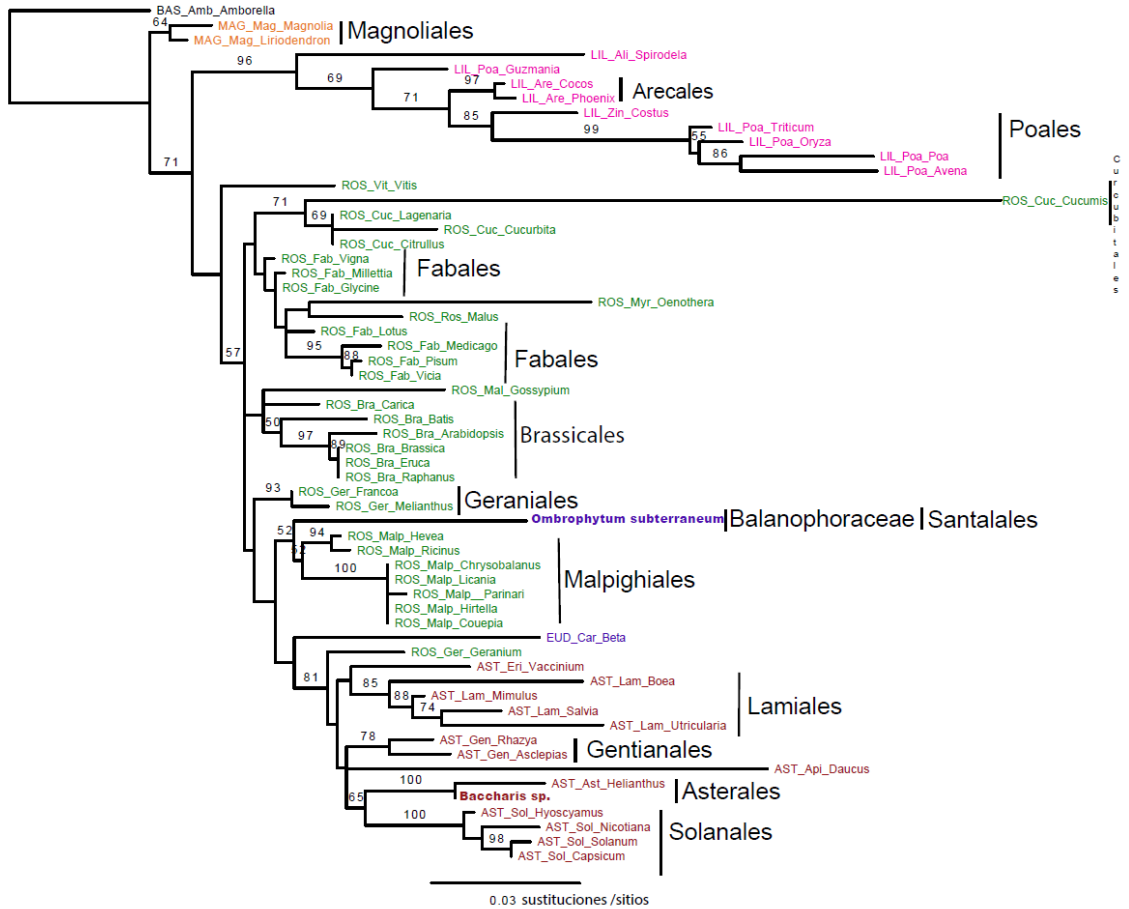


Figura 4.19. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen mitocondrial *rpl5*. Con sitios de edición. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.4.7 Gen mitocondrial *cox1*

4.4.7.1 Intrón del gen *cox1*

La secuencia del intrón del gen mitocondrial *cox1* tiene un tamaño de 1030 pb (Tabla 4.2). Para estas secuencias se realizaron sólo dos análisis filogenéticos (ya que el intrón del gen no presenta sitios de edición): uno de ML (Figura 4.20) y otro de MP (Figura 4.21). Dichos árboles no presentan diferencias entre sí. En los árboles la secuencia de *O. subterraneum* obtenida en el presente trabajo, resultó hermana de la secuencia de *Ombrophytum* extraída de GenBank con un fuerte soporte de bootstrap (100%). Las secuencias de *O. subterraneum* no presentan diferencias entre sí. Ambas secuencias son hermanas de la secuencia de *Lophophytum mirabile*, miembro de la familia Balanophoraceae, con un bootstrap de 98%. La rama que sostiene las dos secuencias de *Ombrophytum* es larga, indicando una alta tasa de sustitución.

La secuencia del gen *cox1* de *Baccharis sp.* obtenida en el presente trabajo, no presenta el intrón y por eso no está incluida en el análisis.

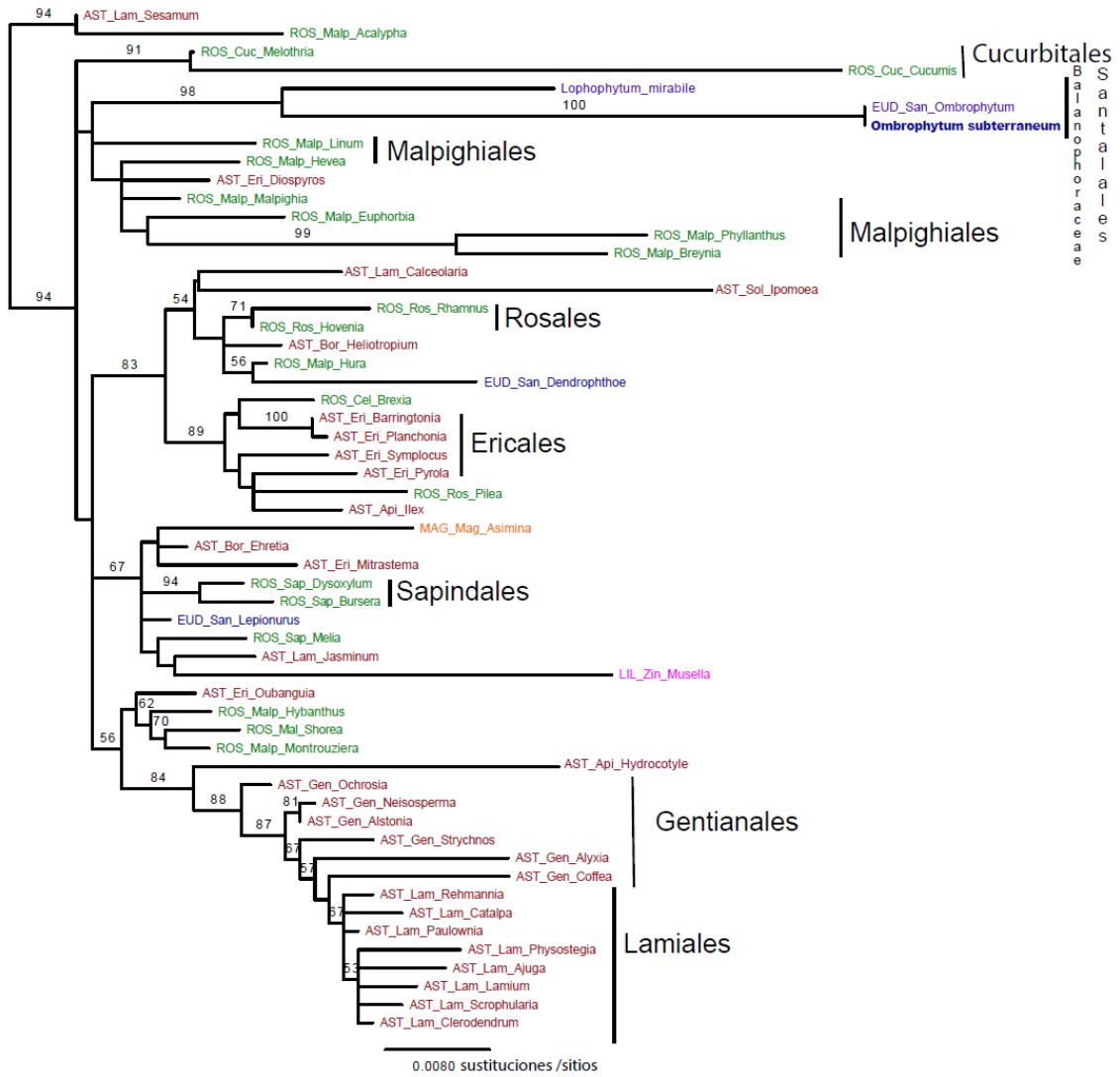


Figura 4.20. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el *intron* del gen mitocondrial *cox1*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

