



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

## IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE SIETE ESPECIES DEL GÉNERO *Cuscuta* L. DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y FORESTAL EN MÉXICO

SONIA MONROY MARTÍNEZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe SONIA MONROY MARTÍNEZ,

Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE SIETE ESPECIES DEL GÉNERO CUSCUTA L. DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y FORESLTAL EN MÉXICO

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 04 de NOVIEMBRE de 2019

Firma del  
Alumno (a)

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Identificación morfológica y molecular de siete especies del género *Cuscuta* L. de importancia agrícola y forestal en México**, realizada por la alumna: **Sonia Monroy Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO

DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES

ASESORA

DRA. OBDULIA LOURDES SEGURA LEÓN

ASESOR

DR. CLEMENTE DE JESÚS GARCÍA ÁVILA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2019

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE SIETE ESPECIES DEL  
GENÉRO *Cuscuta* L. DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y FORESTAL  
EN MÉXICO**

Sonia Monroy Martínez, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

**RESUMEN**

La importancia del diagnóstico fitosanitario radica principalmente en la correcta identificación de los especímenes, que permite conocer el género y especie a la que corresponden, más cuando se trata de plagas cuarentenarias. *Cuscuta* spp., es considerada una planta parásita, que afecta a sus hospedantes, ocasiona graves daños y pérdidas económicas y finalmente la muerte de sus hospedantes. La identificación de las especies de *Cuscuta* se ha basado en métodos morfológicos tradicionales; sin embargo, la determinación a nivel de especie es compleja por la metodología y los tiempos que implica; el objetivo de este trabajo fue generar una guía ilustrada que incluyera las características que apoyen a la identificación de siete especies de *Cuscuta* de importancia agrícola y forestal en México, así como la corroboración de esta identificación mediante el uso de los marcadores moleculares ITS y trnL-F. Se usaron las especies de *Cuscuta campestris*, *C. chinensis* var. *applanata*, *C. tinctoria*, *C. costaricensis*, *C. corymbosa* var. *stylosa*, *C. mitriformis*, y *C. indecora* que se tenían depositadas el herbario del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, se identificaron las especies con las claves taxonómicas de Yuncker (1932; 1965), Costea y Tardif (2006), Costea *et al.* (2006, 2011, 2011a, 2012, 2013), medición de estructuras y comparación de ejemplares, así mismo, la identificación molecular con los marcadores moleculares ITS y trnL-F, los fragmentos se amplificaron y se secuenciaron, con lo que se realizó un análisis filogenético. Los resultados de esta investigación fueron una guía pictográfica en donde se presentan las principales características taxonómicas que ayudan a la identificación de las siete especies de *Cuscuta*, así como la obtención de los perfiles genético de los marcadores ITS y trnL-F de siete especies de *Cuscuta* de importancia agrícola y forestal para México.

**Palabras clave:** Alfalfa, *tinctoria*, herbario, PCR, trnL-F

**MORFOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF SEVEN SPECIES OF  
THE GENERO *Cuscuta* L. OF AGRICULTURAL AND FOREST IMPORTANCE  
IN MEXICO**

Sonia Monroy Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

**ABSTRACT**

The importance of the phytosanitary diagnosis lies mainly in the correct identification of the samples, which allows knowing the the species to which it corresponds, more when it comes to quarantine pests. *Cuscuta* spp., Considers a parasitic plant, which affects the host species, causing severe damage and economic losses, in most cases causing the death of its hosts. The identification of the species of *Cuscuta* has been based on traditional morphological methods; however, the determination of the species level is complicated due to the methodology and the times involved; the objective of this work was to generate an illustrated guide that includes the characteristics that support the identification of seven *Cuscuta* species of agricultural and forestry importance in Mexico, as well as the corroboration of this identification through the use of the ITS and trnL-F molecular markers, samples of the species of *Cuscuta campestris*, *C. chinensis* var. *applanata*, *C. tinctoria*, *C. costaricensis*, *C. corymbosa* var. *stylosa*, *C. mitriformis*, and *C. indecora* found in the herbarium of the National Phytosanitary Reference Center, the species were identified with the taxonomic keys of Yuncker (1932; 1965), Costea and Tardif (2006), Costea et al. (2006, 2011, 2011a, 2012, 2013), measurements of structures and comparison of examples, likewise, the molecular identification of was performed with ITS y trnL-F molecular markers, the fragments were amplified and sequenced, then a phylogenetic analysis was performed. The results of this research were a pictographic guide where the main taxonomic characteristics that help to identify the seven species of *Cuscuta* are presented, as is the case of the perfection of the genetics of the ITS and trnL-F brands of their particular agricultural and forestry importation to Mexico.

