



# Universidad del Mar Campus Puerto Escondido

## **Caracterización genética de *Fouquieria purpusii* T.S. Brandegees (Fouquieriaceae: Ericales) a partir de seis regiones de ADN de cloroplasto (cpADN)**

**Tesis que para obtener el Título de  
Licenciado en Biología**

**PRESENTA:**

**Marilyn Vásquez Cruz**

**Director de Tesis: Dr José Arturo de Nova Vázquez**

**Puerto Escondido, Oaxaca, Junio del 2012**

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. José Arturo de Nova Vázquez en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido con apoyo del Proyecto IN202310 PAPIIT-UNAM” otorgado a la Dra. Susana Magallón Puebla. Parte del entrenamiento fue recibido en el Laboratorio de Biología Molecular de la Red de Biología Evolutiva del Instituto de Ecología A.C. por parte de la Dra. Victoria Sosa Ortega.

## DEDICATORIA

*Con amor y cariño especial para mi mamá Amada por saber educarme y estar al pendiente de mí todo este tiempo. A mi mamá Sandra Lorena porque gracias a su amor y esfuerzo he logrado llegar hasta aquí. A la "Titi" por el tiempo que me ha dedicado.*

*A mis hermanos Irving, Mailing y Jair por su amor y cariño incondicional. Al tío Alex y al abuelo Pedro por apoyarme y enorgullecerse de mis logros. A mis sobrinos Vanessa y Emerick Irving por ser una luz y llenarme de alegría.*

*A ti Emmanuel por ser esa persona especial que sabe tenerme paciencia, por todos los momentos vividos y por compartir conmigo esta etapa de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

- A la UMAR
- Al “Proyecto IN202310 PAPIIT-UNAM” a cargo de la Dra. Susana Magallón Puebla por la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de tesis.
- Al Dr. José Arturo de Nova por todo su apoyo y asesoramiento en la realización de este trabajo.
- A la M. en C. Ana Claudia Sánchez Espinosa por las facilidades para trabajar en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar.
- A la Dra. Victoria Sosa por el entrenamiento obtenido en el laboratorio de Biología Molecular de la Red de Biología Evolutiva del Instituto de Ecología A.C.
- A mis revisores: la Dra. Susana Magallón Puebla, la M. en C. Ana Claudia Sánchez Espinosa, la M. en C. Julieta Karina Cruz Vázquez y el Dr. José Luis Villarruel Ordaz por sus grandes aportaciones en la revisión de este trabajo.
- Al técnico Arith Pérez por su apoyo en el laboratorio de Biología Molecular de la Red de Biología Evolutiva.
- A Diego F. Ángulo por los comentarios y aportes realizados a este trabajo.
- A Guillermo Huerta, Etelvina Gándara, Sara Covarrubias, Leonardo Amarilla, Tania Hernández por sus consejos y apoyo durante la estancia en el Laboratorio de Biología Molecular.
- A Emmanuel Torres y Nancy Hernández por su colaboración en la colecta de los ejemplares.
- A todos mis profesores de la Licenciatura por ser partícipes en mi formación como Bióloga.
- A la M. en C. Helisama Colín Martínez por su amistad y apoyo incondicional así como sus consejos durante toda la carrera.
- A la Profesora J. Edith Torres Guzmán por su cariño y todos sus consejos.
- A Tania y Batlin por compartir buenos momentos como compañeros en la Universidad

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 Familia <i>Fouquieriaceae</i>	<b>4</b>
2.2 Descripción de <i>Fouquieria purpusii</i>	<b>9</b>
2.3 Rareza y endemismo	<b>12</b>
2.4 Genoma del cloroplasto	<b>13</b>
2.5 Estudios en secuencias no codificantes del cloroplasto	<b>15</b>
2.6 Amplificación de las regiones no codificantes	<b>17</b>
2.7 Regiones de estudio en <i>Fouquieria purpusii</i>	<b>18</b>
- Región <i>ndhJ-trnF</i>	<b>18</b>
- Región <i>rpl14-rps8-infA-rpl36</i>	<b>18</b>
- Región <i>rpl32-trnL</i>	<b>18</b>
- Región <i>ndhF-rpl32</i>	<b>19</b>
- Región <i>3'rps16-5'trnK</i>	<b>19</b>
- Región <i>trnS-trnG</i>	<b>19</b>
2.8 Estimación de la variación genética	<b>20</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
4.1 Objetivo General	<b>22</b>
4.2 Objetivos específicos	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>6. ÁREA DE ESTUDIO</b>	<b>24</b>

<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
7.1 Muestreo y colecta de material	26
7.2 Extracción de ADN	28
7.3 Reacciones PCR	29
7.3.1 Optimización de las reacciones de PCR	29
- Región <i>ndhJ-trnF</i>	29
- Región <i>rpl14-rps8-infA-rpl36</i>	30
- Región <i>ndhF-rpl32</i>	30
- Región <i>rpl32-trnL</i>	30
- Región <i>3'rps16-5'trnK</i>	31
- Región <i>trnS-trnG</i>	31
7.3.2 Reacciones finales de PCR	32
7.4 Secuenciación y edición de fragmentos	32
7.5 Estimación de la variación genética	33
7.5.1 Distancias genéticas	33
7.5.2 Determinación de la estructura genética	34
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
8.1 Amplificación de las regiones del cloroplasto	35
8.2 Variación genética	38
8.3 Análisis de la distancia genética	42
8.3.1 Filograma	44
8.4 Estructura genética de la población	45
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
9.1 Análisis por región	47
9.2 Variación genética en <i>Fouquieria purpusii</i>	50
9.3 Distancias genéticas y estructura genética	54
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>74</b>