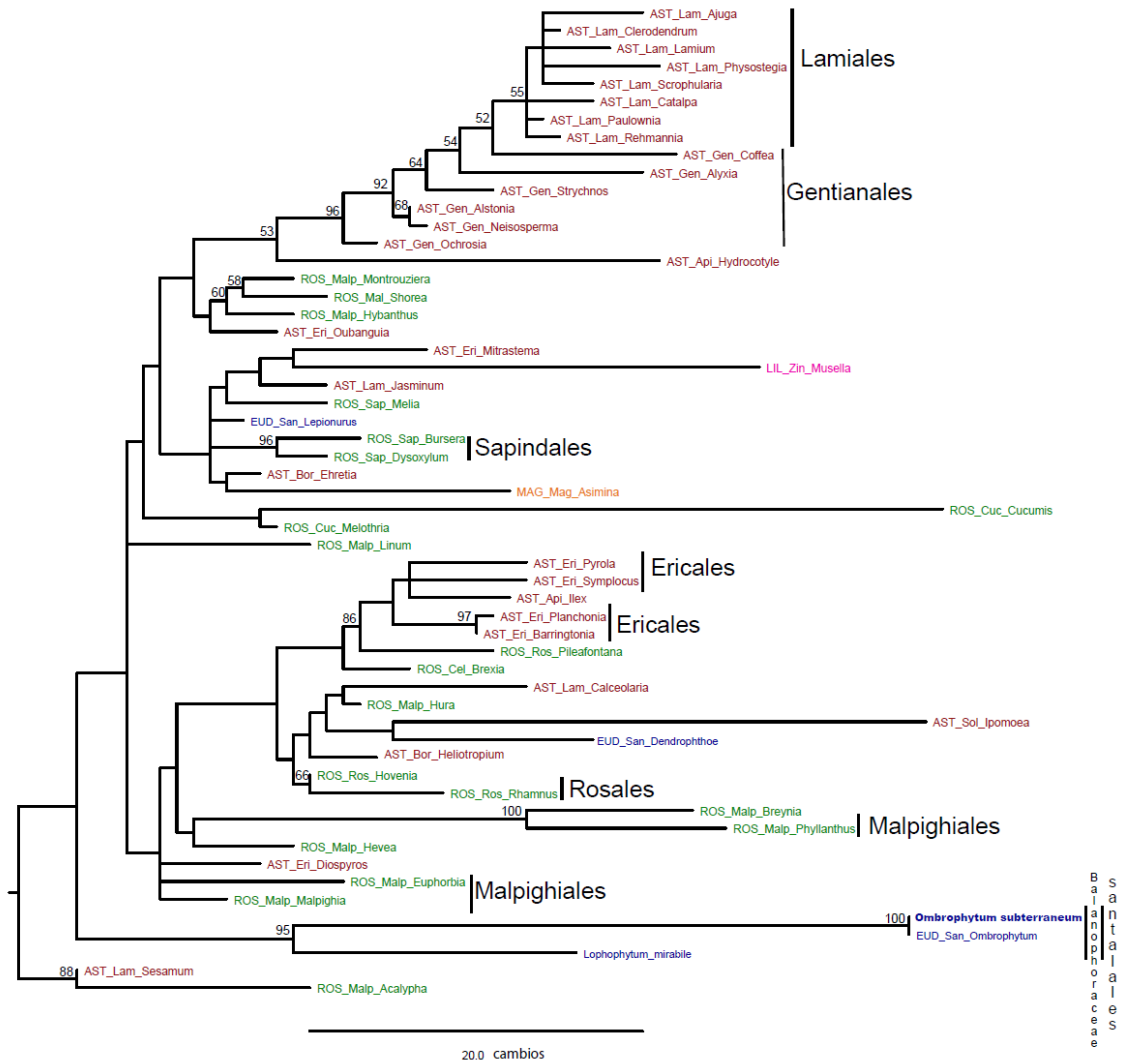


Figura 4.21. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el *intron* del gen mitocondrial *cox1*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.4.7.2 Exones del gen *cox1*

La inserción del intrón en el gen *cox1*, provoca la formación de dos exones con un tamaño típico de 726 y 858 pb de longitud, respectivamente (Cho *et al.*, 1998; Sanchez-Puerta *et al.*, 2011).

La secuencia codificante del gen mitocondrial *cox1* tiene un tamaño de 1.259 pb, siendo de 499 pb el exón 1 y de 760 pb el exón 2. Además, la secuencia de *O. subterraneum* obtenida en el presente trabajo presenta un CCT de 12 pb en la región 3' flanqueando el intrón. Del alineamiento del exón 1 se eliminaron 11 sitios de edición y en el segundo exón 20 sitios (Tabla 4,2). También se eliminó la región que contiene el tracto de co-conversión (CCT) de aquellas angiospermas con el Intrón (18 pb) ya que fueron adquiridas por transferencia horizontal junto con el intrón. En total se eliminaron 49 pb de las secuencias del alineamiento completo.

Los árboles filogenéticos del *exón* del gen *cox1* sin sitios de edición, tanto el de ML (Figura 4.22) como el de MP (Figura 4.23), no presentan diferencias entre sí. Se observa que la secuencia de *O. subterraneum* obtenida resultó hermana de la secuencia de *Ombrophytum* presente en GenBank con un fuerte soporte de bootstrap (BS=100%). Las secuencias de *O. subterraneum* difieren en 3 nucleótidos. Este taxón se observa como hermano del resto de las especies del Orden Santalales sin apoyo significativo de bootstrap.

A la secuencia de *Baccharis sp.* se la observa como hermana de *Nymphoides* con un alto apoyo de bootstrap (BS=82%), ambos del Orden Asterales. Este clado es hermano del orden Apiales sin apoyo y se encuentra dentro del gran grupo de las Asterids.



Figura 4.22. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el *exón* del gen mitocondrial *cox1*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

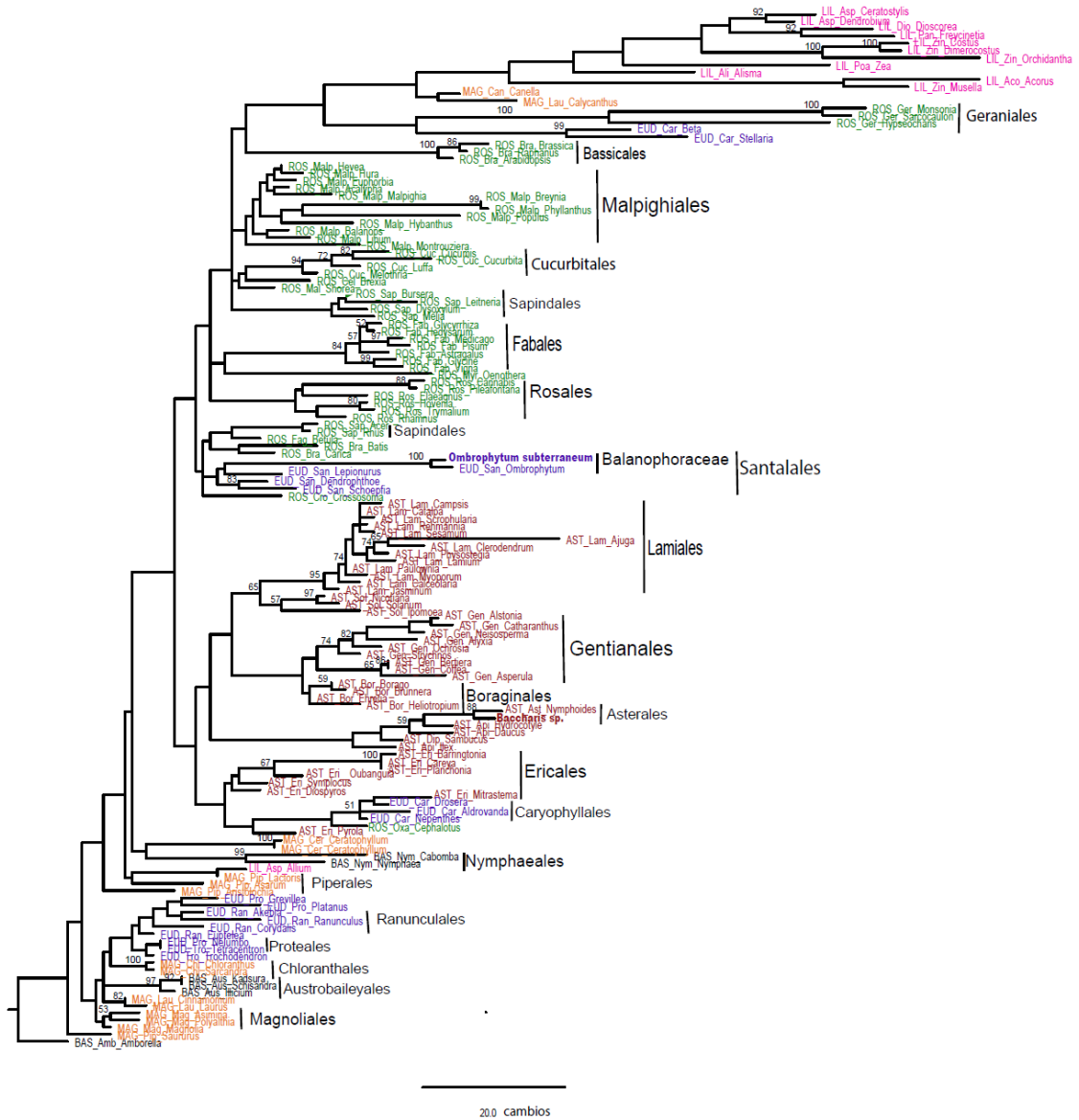


Figura 4.23. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en el *exón* del gen mitocondrial *cox1*. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida-Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

En el árbol de Máxima verosimilitud con sitios de edición del *cox1* exón (Figura 4.24), se observa que la secuencia de *O. subterraneum* resultó hermana de la secuencia de *Ombrophytum* presente en GenBank (BS=100%) y hermana del resto de las Santalales con bootstrap menor al 50%.

A *Baccharis sp.* se la encuentra como hermana de *Nymphoides*, ambas del orden Asterales con un apoyo de bootstrap de 85%. En este árbol no se observa a las Asterids como un grupo monofilético.

En una comparación global entre los árboles de *cox1* con y sin sitios de edición, se observa que en el árbol ML sin sitios de edición (Figura 4.22), diversos linajes de angiospermas se agrupan aunque sin apoyo estadístico. En contraste, en el árbol ML con sitios de edición (Figura 4.24) dichos grupos son para o polifiléticos, probablemente debido a homoplasias en los sitios de edición. Por ejemplo, el orden Ericales es polifilético y monofilético en el árbol con y sin sitios de edición, respectivamente. Lo mismo ocurre con las especies pertenecientes a los órdenes Boraginales y Gentianales.