**Keywords:** Alfalfa, *tinctoria*, herbal, PCR, trnL-F

## DEDICATORIA

A mis padres, por apoyarme en cada decisión y proyecto que he realizado en mi vida. Por confiar y creer en mí y en mis expectativas, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Los amo.

A mis hermanos, por estar siempre a mi lado y apoyarme a pesar de la distancia, les agradezco su cariño y comprensión. Gracias por todo.

A mis sobrinos quienes con sus risas y travesuras me han ayudado a aligerar mi estrés. Estoy segura que la vida les regresara toda la felicidad y el amor que me han dado.

*Atrevete y lucha por tus sueños.*

*“A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto, y de pronto toda nuestra vida se concentra en un solo instante.” Oscar Wilde.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal, quien me dio la oportunidad de ocupar sus equipos e instalaciones, principalmente en los laboratorios de malezas y de biología molecular para realizar mi proyecto de investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por darme la oportunidad para realizar mis estudios de maestría y a todos los profesores que me formaron.

A mis asesores, el Dr. Dionicio Alvarado Rosales, la Dra. Obdulia Lourdes Segura León y al Dr. Clemente de Jesús García Avila por su dedicación, enseñanzas, y apoyo durante mi trabajo de investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por sus observaciones y comentarios de la tesis.

A Natty quien ha estado en mi vida desde que estábamos en la licenciatura, quien más que una amiga es mi hermana, porque siempre tienes un consejo para mí, me escuchas y apoyas, has estado conmigo en los momentos de mi vida más tristes, pero también en los más felices y quiero que lo sigas haciendo. Nadia, quien diría que llegarías a mi vida tan inesperadamente, pero lo agradezco de forma infinita, gracias a ti aprendí a quererme más, a luchar por mis sueños y no darme por vencida, tú siempre tan insistente en salir y yo en quedarme en casa, te quiero mucho por qué hiciste que saliera de mi madriguera y a que viera la vida de otra forma, sé que aún nos faltan muchas más aventuras por vivir. Kary, de las cinco tú eras la que siempre hace que ponga los pies en la tierra, tus consejos y tu apoyo incondicional son únicos, aunque sé que eres fuerte, también sé que eres una chica súper linda y tierna, tienes un gran corazón. Monse, eres una excelente persona, con quien comparto aventuras, risas, cantos y vivencias, eres la chispa que faltaba a la hora de nuestras reuniones, tus ocurrencias son únicas, no dejes de ser esa persona amorosa y cariñosa. Naye, gracias por compartir tu vida conmigo, eres muy fuerte y aunque te negabas a que yo te abrazara al final creo que no te importo, porque

dentro de ti existe una mujer distraída pero fuerte, que a pesar de las adversidades lucha por lo que quiere. Karen, en verdad que amo nuestras pláticas, a pesar de la distancia sigo pensando que eres excepcional, porque hiciste lo que muchos quieren hacer y no se atreven por no salir de su confort, te quiero. Javier, gracias a ti he aprendido muchas cosas en mi ámbito profesional, desde que entre a trabajar me brindaste tu apoyo y tu sincera amistad. A ustedes quiero agradecerles que hayan estado conmigo desde que inicie este camino, porque han sido sus consejos, su apoyo, sus risas, su preocupación y su cariño gracias por tenderme una mano y por tener una sonrisa para mí cuando estaba triste, porque me han ayudado a seguir adelante cuando pensaba que ya no podía más y que iba a desistir, sepan que los amo y que los llevo siempre en mis pensamientos.

A Mario, Isra, Johan y Fer quienes hacen mi estancia en la oficina y en el laboratorio mucho más amena, por sus enseñanzas y apoyo cuando tenía dudas en lo que estaba haciendo, y sobre todo por esas pláticas y risas. Agradezco su cariño y amistad.

A mis compañeros de maestría Sandy, Naye, Vicente, Maggie, Otilio y Angy ya que juntos iniciamos este proyecto de realizar la maestría mientras trabajamos y sé que han existido días en los que no sabemos cómo continuar la investigación, cuando de repente algo falla en lo que teníamos planeado, pero saben algo, al final de este proceso se darán cuenta que valió la pena el esfuerzo, que a pesar de las noches sin dormir tendrán la satisfacción de haberlo logrado.

Gracias a todos los que me apoyaron y creyeron en mí.