## INDICE DE ABREVIATURAS

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**AFLPs:** Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, por sus siglas en inglés

**ca:** cerca

**pb:** pares de bases

**kpb:** kilopares de bases

**LSC:** Región larga de copia única, por sus siglas en inglés

**SSC:** Región corta de copia única, por sus siglas en inglés

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés

**µl:** microlitros

**DNTP's:** Desoxinucleótidos trifosfato, por sus siglas en inglés

**Reactivo Q:** Reactivo que facilita las reacciones de cadena de la polimerasa

**DnaSP:** Software para el análisis del polimorfismo de ADN, por sus siglas en inglés

**MEGA:** Software para el análisis genético evolutivo molecular, por sus siglas en inglés

**BIOEDIT:** Programa para el alineamiento y edición de secuencias biológicas.

**GARLI:** Algoritmo genético para la inferencia rápida de la máxima verosimilitud, por sus siglas en inglés

**GTR:** Modelo General de Tiempo reversible, por sus siglas en inglés

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Filogenia del género *Fouquieria*. (de Nova, com. pers. 2011) **7**
- Figura 2.** Descripción de *Fouquieria purpusii*: A) Hábito, B) Rama con inflorescencia, C) Flor, D) Antera, E) Fruto. (Tomado de Ezcurra y Medina, 1997) **11**
- Figura 3.** *Fouquieria purpusii* (Fotos de Marilyn Vásquez y José Arturo de Nova tomadas en el municipio de Coatepec, Puebla, Mex. **12**
- Figura 4.** Genoma del cloroplasto. En los recuadros rojos se marcan las regiones utilizadas para caracterizar la variabilidad genética en *Fouquieria purpusii*. Tomado y modificado de Lee et al. (2006) **14**
- Figura 5.** Mapa escalado de 13 regiones no codificantes del cloroplasto (basados en el genoma del cloroplasto de *Nicotiana* (Wakasugi et al., 1998). **L-V**: Orientación y posición de los genes. **A-K**: Posición de las 21 regiones descritas por Shaw et al. (2005). La posición específica de cada una de las 13 regiones está indicada por una serie de números al principio y final de cada región. El nombre de los genes está representado con letras itálicas debajo de cada región y la amplificación y el nombre de los primers están en letras romanas arriba con flechas. La longitud de las regiones no codificantes está centrada debajo de cada región intergénica espaciadora y el intrón. Shaw et al. (2005) **16**
- Figura 6.** Localización de la Reserva de la Biósfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fuentes de información cartográfica. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). **25**
- Figura 7.** Puntos de muestreo en el intervalo de distribución de *Fouquieria purpusii*. Localidad A: Axusco; Localidad B: Autopista Oax-Puebla; Localidad C: Coatepec, Puebla. Tomada del Google Earth **26**
- Figura 8.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra las bandas de ADN de *Fouquieria purpusii* usando el método de CTAB2x de Cota-Sánchez et al. (2006), modificado **28**