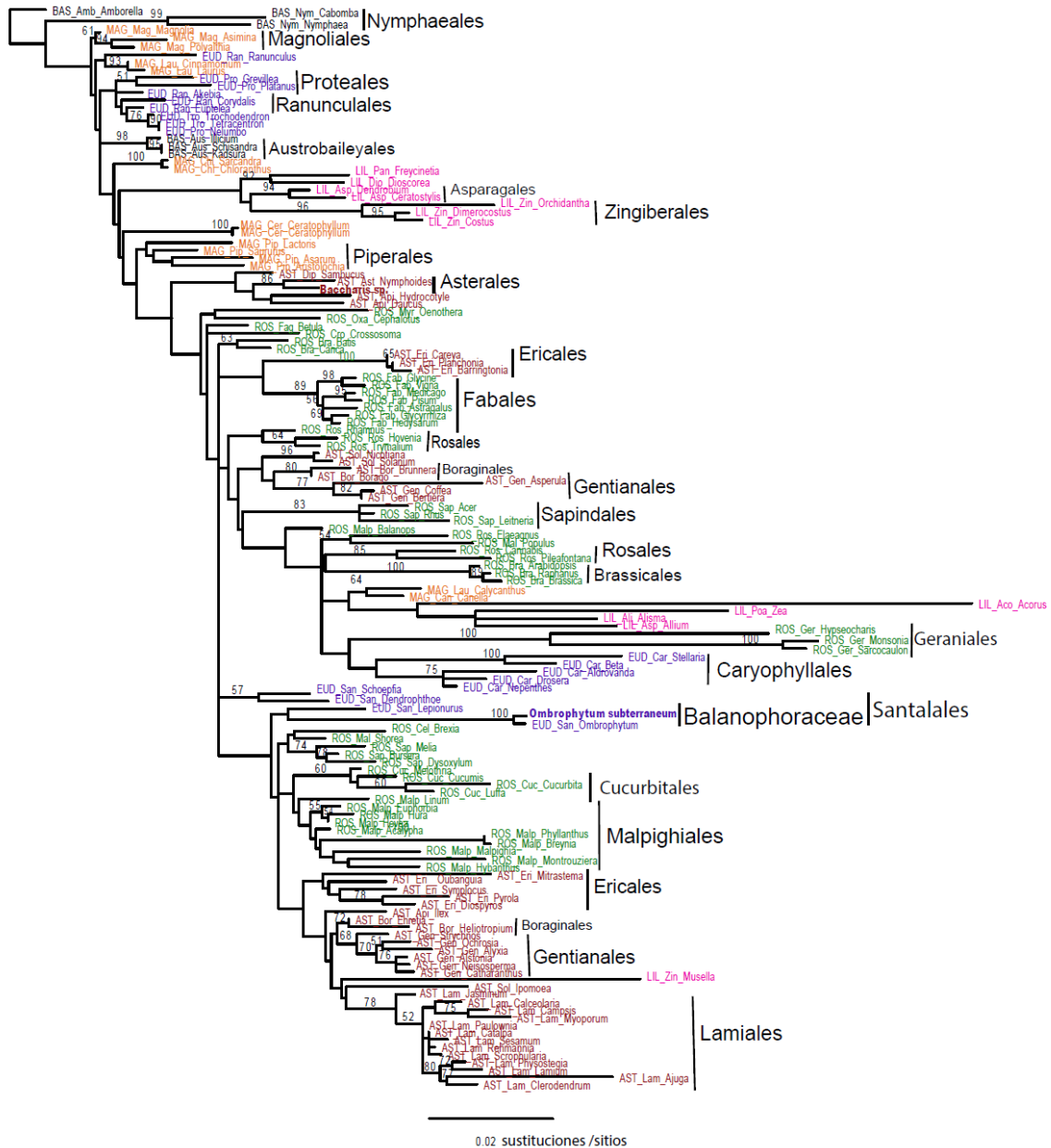


Figura 4.24. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el *exón* del gen mitocondrial *cox1*. Con sitios de edición. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas. Los nombres de los taxa han sido coloreados de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen: marrón (Asterids), azul (Eudicotiledonéas que no se clasifican como Asterids ni rosids), anaranjado (Magnoliids), verde (Rosids), rosado (Liliopsida- Monocotiledóneas), Negro (Basal Magnoliophyta).

4.5 Distancias evolutivas entre *Ombrophytum subterraneum* y *Baccharis sp.*

De cada uno de los genes obtenidos en este trabajo, se calculó la distancia evolutiva por el método modificado de Nei-Gojobori (Jukes-Cantor) entre las secuencias de nucleótidos de *Ombrophytum subterraneum* y *Baccharis sp.* (Figura 4.25). Se observa que la distancia es variable en los distintos genes mitocondriales, siendo la menor la que corresponde al gen *ccmC*. Esta observación es coherente con las relaciones evolutivas observadas en los árboles filogenéticos, donde la secuencia de *ccmC* de *O. subterraneum* tiene alta afinidad con *Baccharis sp.* y muestran una rama relativamente corta en los árboles de ML. Por otro lado, al comparar los genes mitocondriales y nucleares, observamos que la distancia estimada para el gen nuclear ADNr 18S es intermedia entre las distancias obtenidas para los genes mitocondriales (Figura 4.25).

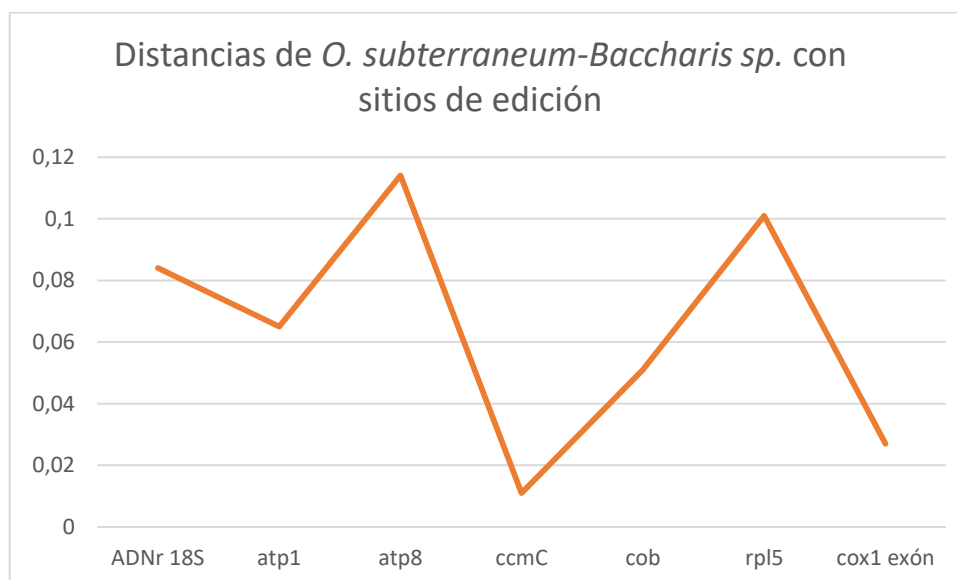


Figura 4.25. Gráfico de los valores de las distancias evolutivas calculadas por el método Modificado de Nei-Gojobori (Jukes-Cantor) entre las secuencias de *O. subterraneum* y *Baccharis sp.* de los genes mitocondriales y nuclear.

4.6 Extracción de ARN

La extracción y purificación del ARN de túber de *Ombrophytum subterraneum* realizada con TRIzol dio resultados negativos; no se observaron las bandas correspondientes en los geles de agarosa (Figura 4.26). Como control se utilizó *Solanum lycopersicum* (tomate), que dio resultado positivo aunque en baja concentración.

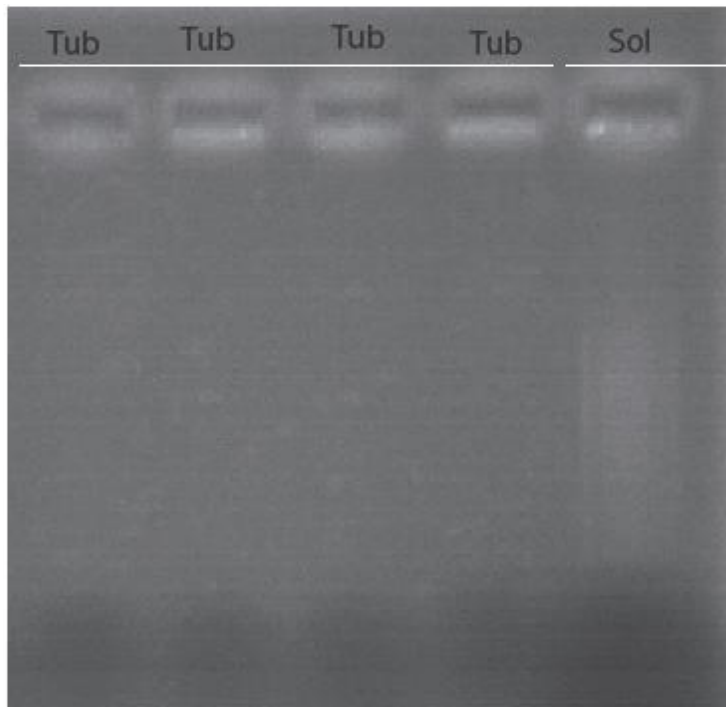


Figura 4.26. Gel de agarosa de la extracción ARN de túber (Tub) de *O. subterraneum* y de hojas de *Solanum lycopersicum* (Sol), realizada con el protocolo del TRIzol.

Debido a los resultados negativos obtenidos al utilizar este método para la extracción de ARN, se decidió seguir un protocolo específico para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos (Zeng *et al.*, 2002).

Luego de varias extracciones, con el protocolo específico para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos, los resultados fueron positivos para *O. subterraneum* (túber) y *S. lycopersicum* (control). Se observaron bandas tenues de ARN de *O. subterraneum* en el gel de agarosa (Figura 4.27).

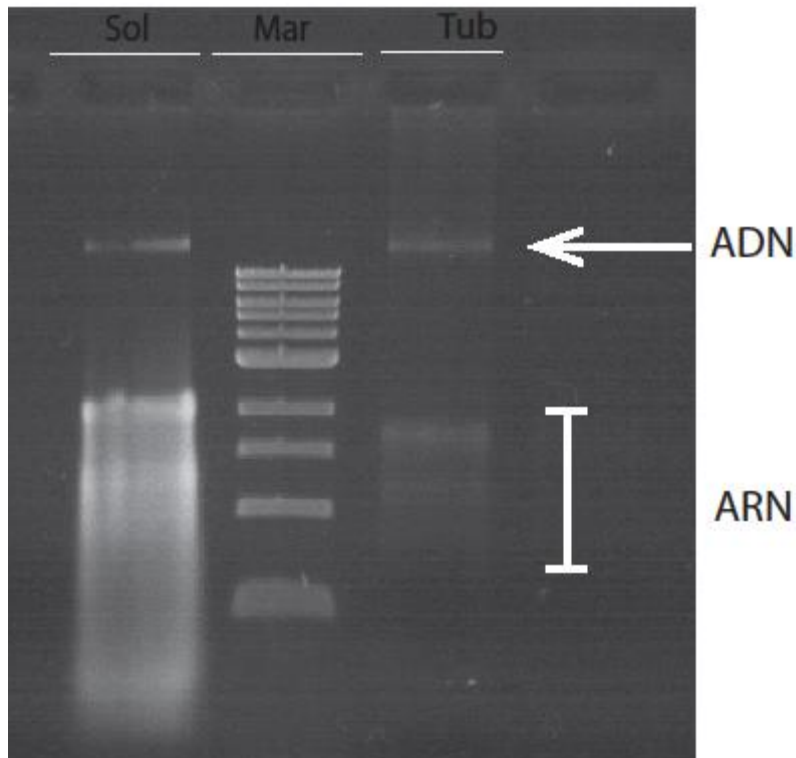


Figura 4.27. Gel de agarosa de la extracción ARN de túber (Tub) de *O. subterraneum* y de hojas de *Solanum lycopersicum* (Sol), realizada con el protocolo de específico para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos (Zeng *et al.*, 2002). Mar: Marcador 1Kb.

Como además del ARN esperado, también se observaron bandas de ADN en los geles de agarosa, las muestras fueron tratadas con DNAsa, para eliminar esta contaminación. Luego con estas muestras se realizó la retrotranscripción, de ARNm a ADNc. Se procedió con la RT-PCR con la muestra de ADNc para amplificar los genes deseados (*ccmC* y *cox1*). Sin embargo, en este procedimiento se obtuvieron resultados negativos en varios intentos. Es posible que la concentración de ARN obtenido no haya sido suficiente.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó de forma comparativa la historia evolutiva de 6 genes mitocondriales y un gen nuclear de la planta holoparásita *O. subterraneum* y de su hospedador *Baccharis sp.*, con el objetivo de identificar eventos de transferencia horizontal de genes entre ambas especies.

5.1 Ubicación taxonómica

Para conocer la ubicación taxonómica de especies vegetales se utilizan generalmente las siguientes características:

- Caracteres morfológicos de hojas, flores y raíces de la planta.
- Caracteres moleculares: secuencias de genes cloroplastídicos, mitocondriales y nucleares.

La ubicación de la familia Balanophoraceae dentro del Orden Santalales es difícil de determinar ya que todos sus representantes son plantas holoparásitas de raíces (Nickrent *et al.*, 2002) que han sufrido reducción en la morfología de sus hojas, tallos y raíces (Heide-Jørgensen, 2008; Kuijt, 1969; Nickrent *et al.*, 1994; Nickrent *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2012). Estas estructuras modificadas proporcionan una información relativamente escasa para su correcta clasificación (Heide-Jørgensen, 2008; Kuijt, 1969; Su *et al.*, 2012).

Los trabajos de clasificación filogenética utilizan generalmente las secuencias de los genes nuclear *ADNr 18S* y cloroplastídico *rbcL* (Der *et al.*, 2008; Malécot *et al.*, 2008; Nickrent *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2015). En los estudios realizados para clasificar plantas holoparásitas se ha utilizado solamente el gen nuclear *ADNr 18S* (Nickrent *et al.*, 1994; Su *et al.*, 2012), debido a que algunas plantas holoparásitas han perdido el gen *rbcL* del genoma del cloroplasto o es demasiado divergente por la ausencia de presión selectiva (dePamphilis *et al.*, 1990; Krause, 2008; Nickrent *et al.*, 1994; Nickrent *et al.*, 1997; Nickrent *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2015). En el presente trabajo, no se pudieron amplificar los genes cloroplastídicos *rbcL* y *matK* en *Ombrophytum subterraneum*. Lo mismo se observó en un estudio reciente que incluyó 11 especies de la familia Balanophoraceae *s.l.* (holoparásitas). Estos resultados dificultan aún más la ubicación taxonómica de las plantas holoparásitas (Su *et al.*, 2015).

La correcta ubicación de las especies de la familia Balanophoraceae en el árbol de la vida tiene otro factor que la dificulta: la elevada tasa de sustitución de sus genes (Barkman *et al.*, 2004; Barkman *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2004; Nickrent *et al.*, 1994; Nickrent *et al.*, 1998; Nickrent *et al.*, 2004; Parkinson *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2012). Las plantas parásitas tienen una mayor tasa de mutación que sus parientes cercanos de vida libre, pero las causas de dicha aceleración aún no han sido dilucidadas. Esto puede deberse a una conexión directa, donde algún aspecto del estilo de vida parasitario impulsa la evolución de las tasas de mutación elevada (Bromham *et al.*, 2013). Dicha elevada tasa de mutación puede provocar la atracción incorrecta de taxa con ramas largas, confundiendo las relaciones filogenéticas (Barkman *et al.*, 2004; Goremykin *et al.*, 2009; Nickrent *et al.*, 1994; Nickrent *et al.*, 1998; Renner *et al.*, 2012).

En el presente análisis, los árboles filogenéticos basados en el gen nuclear ADNr *18S* muestran que las relaciones filogenéticas entre los principales clados de Santalales son generalmente congruentes con las presentadas anteriormente (Nickrent *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2015). Por ejemplo, la familia Balanophoraceae *s.l.* se observa como un grupo polifilético. Los árboles del ADNr *18S* mostraron a *Ombrophytum subterraneum* formando un grupo monofilético con *Scybalium* y *Corynaea*, agrupando a la familia Balanophoraceae *s. str.*. Estas observaciones coinciden con el reciente estudio realizado por Su *et al.* (2015). Teniendo en cuenta esos resultados, el género *Ombrophytum* pertenece a la familia Balanophoraceae *s. str.*

La ubicación exacta de la familia Balanophoraceae *s. str.*, dentro del Orden Santalales (o en las angiospermas, en general) y en particular la de *O. subterraneum*, no está definida (Barkman *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2015). En el presente trabajo se observa que la ubicación de los miembros de Balanophoraceae *s. str.* dentro del Orden Santalales varía en los diferentes árboles. Lo anterior podría deberse en parte a la escasez de secuencias de géneros pertenecientes al orden Santalales en las bases de datos. En general, se encontraron muy pocas (o ninguna) secuencias mitocondriales de especies del Orden Santalales o de la familia Balanophoraceae (Tabla 4.1). El desarrollo de estudios taxonómicos y moleculares en diversas

especies de este orden permitirá alcanzar un mayor entendimiento sobre las relaciones evolutivas entre las familias del orden Santalales.

En los análisis evolutivos de diversos genes mitocondriales, así como del nuclear, *O. subterraneum* se relacionó, en general, con especies de la familia Balanophoraceae s.str. Sin embargo, este clado presenta altas tasas de sustitución y sus relaciones filogenéticas con otras angiospermas resultaron indefinidas. Por lo tanto, la hipótesis 1 de este trabajo de investigación queda en parte corroborada.

En el caso de la planta hospedadora *Baccharis sp.*, todos los árboles filogenéticos obtenidos mostraron afinidades filogenéticas similares; la especie se ubicó siempre dentro de la familia Asteraceae. La determinación taxonómica de esta especie es menos complicada que la de las parásitas, ya que no tienen reducciones morfológicas y además en los estudios moleculares, se pueden utilizar los genes nucleares, mitocondriales y cloroplastídicos. Por otro lado, la tasa de sustitución de los genes de los tres compartimentos es baja, evitando la atracción de las ramas largas. Teniendo en cuenta los distintos caracteres taxonómicos mencionados, *Baccharis sp.* pertenece a la familia Asteraceae.

5.2 Edición del ARN

La edición del ARN es un proceso posttranscripcional muy común en los genes mitocondriales de plantas (Bowe *et al.*, 1996; Knoop *et al.*, 2011; Kubo *et al.* 2007; Mower *et al.*, 2010; Handa, 2003). Cada especie de angiosperma presenta sitios de edición específicos (Mower *et al.*, 2010; Handa, 2003). Se ha reconocido que varían entre especies cercanas, es decir, presentan una gran variabilidad intrafamiliar y entre familias de plantas (Handa, 2003; Mower *et al.*, 2010). Además, en algunos casos, ciertos genes han perdido todos sus sitios de edición a través de un proceso de retrotranscripción de ARNm maduros y posterior conversión génica con el gen codificado en el genoma mitocondrial (Figura 5.1). Esta alta variabilidad en la presencia/ausencia de sitios de edición en genes mitocondriales podría afectar negativamente la inferencia filogenética debido a la elevada homoplasia que podrían generar dichos datos. Por ejemplo, dos especies alejadas que hubieran perdido todos sus sitios de edición en forma paralela, compartirán un gran número de caracteres homoplásicos que erróneamente apoyarán una relación cercana entre dichas especies. Sin embargo, también se reconoce que la exclusión de dichos sitios

elimina una porción importante de la información contenida en el gen y que puede ser útil para los análisis evolutivos (Bowe *et al.*, 1996).

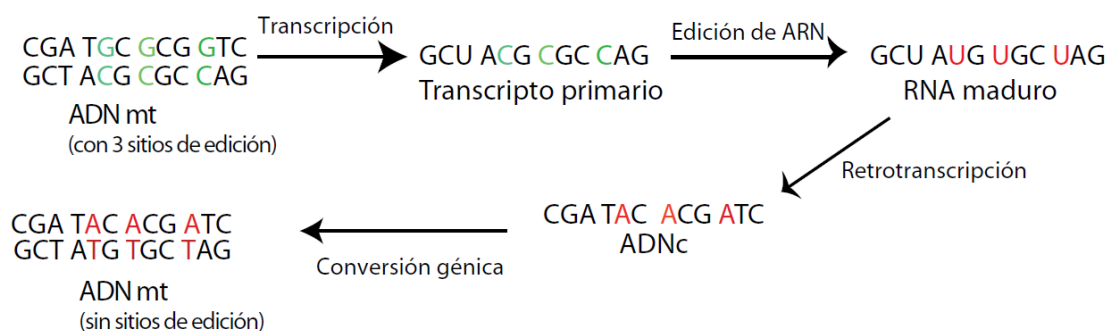


Figura 5.1. Edición de ARN y retrotranscripción.

Los genes mitocondriales secuenciados en el presente trabajo presentaron sitios de edición del ARN. Para contrastar el posible efecto filogenético generado por los mismos, se realizaron análisis filogenéticos de ML incluyendo o excluyendo a los sitios de edición del alineamiento. Teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas observadas, en algunos genes (genes *atp1*, *atp8* y *rpl5*) no se observaron diferencias. En otros casos (genes *ccmC*, *cob* y exones del gen *cox1*) se observan marcadas diferencias indicando que es importante tener en cuenta la inclusión o no de los sitios de edición al realizar estos estudios evolutivos.