- Figura 9.** Análisis de cromatogramas en Sequencher v4.1.4 **32**
- Figura 10.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra las bandas amplificadas de la región *ndhF-rpl32* **36**
- Figura 11.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra las bandas amplificadas de la región *rpl14-rps8-infA-rpl36* **36**
- Figura 12.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra las bandas amplificadas de la región *rpl32-trnL* **37**
- Figura 13.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra las bandas amplificadas de la región *3'rps16-5'trnK* **37**
- Figura 14.** Filograma generado a partir de los cuatro marcadores estudiados a través de máxima verosimilitud usando el modelo General de Tiempo Reversible (GTR). Se usaron secuencias de *Fouquieria fasciculata* para enraizar el árbol. Los números en rojo indican el porcentaje de bootstrap **44**
- Gráfica1.** La relación entre la distancia geográfica y genética de las muestras representativas de las poblaciones de *Fouquieria purpusii*. La prueba de Mantel revela que la distancia genética no está determinada por la distancia geográfica ( $R^2$  de Mantel= 0.0458). La variable de la distancia genética fue calculada con el modelo de sustitución nucleotídica GTR. La variable de la distancia geográfica fue calculada como  $\text{Log}(\text{dist}+1)$ .XLSTAT v2012.01 (Addinsoft, 2012) **46**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Secuencia de los primers usados en las reacciones de amplificación y secuenciación de los fragmentos de cloroplasto. La simbología corresponde a su ubicación dentro del genoma del cloroplasto (figura 5). Tomado y modificado de Shaw et al. (2005)	<b>17</b>
<b>Tabla 2.</b>	Lista de los individuos colectados de <i>Fouquieria purpusii</i> . Los especímenes 31,32 y 33 corresponden a individuos trasplantados en el parque de la localidad de Coatepec, extraídos de la población núcleo	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b>	Secuencia de los primers utilizados para cada uno de los fragmentos estudiados (Shaw et al., 2007)	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b>	Temperatura del templado obtenida para cada uno de los marcadores	<b>35</b>
<b>Tabla 5.</b>	Variación genética en <i>Fouquieria purpusii</i> : <b>m</b> =Número de secuencias, <b>S</b> =Número de sitios variables $\Theta=ps/a1$ , $\pi$ =Diversidad nucleotídica, <b>D</b> =Prueba estadística de Tajima, <b>K</b> =Número promedio de diferencias nucleotídicas, % <b>G-C</b> =Porcentaje de Guanina y Citocina presente en cada marcador	<b>38</b>
<b>Tabla 6.</b>	Variación genética en el gen <i>rps8</i> y en la proteína <b>S8</b> : <b>m</b> =Número de secuencias, <b>S</b> =Número de sitios variables, <b>h</b> =haplotipos, $\Theta=ps/a1$ , $\pi$ =Diversidad nucleotídica, <b>D</b> =Prueba estadística de Tajima. *Análisis en secuencias nucleotídicas. **Análisis en secuencias con aminoácidos	<b>39</b>
<b>Tabla 7.</b>	Secuencias de los 19 haplotipos correspondientes a los cuatro marcadores analizados en <i>Fouquieria purpusii</i>	<b>40</b>
<b>Tabla 8.</b>	Análisis de la diversidad haplotídica total de las cuatro regiones	<b>41</b>
<b>Tabla 9.</b>	Resultados del análisis en JModeltest v0.1.1 que indica los valores de tasas de sustitución (K), frecuencias de bases (freqA, freqC, freqG, freqT), proporción de sitios variables (R) y distribución gama (gama shape)	<b>42</b>

**Tabla 10.** Matriz de distancias genéticas entre las secuencias usando del modelo GTR calculado con JModeltest v0.1.1. Cada valor representa la tasa de sustitución de nucleótidos/sitio. Las muestras 13B, 14B, 17C, 19C, 24C, 26C, 27C, 28C, 29C, 30C, 31C y 32C fueron excluidas de los análisis puesto que no pudieron amplificarse las regiones estudiadas. **43**

**Tabla 11.** Distancia geográfica entre las tres localidades muestreadas en el intervalo de distribución de *Fouquieria purpusii* **45**

## Resumen

El modo conservativo de evolución es la principal característica del ADN del cloroplasto que lo hacen una molécula extremadamente valiosa para estudios de variación genética y filogenéticos. Sin embargo, el ser un genoma muy conservado puede ser una desventaja que puede limitar la cantidad de variación genética encontrada a niveles intraespecíficos. El objetivo principal de este trabajo fue cuantificar la variación genética presente en seis regiones de ADN de cloroplasto en las poblaciones de *Fouquieria purpusii* (*ndhJ-trnF*, *rpl14-rps8-infA-rpl36*, *ndhF-rpl32*, *rpl32-trnL*, *3'rps16-5'trnK* y *tmS-trnG*) para compararlas entre sí y determinar la estructura genética de las poblaciones. *F. purpusii* es una especie microendémica con poblaciones pequeñas presente en un área limitada de la región de la cañada en la reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán. Presenta un enorme grado de especificidad al hábitat en afloramientos rocosos de las zonas más áridas de la región. Los niveles de variación encontrados en las cuatro de las seis regiones propuestas (*rpl14-rps8-infA-rpl36*, *ndhF-rpl32*, *rpl32-trnL* y *3'rps16-5'trnK*) fueron distintos a los reportados en estudios filogeográficos donde se han utilizado para comparar la variación entre familias, por ejemplo *ndhF-rpl32* y *rpl32-trnL* han llegado a presentar cerca del 50% de la variación total, pero en este trabajo resultaron ser dos regiones muy conservadas. Las regiones más variables fueron *rpl14-rps8-infA-rpl36* con 23 sitios polimórficos y el 22.4% de la variación genética total encontrada y *3'rps16-5'trnK* con 46 sitios polimórficos que corresponde al 69.9% de la variación total, *ndhF-rpl32* solo presentó 9 sitios polimórficos y *rpl32-trnL* solo 7. Ambos ocupan el 4% de la variación presente en las poblaciones de *F. purpusii*. El modelo de sustitución que mejor se ajusta a los marcadores fue el GTR (modelo general de tiempo reversible) con el que se obtuvo un filograma con distancias genéticas corregidas. La agrupación de los diferentes individuos incluidos no muestra una estructura definida que corresponda a las tres poblaciones definidas encontrando individuos de diferentes poblaciones cercanos genéticamente. Asimismo las tasas de sustituciones nucleotídicas resultan ser muy bajas a lo esperado. La prueba de Mantel muestra que no hay correlación entre las distancias genéticas de los individuos con las distancias geográficas lo que permite inferir que existe un alto flujo genético entre las poblaciones de *F. purpusii*, así como la ausencia de una estructura genética definida.