Los árboles en los que se encontraron mayores diferencias corresponden a las secuencias génicas que presentaron mayor número de sitios de edición (gen *ccmC* con 37, exón del gen *cox1* con 31 y gen *cob* con 22 sitios de edición). Los análisis con los sitios de edición, pueden indicar relaciones erróneas entre especies, por compartir caracteres homoplásicos generados por la pérdida de los sitios de edición de las secuencias. Por ejemplo, *Arabidopsis* (Brassicales, Rósidas), *Calycanthus* (Magnólida) y *Acorus* (Monocotiledónea), entre otros, se encuentran agrupados en el árbol que se realizó incluyendo a los sitios de edición (Figura 4.24). Esta asociación errónea de taxa tan dispares se debe principalmente a la pérdida convergente de numerosos sitios de edición que ocurrió independientemente en dichas especies. Estas pérdidas habrían ocurrido por eventos independientes de retrotranscripción y conversión génica (Figura 5.1)

5.3 Intrón del gen *cox1*

En las angiospermas, algunos genes mitocondriales están interrumpidos por intrones (Bonen *et al.*, 2001; Knoop *et al.*, 2011). Hasta el momento existe un solo intrón del grupo I descrito para angiospermas (Cho *et al.*, 1998), el intrón del gen mitocondrial *cox1*, situado en el gen codificante de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (*cox1*) (Sanchez-Puerta *et al.*, 2008). Se cree que ha sido transferido cientos o miles de veces entre plantas (Cho *et al.*, 1998; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008). Se propone que este intrón invadió por primera vez a las angiospermas desde un hongo donante (Cho *et al.*, 1998), utilizando como vía la THG, y subsecuentemente se dispersó entre diferentes grupos de angiospermas también por THG (Cho *et al.*, 1998; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008).

En un trabajo anterior, donde se analizaron un gran número de especies parásitas, detectaron que todas las holoparásitas estudiadas poseían el intrón de *cox1*. En dicho estudio, se postula que las múltiples adquisiciones horizontales del intrón de *cox1*, a lo largo de la historia de las angiospermas, es más probable que sucedan en las especies parásitas que tienen la THG facilitada por el contacto directo célula-célula (Barkman *et al.*, 2007; Mower *et al.*, 2010). De acuerdo con dicha predicción, observamos que la especie holoparásita aquí estudiada, *Ombrophytum subterraneum*, posee el intrón en el gen *cox1*. Sin embargo, los hospedantes de diversas holoparásitas no siempre presentan el intrón de *cox1*, aunque su parásito lo posea (Barkman *et al.*, 2007). Este es el caso de *O. subterraneum* y su planta hospedadora *Baccharis* sp. (gen *cox1* secuenciado en el presente trabajo). Se observó que la secuencia del gen mitocondrial *cox1* de la planta parásita posee el intrón y la planta hospedadora no lo posee.

La especie *Lophophytum mirabile* también pertenece a la familia Balanophoraceae s. str. (Heide-Jørgensen, 2008; Su *et al.*, 2015) y presenta el intrón en su gen *cox1*. En los análisis filogenéticos del intrón del gen *cox1*, *O. subterraneum* y *L. mirabile* resultaron ser hermanas con alto soporte de bootstrap. Estas observaciones indicarían que el ancestro de *Lophophytum* y *Ombrophytum* adquirió el intrón por THG de otra angiosperma, y este fue heredado de forma vertical en *Ombrophytum* y en *Lophophytum*. En este caso, no es posible especificar el donante debido a la baja resolución de las relaciones entre las secuencias de los intrones. No

se descarta que la THG hubiera ocurrido a partir de una planta hospedadora ancestral que era infectada por el ancestro holoparásito de *Lophophytum* y *Ombrophytum*.

5.4 THG de genes mitocondriales

La THG entre las angiospermas ha sido reportada en varios trabajos (Barkman *et al.*, 2007; Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2015; Knoop *et al.*, 2011; Mower *et al.*, 2004; Mower *et al.*, 2010; Rice *et al.*, 2013; Sanchez-Puerta, 2014; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015; Xi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). En la mayoría de los casos la THG planta-planta comprende secuencias mitocondriales (Barkman *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2013; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014).

La asociación que se establece entre hospedador-parásito, es decir, la interacción directa de célula a célula, facilita la transferencia horizontal de genes (Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2015; Knoop *et al.*, 2011; Mower *et al.*, 2010; Nikolodis *et al.*, 2013; Rice *et al.*, 2013; Sanchez-Puerta *et al.*, 2008; Sanchez-Puerta, 2014; Skippington *et al.*, 2015; Xi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). En las relaciones hospedador-parásito, ambos pueden comportarse como donantes o receptores del material genético en las THG (Barkman *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005; Mower *et al.*, 2004; Nickrent *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2012).

Una consecuencia de las THG de hospedador a parásito, es que los parásitos pueden aparecer, en árboles filogenéticos, estrechamente relacionados con sus anfitriones, ocultando así sus verdaderas filogenias (Barkman *et al.*, 2007). En general, *O. subterraneum* no tuvo una asociación inesperada con ningún linaje, excepto en el gen *ccmC*, en el cual se asocia a la familia Asteraceae. La familia Asteraceae (géneros *Helianthus* y *Baccharis*) se ubica en la posición esperada en los árboles obtenidos, indicando que el gen *ccmC* fue heredado de forma vertical en esta familia. La ubicación inesperada de *Ombrophytum* podría indicar un evento de transferencia horizontal del gen *ccmC* desde algún miembro de la familia Asteraceae hacia el linaje que dio lugar a *O. subterraneum*. La baja tasa de sustitución, indicada por la rama corta que sostiene a *O. subterraneum*, estaría indicando que el evento de THG es relativamente reciente.

En la secuencia del gen *ccmC* se predijeron 29 sitios de edición en *O. subterraneum*. Debido a que la edición es un fenómeno que ocurre a nivel de ARNm la transferencia ocurrida de hospedador a parásito habría sido a partir de un fragmento de ADN y no de ARNm (Barkman *et al.*, 2007; Bergthorsson *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2015; Mower *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014), como ha sido observado en otros eventos de THG entre plantas (Davis *et al.*, 2015). Los 29 sitios de edición predichos para *Ombrophytum*, coinciden con los sitios de edición de *Baccharis* (hospedador) y *Heliantus*, ambos géneros se observan cómo hermanos de *Ombrophytum*. Esto es lo esperado, ya que el gen habría sido transferido junto con los sitios de edición (Davis *et al.*, 2004; Nickrent *et al.*, 2004; Renner *et al.*, 2012).

Por lo antes expresado, con los resultados obtenidos para el gen *ccmC* e intrón del gen *cox1*, se postula la existencia de transferencia horizontal de genes en la planta holoparásita *Ombrophytum subterraneum*. En el caso del gen *ccmC* (y quizá en el intrón de *cox1*) el donante fue un posible hospedador de la familia Asteraceae y se acepta la hipótesis 2.

No hay evidencia de la existencia de otra copia del gen *ccmC* en *Ombrophytum*, ya que no se observan dobles picos en las secuencias obtenidas de los productos de PCR amplificadas con cebadores universales para angiospermas. Si en efecto, esta copia de *ccmC* es la única, entonces podría ser funcional. Hay otros casos donde se postula que el gen foráneo sería el gen funcional (Xi *et al.*, 2013). En tales casos, el gen del hospedador (gen foráneo) pareciera haber reemplazado al nativo. Para confirmar la funcionalidad del gen foráneo es necesario analizar la expresión del gen, el primer paso para lograrlo es la extracción del ARN.

En el presente trabajo, se realizó la extracción de ARN, con un protocolo desarrollado para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos (Zeng *et al.*, 2002), pero no se obtuvo ARN y ADNc de alta calidad, con lo cual no se pudo poner a prueba la hipótesis 3. Sin embargo, debido a que el gen *ccmC*, está presente universalmente en los genomas de angiospermas, el homólogo foráneo de *ccmC* es probable que haya reemplazado al nativo de manera funcional.

Para estudios futuros, se podrían analizar otros genes mitocondriales para estudiar la incidencia de las THG en el genoma mitocondrial de *O. subterraneum*.

También se podría intentar amplificar y secuenciar genes cloroplastídicos utilizando cebadores degenerados que permitan amplificar secuencias divergentes. Esto serviría para aportar información de *O. subterraneum* y a su vez de la familia Balanophoraceae, la cual es muy escasa. Con respecto a la expresión de los genes, se podrían aplicar otras técnicas u optimizar las metodologías empleadas para la extracción de ARN y la RT-PCR y así poder estudiar la transcripción de los genes foráneos en *Ombrophytum*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams KL, Clements MJ y Vaughn JC (1998). The Peperomia mitochondrial *cox1* group I intron: timing of horizontal transfer and subsequent evolution of the intron. *J Mol Evol.* 46:689–696.
- Adams KL, Qiu YL, Stoutemyer M, Palmer JD. (2002). Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 99:9905-9912.
- Adams, KL, y Palmer, JD (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus, *Mol. Phylogenet Evol.*, 29, 380-95.
- Aitzetmüller, K (2012). Santalbic acid in the plant kingdom. *Pl. Syst. Evol.* 298: 1609–1617.
- Andersson JO (2005). Lateral gene transfer in eukaryotes. *Cell Mol Life Sci.*; 62(11):1182–1197.
- Arimura S, Yamamoto J, Aida GP, Nakazono M, Tsutsumi N. (2004). Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(20):7805–7808.
- Barkman TJ, Lim SH, Salleh KM y Nais J (2004). Mitochondrial DNA sequences reveal the photosynthetic relatives of *Rafflesia*, the world's largest flower. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 787–792.
- Barkman TJ, McNeal JR, Lim SH, Coat G, Croom HB, Young ND, *et al.* (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.
- Bellot S. y Renner S.S. (2016). 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, Adams KL, Thomason B y Palmer JD (2003). Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature*, 424:197-201.
- Bergthorsson U, Richardson AO, Young GJ, Goertzen LR, Palmer JD. (2004). Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella*. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 101(51):17747–17752.
- Bonen, L. y Vogel, J. (2001). The ins and outs of group II introns, *Trends Genet*, 17 (6), 322-31.
- Bowe LM y dePamphilis CW (1996). Effects of RNA editing and gene processing on phylogenetic reconstruction. *Mol Biol Evol*, 13:1159-1166.
- Bromham L, Cowman PF y Lanfear R (2013) Parasitic plants have increased rates of molecular evolution across all three genomes. *BMC Evolutionary Biology* 13: 126.
- Bush AO, Fernandez JC, Esch GW y Seed JR (2001): *Parasitism: The Diversity and Ecology of Animal Parasites* Cambridge: Cambridge University Press.
- Caprara M y Waring R (2005). Group I introns and their maturases: uninvited, but welcome guests. In: Belfort M, Stoddard B, Wood D, Derbyshire V, editors. *Homing endonucleases and inteins*. Heidelberg (Germany): Springer.

- Cho Y, Mower JP, Qiu Y-L, Palmer JD (2004). Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 101:17741-17746.
- Cho Y, Qiu YL, Kuhlman P, Palmer JD. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:14244–14249.
- Cho YR. y Palmer JD (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.
- Combes C (2001). *Parasitism: the Ecology and Evolution of Intimate Interactions* Chicago: The University of Chicago Press.
- Davis CC y Xi Z (2015). Horizontal gene transfer in parasitic plants. *Curr Opin Plant Biol* 26:14–19.
- Davis, CC, Andersen, WR, y Wurdack, KJ (2005). Gene transfer from a parasitic flowering plant to a fern. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 272, 2237-42.
- Davis, CC. y Wurdack, K. J. (2004). Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales. *Science*, 305 (5684), 676-78.
- dePamphilis, C. W. y Palmer, J D (1990). Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature*, 348, 337-39.
- Der, JP y Nickrent, D. L. (2008). A molecular phylogeny of Santalaceae (Santalales). *Syst. Bot.*, 33, 107-16.
- Doyle, JJ y Doyle, JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11–15.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Zoology* 34: 152–161.
- Furner IJ, Huffman GA, Amasino RM, Garfinkel DJ, Gordon MP, Nester EW (1986). An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*; 319:422-427.
- Goremykin VV, Salamini F, Velasco R y Viola R (2009). Mitochondrial DNA of *Vitis vinifera* and the issue of rampant horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol*, 26:99-110.
- Gray, MW (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *International Review of Cytology*, 141, 233–357.
- Gray, MW, Burger, G, y Lang, BF (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476-81.
- Handa, H (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus L.*): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, 31, 5907-16.
- Heide-Jørgensen HS (2008) *Parasitic Flowering Plants* (Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands).
- Hiesel, R, von Haeseler, A y Brennicke, A (1994). Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis. *PNAS* 91: 634–638.

- Huang, J (2013) "Horizontal gene transfer in eukaryotes: The weak-link model", *BioEssays*, vol. 35, no. 10, pp. 868-875.
- Irving, LJ y Cameron, DD (2009). You are what you eat: interactions between root parasitic plants and their hosts. *Adv. Bot. Res.* 50, 87–138.
- Jurica, MS y Stoddard, BL (1999). Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 1304-26.
- Keeling, PJ y Palmer, JD (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews*, 9, 1-14.
- Knoop, V, Volkmar, U, Hecht, J, y Grewe, F (2011). Mitochondrial genome evolution in the plant lineage. In: *Plant Mitochondria*. pp. 3–29. Kempken, F., Eds., Springer, New York.
- Knoop, V. (2011). When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences. *Cell Mol. Life Sci.* 68: 567–586.
- Knoop, V. (2012) Seed plant mitochondrial genomes: complexity evolving. In: Bock R, Knoop V, editors. *Genomics of chloroplasts and mitochondria*. Dordrecht (The Netherlands): Springer. pp. 175-200.
- Krause, K (2008). From chloroplast to "cryptic" plastids: evolution of plastid genomes in parasitic plants. *Curr. Genet.*, 54, 111-21.
- Kubo, T. y Mikami, T. (2007). Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. *Physiologia Plantarum*, 129, 6-13.
- Kuijt, J. (1969) *The Biology of Parasitic Flowering Plants*, University of California Press.
- Lambowitz, AM y Belfort, M. (1993). Introns as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 587-622.
- Malécot, V y Nickrent, DL (2008). Molecular Phylogenetic Relationships of Olacaceae and Related Santalales. *Systematic Botany*, 33(1): pp. 97-106.
- Mauseth, JD y Montenegro, G (1992). Secondary wall ingrowths on vessel elements in *Ombrophytum subterraneum* (Balanophoraceae). *American Journal of Botany* 79(4): 456-458.
- Mauseth, JD y Shu-Chuan H (1992b). Vegetative body of the parasitic angiosperm *Ombrophytum subterraneum* (Balanophoraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* vol. 119(4), 1992, p p. 407-417.
- Mower JP, Stefanović S, Hao W, Gummow JS, Jain K, Ahmed D, et al. (2010). Horizontal acquisition of multiple mitochondrial genes from a parasitic plant followed by gene conversion with host mitochondrial genes. *BMC Biol.*; 8(1):150.
- Mower, JP (2005). PREP-Mt: predictive RNA editor for plant mitochondrial genes', *BMC Bioinformatics*, 6, 96.
- Mower, JP, Jain, K y Hepburn, NJ (2012). Chapter 3: The Role of Horizontal Transfer in Shaping the Plant Mitochondrial Genome. *Mitochondrial Genome Evolution*, First
- Mower, JP, Stefanovic, S., Young, GJ. y Palmer, JD. (2004). Plant genetics: gene transfer from parasitic to host plants. *Nature* 432, 165–166.

- Nickrent DL y Starr EM (1994). High-rates of nucleotide substitution in nuclear small subunit (18S) rDNA from holoparasitic flowering plants. *J Mol Evol* 39:62–70.
- Nickrent DL, Blarer A, Qiu Y-L, Soltis DE, Soltis PS y Zanis M (2002). Molecular data place Hydnoraceae with Aristolochiaceae. *Amer J Bot*, 89:1809-1817.
- Nickrent DL, Blarer A, Qiu YL, Vidal-Russell R y Anderson FE. (2004) Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evol Biol.*; 4(1):40.
- Nickrent DL, Duff RJ, Colwell AE, *et al.* (1998). Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ. eds. *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 211–241.
- Nickrent DL, Malécot, V, Vidal-Russell R y Der JP (2010). A revised classification of Santalales. *Taxon* 59, 538–558.
- Nickrent, DL, Der, JP, y Anderson, FE (2005). Discovery of the photosynthetic relatives of the "Maltese mushroom" *Cynomorium*. *BMC Evol. Biol.*, 5, 38.
- Nikolaidis, N, Doran N y Cosgrove DJ. (2013) Plant Expansins in Bacteria and Fungi: Evolution by Horizontal Gene Transfer and Independent Domain Fusion. *Molecular Biology and Evolution* 31 (2): 376-386.
- Nikolov LA, Tomlinson PB, Manickam S, Endress PK, Kramer EM y Davis CC (2014). Holoparasitic Rafflesiaceae possess the most reduced endophytes and yet give rise to the world's largest flowers. *Ann Bot*; 114:233-242.
- Oldenburg, DJ y Bendich, AJ (2001). Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5¢ protein. *J. Mol. Biol.* 310:549–562.
- Parkinson CL, Mower JP, Qiu Y-L, Shirk AJ, Young ND, dePamphilis CW yPalmer JD (2005). Multiple major increases and decreases in mitochondrial substitution rates in the plant family Geraniaceae. *BMC Evolutionary Biology*, 5:73.
- Poulin, R. y Morand, S. (2000) The diversity of parasites. *Q. Rev. Biol.* 75, 277–293.
- Renner, SS y Bellot, S (2012). Chapter 10: Horizontal Gene Transfer in Eukaryotes: Fungi-to-Plant and Plant-to-Plan. Springer Science+Business Media B.V.
- Rice DW, Alverson AJ, Richardson AO, Young GJ, Sanchez- Puerta MV, Munzinger J, Barry K, Boore JL, Zhang Y, dePamphilis CW et al. (2013). Horizontal transfer of entire genomes via mitochondrial fusion in the angiosperm *Amborella*. *Science*, 342:1468-1473.
- Richards TA, Soanes DM, Foster PG, Leonard G, Thornton CR, Talbot NJ (2009). Phylogenomic analysis demonstrates a pattern of rare and ancient horizontal gene transfer between plants and fungi. *Plant Cell*; 21:1897-1911.
- Richardson, AO y Palmer, JD (2007). Horizontal gene transfer in plants. *J. Exp. Botany*, 58, 1-9.
- Sanchez-Puerta MV, Abbona CC, Zhuo S, Tepe EJ, Bohs L, Olmstead RG, *et al.* (2011). Multiple recent horizontal transfers of the *cox1* intron in Solanaceae and extended co-conversion of flanking exons. *BMC Evol Biol.*; 11(1):277.

- Sanchez-Puerta MV, Cho Y, Mower JP, Alverson AJ y Palmer JD. (2008). Frequent, phylogenetically local horizontal transfer of the *cox1* group I intron in flowering plant mitochondria. *Mol Biol Evol.*; 25(8):1762–1777.
- Sanchez-Puerta, MV (2014). Involvement of plastid, mitochondrial and nuclear genomes in plant-to-plant horizontal gene transfer. *Acta Soc Bot Pol* 83(4):317–323.
- Sato H (2014). Anatomía reproductiva de las especies de *Lophophytum* Schott & Endl. (Balanophoraceae) de la Argentina y revisión taxonómica del género en América. Tesis doctoral. Doctorado de la UNNE en el Área de Recursos Naturales.
- Scott I y Logan DC (2011) Mitochondrial dynamics. In: Kempken F (ed) *Plant mitochondria*. Springer, New York, pp 31–63.
- Shikanai, T (2006). RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell Mol. Life Sci.*, 63, 698-708.
- Skippington, E, Barkman, TJ, Rice, DW y Palmer, JD (2015). Miniaturized mitogenome of the parasitic plant *Viscum scurruloideum* is extremely divergent and dynamic and has lost all nad genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Soltis DE, Soltis PS, Chase MW, Mort ME, Albach DC, Zanis M, Savolainen V, Hahn WH, Hoot SB, Fay MF, Axtell M, Swensen SM, Prince LM, Kress WJ, Nixon KC y Farris JS (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. *Bot J Linn Soc*, 133:381-461.
- Su, H-J., Hu, J-M., Anderson, FE, Der JP y Nickrent, DL (2015). Phylogenetic relationships of Santalales with insights into the origins of holoparasitic Balanophoraceae. *TAXON* 64 (3).
- Swofford, DL (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), ver. 4.0. M0. Sunderland: Sinauer Associates.
- Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, Hartel B y Brennicke A (2013). RNA Editing in Plants and Its Evolution. *The Annual Review of Genetics* is online at genet.annualreviews.org. *Annu. Rev. Genet.* 2013. 47:335–52.
- Timmis, JN, Ayliffe, MA, Huang, CY y Martin, W (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics*, 5, 123–135.
- Vaughn JC, Mason MT, Sperwhitis GL, Kuhlman P y Palmer JD. (1995). Fungal origin by horizontal transfer of a plant mitochondrial group I intron in the chimeric *cox1* gene of *Peperomia*. *J Mol Evol.*; 41: 563–572.
- Wannorp, L y Ronse De Craene LP (2009). Perianth evolution in the sandalwood order Santalales. *American Journal of Botany* 96: 1361 – 1371
- Westwood JH, Yoder JJ, Timko MP y dePamphilis, CW (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* 15(4):227–235.
- Woloszynska, M (2010). Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes – though this be madness, yet there's method in't. *J. Exp. Bot.* 61:657–671.
- Won, H y Renner, SS (2003). Horizontal gene transfer from flowering plants to Gnetum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 10824-29.

- Xi Z, Bradley RK, Wurdack KJ, Wong K, Sugumaran M, Bomblies K, Rest JS, Davis CC (2012). Horizontal transfer of expressed genes in a parasitic flowering plant. *BMC Genomics*, 13:227.
- Xi Z, Wang Y, Bradley RK, Sugumaran M, Marx CJ, et al. (2013) Massive Mitochondrial Gene Transfer in a Parasitic Flowering Plant Clade. *PLoS Genet* 9(2): e1003265.
- Ying Z y Tao Y (2002). RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 417a–417e.
- Zhang D, Qi J, Yue J, Huang J, Sun T, Li S, Wen J-F, Hettenhausen C, Wu J, Wang L et al. (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 Biol*, 14:19.
- Zwickl, D J (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion, (University of Texas).

7. APÉNDICE

7.1 Protocolos

7.1.1. Extracción de ADN

7.1.1.1 Protocolo de Extracción de ADN con el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen)

1. Procesar las muestras, utilizando el mortero y nitrógeno líquido.
2. Colocar 0,2 o 0,4 g de muestra en tubos de 2 ml.
3. Agregar a cada tubo 400 µl de Buffer AP1 y 4 µl de RNAsa.
4. Agitar en vórtex hasta la homogenización de la mezcla.
5. Colocar en baño de agua a 65°C por 10 minutos, mezclar por inversión cada 3 minutos.
6. Agregar 130 µl del buffer P3.
7. Baño de hielo por 5 minutos.
8. Centrifugar a 16.000 g por 5 minutos.
9. Tomar sobrenadante a la columna "QIA shredder mini spin column".
10. Centrifugar la columna por 2 minutos a 16.000 g.
11. Transferir el filtrado a un nuevo tubo (sin pellet), 500 µl de filtrado.
12. Agregar 750 µl del buffer AWW1 y resuspender con pipeta.
13. Transferir 650 µl de la mezcla a la columna "DNeasy Mini Spin".
14. Centrifugar por 1 minuto a 6.000 g.
15. Descartar el filtrado.
16. Trasladar la columna a un nuevo tubo de 2 ml. Centrifugar por 1 minuto a 6.000 g. Descartar el filtrado.
17. Trasladar la columna a un nuevo tubo de 2 ml. Agregar 500 µl del Buffer AW2.
18. Centrifugar a 6,000 g por 1 minuto. Descartar el filtrado.
19. Trasladar la columna a un nuevo tubo de 2 ml. Agregar 500 µl del Buffer AW2.
20. Centrifugar a 6,000 g por 2 minutos. Descartar el filtrado.
21. Trasladar la columna a un nuevo tubo de 2 ml. Agregar 100 µl del Buffer AE.
22. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
23. Centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
24. Retirar la columna y reservarla en otro tubo.
25. Guardar el filtrado en heladera a - 20°C (Denominado 1^{ra} elución).
26. Agregar al tubo con la columna (reservada en el ítem 24), 100 µl del buffer AE.
27. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
28. Centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
29. Retirar la columna y reservarla en otro tubo.
30. Guardar el filtrado en heladera a - 20°C (Denominado 2^{da} elución).
31. Agregar al tubo con la columna (reservada en el ítem 29), 100 µl del buffer AE.
32. Incubar por 3 días a temperatura ambiente.
33. Centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
34. Descartar la columna.

35. Guardar el filtrado en heladera a -20°C (Denominado 3^{ra} elución).

Electroforesis

1. Para obtener un gel de agarosa al 0,8% disolver 1,6 g de agarosa en 200 ml de buffer TBE (al 0,5x), utilizando el microondas para alcanzar altas temperaturas.
2. Armar la cuba de electroforesis.
3. Sembrar 5 μl de muestra con 1 μl de buffer de siembra (6x).
4. Correr el gel durante 45 minutos a 90 V.
5. Teñir el gel con Bromuro de Etidio.
6. Observar el gel en el Fotodocumentador con luz UV.

7.1.1.2 Protocolo Extracción de ADN método del CTAB

1. Procesar las muestras en Nitrogeno líquido, utilizando mortero.
2. Colocar 0,4 g o 0,8 g de muestra en cada tubo de 2 ml.
3. Agregar a cada tubo 500 μl de Buffer de extracción con P.V.P. (1 ml de Buffer con 1 g de P.V.P.)
4. Agitar en vórtex hasta la homogenización de la mezcla, por unos segundos.
5. Colocar en baño de agua a 65°C por 40 minutos, invertir cada 10 minutos.
6. Agregar 500 μl de Cloroformo-Isoamilico 24:1. Agitar en vórtex.
7. Centrifugar a 16.000 g por 7 minutos.
8. Tomar sobrenadante y traspasar a otro tubo (aproximadamente 400 μl).
9. Agregar 400 μl de Cloroformo-Isoamilico 24:1.
10. Centrifugar por 6 minutos a 16.000 g (Se observan dos fases).
11. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (aproximadamente 300 μl).
12. Agregar 40 μl de Acetato de Sodio e invertir.
13. Agregar 900 μl de Etanol absoluto.
14. Incubar a -20°C durante toda la noche.
15. Centrifugar por 5 minutos a 16.000 g.
16. Descartar el sobrenadante.
17. Agregar 500 μl de etanol al 80%.
18. Centrifugar a 16.000 g por 5 minutos.
19. Descartar el sobrenadante.
20. Dejar que el pellet se sequé por 1 hora 40 minutos.
21. Resuspender con 50 μl de H_2O miliQ.
22. Colocar en heladera a -20°C por 30 minutos.
23. Colocar en baño de agua a 60°C por 10 minutos.
24. Guardar en heladera a -20°C .

7.1.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Preparación de la MIX para PCR

La solución que se detalla a continuación corresponde a un tubo de reacción:

H ₂ O MiliQ.....	12,2 µl
Buffer 10 x	2 µl
dNTPs (0.2 µM).....	2 µl
Cl ₂ Mg (1.5mM).....	0,6 µl
Taq DNA Polimerasa (0.5 unidades).....	0,2 µl

En tubos de PCR se agregó:

PCR MIX.....	17 µl
Cebador sentido (2 µM).....	1 µl
Cebador antisentido (2 µM).....	1 µl
ADN genómico	1 µl

Guardarlos productos de la reacción de la PCR en heladera a -20°C.

Programa de amplificación

Incubar en el Termociclador con los siguientes ciclos:

95°C.....2 minutos (etapa de desnaturalización)	} 36 ciclos
94°C.....40 segundos (desnaturalización)	
52°C.....45 segundos (annealing)	
72°C.....90 segundos (polimerización)	
72°C.....7 minutos	
16°C..... ---	

7.1.3 Calculo de distancia por el método Modified Nei-Gojobori method (Jukes-Cantor) entre las secuencias de nucleótidos de *Ombrophytum subterraneum* y *Baccharis sp.*

1. Iniciar programa MEGA 6.
2. Seleccionar del Menú: Distances-Compute Pair-wise.
3. Dentro de Sustitution elegir:
 - a. Substitution Type = Syn-Nonsynonymous
 - b. Model/Method = Modified Nei-Gojobori method (Jukes-Cantor)
4. Luego seleccionar Compute.

7.1.4 Extracción de ARN

7.1.4.1 Protocolo Extracción de ARN, kit Con TRIZOL

1. Procesar las muestras en nitrógeno líquido utilizando mortero.

2. Colocar 0,8 g de muestra en cada tubo de 2 ml.
 3. Agregar 1ml de TriZOL a cada tubo.
 4. Reposar el homogenizado por 5 minutos a temperatura ambiente para la disociación de proteínas.
 5. Agregar 200 µl de cloroformo en cada tubo.
 6. Agitar vigorosamente por 15 segundos aproximadamente, hasta verlo con una consistencia lechosa.
 7. Dejar reposar por 3 minutos a temperatura ambiente.
 8. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm a 4°C.
- Obtención de dos fases: → Fase Roja: ADN y proteínas
 → Fase acuosa (incolora/amarillenta): ARN
9. Transferir 400 µl de la fase acuosa (parte superior) a un nuevo tubo.
 10. Agregar 500 µl de Isopropanol.
 11. Incubar por 30 minutos en heladera a 4°C.
 12. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C.
 13. Eliminar el sobrenadante con micropipeta y despegar el pellet.
 14. Lavar el pellet (ARN) con 1 ml de etanol 75% (Preparado con agua tratada con DEPC). Invertir el tubo para un correcto lavado del ARN.
 15. Centrifugar 5 min a 7.500 rpm a 4°C.
 16. Eliminar el sobrenadante con micropipeta.
 17. Dejar secar el pellet (ARN) por 5 minutos aproximadamente.
 18. Resuspender con 30 µl de agua tratada con DEPC.
 19. Guardar en freezer a -80°C.
 20. Para el sembrado en gel de agarosa 0,8%, lavar la cuba de electroforesis con SDS.
 21. Mezclar 10 µl de la muestra de ARN y 15 µl de Buffer de ARN (Con Formamida). Resuspender.
 22. Sembrar 20 µl de la solución anterior.
- Se realizó el mismo protocolo en otras cuatro oportunidades, con la diferencia que en los pasos 7 y 11, el homogeneizado fue mantenido en hielo en lugar de a temperatura ambiente o en heladera.

Electroforesis de muestras de ARN

1. Disolver 1,6 g de agarosa en 200 ml de buffer TBE (al 0,5x), utilizar microondas. Para obtener un gel de agarosa al 0,8%.
2. Armar la cuba de electroforesis. Lavar con S.D.S.
3. Colocar la cuba en hielo.
4. Mezclar 10 µl de la muestra (Obtenida en el ítem 20) y 15 µl de Buffer de ARN (Con Formamida). Resuspender.
5. Sembrar 20 µl de la muestra anterior con 1 µl de buffer de siembra (6x).
6. Correr el gel durante 45 minutos a 90 V.
7. Teñir el gel con bromuro de Etidio.
8. Observar el gel en el fotodocumentador.

7.1.4.2 Protocolo Extracción de ARN, específico para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos (Zeng et al., 2002).

1. Preparar el buffer de extracción.

Para 15 ml de Buffer de extracción

- CTAB 0,3 g
- P.V.P. 0,3 g
- Tris 4,5 ml
- EDTA (0,5 M) 0,75 ml
- NaCl (5 M) 6 ml
- Espermidina 0,015 g
- Beta-mercaptoetanol 300 µl
- H₂O tratada con DEPC 2,5 ml

Calentar en el agitador a 150°C y 500 rpm hasta que se disuelva. Mantener en baño a 65°C, hasta su uso.

2. Procesar las muestras, utilizando el mortero y con Nitrógeno líquido.
3. Colocar 0,8 g de muestra en cada tubo de 2 ml.
4. Agregar 750 µl de buffer de extracción a cada tubo y mezclar por inversión.
5. Colocar en baño de agua a 65°C por 10 minutos, invertir cada 2 minutos.
6. Agregar 750 µl de cloroformo-Isoamílico 24:1 en cada tubo.
7. Agitar vigorosamente por 15 segundos aproximadamente, hasta observar dos fases.
8. Centrifugar 10 min a 13.500 rpm a 4°C.
9. Tomar el sobrenadante y transferir a un nuevo tubo, que estaba en hielo.
10. Agregar 1ml de cloroformo-isoamílico 24:1 en cada tubo.
11. Centrifugar 10 min a 13.500 rpm a 4°C.
12. Tomar el sobrenadante y transferir a un nuevo tubo, que estaba en hielo.
13. Agregar 100 µl de NaOAc y 600 µl de Isopropanol, mezclar con cuidado.
14. Guardar en heladera a - 80°C durante 10 minutos.
15. Centrifugar 10 min a 13.500 rpm a 4°C.
16. Retirar y eliminar el sobre nadante, con cuidado. Dejar solamente el pellet.
17. Agregar 500 µl de TE, resuspender con cuidado, logrando la disolución del pellet. Resuspender.
18. Agregar 125 µl de LiCl (10 M) y mezclar con cuidado.
19. Guardar en heladera a 4°C, en hielo durante toda la noche.
20. Centrifugar 30 min a 13.500 rpm a 4°C.
21. Retirar y eliminar el sobre nadante, con cuidado.
22. Agregar 1 ml de Etanol al 70% a - 20°C y resuspender suavemente.
23. Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C.
24. Eliminar el Etanol, con micropipeta, dejar solamente el pellet.
25. Dejar secar el pellet por 5 minutos aproximadamente, con el tubo ependorff en hielo y abierto.
26. Añadir con 100 µl de H₂O tratada con DEPC.

27. Guardar en freezer a -80°C .

Se realizó el mismo protocolo en cuatro oportunidades.

Electroforesis

1. Disolver 1,6 g de agarosa en 200 ml de buffer TBE (al 0,5x), utilizar microondas. Para obtener un gel de agarosa al 0,8%.
2. Armar la cuba electrolítica. Lavar con S.D.S.
3. Colocar la cuba en hielo.
4. Mezclar 10 μl de la muestra (Obtenida en el ítem 20) y 15 μl de Buffer de ARN (Con Formamida). Resuspender.
5. Sembrar 20 μl de la muestra anterior con 1 μl de loading buffer (6x).
6. Correr el gel durante 45 minutos a 90 V.
7. Teñir el gel con bromuro de Etidio.
8. Observar el gel en el fotodocumentador.

Tratamiento con DNAsa

Las muestras de ARN obtenidas en el método de extracción de ARN específico para muestras altamente viscosas y ricas en polisacáridos (Zeng *et al.*, 2002), fueron tratadas con DNAsa.

1. Colocar en un tubo:
 - a. 16 μl de la muestra (ARN).
 - b. 2 μl de DNAsa I, Amplification Grade 1U/ μl
 - c. 2 μl 10X de DNAsa I Reaction Buffer.
2. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Inactivar la DNAsa I con la adición de 1 μl de 25 Mm EDTA.
4. Colocar en baño de agua a 65°C por 10 minutos.
5. Guardar en heladera a -80°C .

Síntesis de ADNc (retrotranscripción)

Se partió de las muestras de ARN tratadas con DNAsa.

1. Colocar en un tubo:
 - a. 11 μl de ARN.
 - b. 1 μl de Oligo dT (IDT Ready Made Primer)
 - c. 1 μl de dNTPs 10 μM
2. Incubar por 5 minutos a 65°C en termociclador.
3. Incubar por 1 minuto en hielo.
4. Centrifugar 30 segundos.
5. Agregar en cada tubo:
 - a. 4 μl 5X First-Strand Buffer.
 - b. 1 μl de 0,1 M DTT.
 - c. 1 μl de Superscript III RT.

6. Mezclar bien con micropipeta.
7. Incubar en el Termociclador con las siguientes etapas:
50°C..... 45 minutos
70°C..... 15 minutos
8. Guardar en heladera a 4°C.

7.1.5 Reacción en cadena de la ADN polimerasa a partir del ADNc (RT-PCR)

Preparación de la mezcla para RT-PCR

La mezcla de reacción que se detalla a continuación, corresponde a un tubo de reacción:

H ₂ O MiliQ.....	10,2 µl
Buffer 10 x	2 µl
dNTPs (2µM).....	2 µl
Cl ₂ Mg (50mM).....	0,6 µl
Taq DNA Polimerasa.....	0,2 µl
En cada tubo de PCR se agregó:	
PCR mezcla.....	17 µl
Primers sense (2 uM).....	1 µl
Primers Antisense (2 uM).....	1 µl
ADNc	3 µl

Programa de amplificación

1. Incubar en el Termociclador con los siguientes ciclos:

92°C.....2 minutos (etapa de desnaturalización)	}	36 ciclos
94°C.....40 segundos (desnaturalización)		
52°C.....45 segundos (annealing)		
72°C.....1 minuto y 30 segundos (polimerización)		
72°C.....7 minutos		
16°C..... tiempo indefinido		
2. Guardar en heladera a -20°C.

7.2 Tablas

Tabla 7.1. Secuencia de los cebadores utilizados en las PCR y RT-PCR.

Organela	Gen	Primer forward	Primer reverse
Mitocondria	<i>atp1</i>	<i>atp1</i> F2 5' TCGGTCGAGTGGTCTCAGTTG 3'	<i>atp1</i> R1 5' GTGGCATTTCGATCACAGAATC 3'
	<i>atp8</i>	<i>atp8</i> F 5' ATGCCTCAACTKGATMAATTBAC 3'	<i>atp8</i> R 5' AACATGKRTKAGCATTATKTY 3'
	<i>ccmC</i>	<i>ccmC</i> F 5' TTCTCATTGGATCTYGGTTGT 3'	<i>ccmC</i> R 5' TCCTTCTCGAGCTTCWATTTTC 3'
	<i>Cob</i>	<i>cob</i> 1 100 F 5' CCGAGCAATCTTAGTTATTGG 3'	<i>cob</i> 4 1140 Q 5' AATTCCTCTTCCAACCTCGTCC 3'
	<i>rpl5</i>	<i>rpl5</i> F 5' CGAAGATGTATCACGTCAGG 3'	<i>rpl5</i> R 5' GGTGGTAAAGTCTCATCTTG 3'
	<i>cox1</i>	<i>cox</i> 1-3 5' CATCTCTTTYTGTTCTTCGGT 3'	IP56 5' GAGCAATGTCTAGCCC 3'
		<i>cox</i> 1-4 5' ACCGRATCCAGGCAGAATGRG 3'	<i>cox</i> 1-8 5' GTAGAGTCTTATAAGGTAGT3'
		<i>cox</i> 1-3 5' CATCTCTTTYTGTTCTTCGGT 3'	<i>cox</i> 1-6 5' AGCTGGAAGTTCTCCAAAAGT 3'
		<i>cox</i> 1-4 5' ACCGRATCCAGGCAGAATGRG 3'	int 1.2 kf 5' AGCATGGCTAGCTTTCCTAGA 3'
		<i>cox</i> 1-6 5' AGCTGGAAGTTCTCCAAAAGT 3'	<i>cox</i> 1-10 5' TGACTACTATCAAAGTAGA 3'
		<i>cox</i> 1-1 5' AYGAMAAATCYGGTYGATGG 3'	<i>cox</i> 1-4 5' ACCGRATCCAGGCAGAATGRG 3'
		<i>cox</i> 1-3 5' CATCTCTTTYTGTTCTTCGGT 3'	<i>cox</i> 1-10 5' TGACTACTATCAAAGTAGA 3'

		cox 1-4 5' ACCGRATCCAGGCAGAATGRG 3'	IP53 5' GGAGGAGTTGATTTAGC 3'
		cox 1-3 5' CATCTCTTTYTGTTCTTCGGT 3'	IP53 5' GGAGGAGTTGATTTAGC 3'
Núcleo	<i>ADN ribosomal 18S *</i>	366 F 5' GTCTGCCCTATCAACT 3'	1137 R 5' AAGAACGGCCATGCACCACC 3'
Cloroplasto	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> 50 F 5' CTTCTACTGGTACATGGAC 3'	<i>rbcL</i> 50 R 5' CGTGAATATGATCTCCACC 3'
	<i>matK</i>	<i>matK</i> 1 5' GTATCGCACTATGTATCATTGA 3'	<i>matK</i> 1420 R 5' TCGAAGTATATACTTTATTTCG 3'

(*): Cebadores diseñados especialmente para la familia Balanophoraceae.