*Siempre que dudes de lo lejos que puedes llegar... solo recuerda lo lejos que has llegado.  
Recuerda todo lo que has enfrentado, todas las batallas que has ganado y todos los temores  
que has superado.*

## CONTENIDO

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN .....   | iv  |
| ABSTRACT .....  | v   |
| LISTA DE CUADROS .....  | xi  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | xii |
| INTRODUCCIÓN GENERAL .....  | 1   |
| OBJETIVOS .....   | 3   |
| Objetivo general .....  | 3   |
| Objetivos específicos .....   | 3   |
| HIPÓTESIS .....   | 3   |
| REVISIÓN DE LITERATURA .....  | 4   |
| Origen del género <i>Cuscuta</i> .....  | 4   |
| Clasificación taxonómica .....  | 4   |
| Biología, hábitos, ciclo de vida y diseminación .....   | 5   |
| Distribución a nivel mundial y nacional .....   | 8   |
| Importancia económica .....   | 9   |
| Interacción de <i>Cuscuta</i> con plantas resistentes .....   | 10  |
| Manejo de <i>Cuscuta</i> .....  | 11  |
| Uso del código de barras para la identificación de <i>Cuscuta</i> .....   | 12  |
| Sistema de diagnóstico .....  | 14  |
| Diagnóstico Molecular .....   | 14  |
| Literatura citada .....   | 19  |
| CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE SIETE ESPECIES DEL<br>GENERO <i>Cuscuta</i> DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA PARA MÉXICO ..... | 32  |
| 1.1. Introducción .....   | 32  |
| 1.1.2. Diagnóstico por caracteres morfológicos .....  | 33  |
| 1.2. Descripción y morfología de <i>Cuscuta</i> .....   | 33  |
| 1.3 Materiales y métodos .....  | 37  |
| 2.4. Resultados y discusión .....   | 41  |
| 1.4.1. Caracteres morfológicos para la identificación de siete especies de<br><i>Cuscuta</i> .....                              | 49  |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.5. Conclusiones.....   | 61        |
| 2.6. Literatura citada .....   | 61        |
| <b>CAPITULO II. PERFIL GENÉTICO DE LAS REGIONES ITS Y TRNL-F DE SIETE<br/>ESPECIES DE CUSCUTA DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y FORESTAL PARA<br/>MÉXICO .....</b> | <b>65</b> |
| 2.1. Introducción .....  | 65        |
| 2.2. Materiales y métodos.....   | 66        |
| 2.2.1. Selección de muestras y marcadores moleculares. ....  | 66        |
| 2.2.2. Extracción de DNA.....  | 67        |
| 2.2.3 Amplificación de los marcadores ITS y TRNL-F .....   | 69        |
| 2.2.4. Análisis de secuencias.....   | 71        |
| 2.2.5. Análisis filogenético. ....   | 71        |
| 2.2.6. Variabilidad dentro y entre especies de <i>Cuscuta</i> . ....   | 72        |
| 2.3. Resultados y discusión .....  | 72        |
| 2.3.1. Amplificación de los marcadores ITS y TRNL-F .....  | 72        |
| 2.3.2. Resultados de identidad y valor de expectancia. ....  | 76        |
| 2.3.3. Sitios polimórficos.....  | 78        |
| 2.3.4. Análisis filogenético .....   | 79        |
| 2.4. Conclusiones.....   | 87        |
| 2.5. Literatura citada .....   | 87        |
| <b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>  | <b>90</b> |
| <b>RECOMENDACIONES.....</b>  | <b>90</b> |
| <b>ANEXO 1 .....</b>   | <b>91</b> |
| <b>Claves dicotómicas para determinar las especies del género <i>Cuscuta</i>. ....</b>   | <b>91</b> |
| <b>Descripción de siete especies de <i>Cuscuta</i> que se encontraron parasitando<br/>cultivos de importancia agrícola y forestal. ....</b>                | <b>95</b> |

## LISTA DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Información de los ejemplares de <i>Cuscuta</i> que se revisaron y recolectaron en la presente investigación. ....  | 39 |
| <b>Cuadro 2.</b> Caracteres morfológicos de siete especies de <i>Cuscuta</i> de importancia agrícola y forestal en México. ....  | 44 |
| <b>Cuadro 3.</b> Medidas de los caracteres florales y escamas infraestaminales de siete especies de <i>Cuscuta</i> de importancia agrícola y forestal en México. ....  | 45 |
| <b>Cuadro 4.</b> Especies de <i>Cuscuta</i> seleccionadas para realizar su identificación molecular. ....  | 67 |
| <b>Cuadro 5.</b> Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones trnL-F e ITS en <i>Cuscuta</i> . ....   | 70 |
| <b>Cuadro 6.</b> Mezcla de reacción para la PCR de las regiones trnL-F e ITS. ....   | 70 |
| <b>Cuadro 7.</b> Lista de secuencias de las regiones ITS y TrnL-F de <i>Cuscuta</i> , que presentaron mayor porcentaje de identidad en la bases de datos de nucleotitide de NCBI con las que se obtuvieron en este trabajo. .... | 76 |
| <b>Cuadro 8.</b> Polimorfismos dentro y entre cada especie de las regiones ITS y trnL-F sc=sitios conservados, sv =sitios variables, ip=informativos para parsimonia, s=polimorfismos únicos. ....                               | 79 |
| <b>Cuadro 9.</b> Números de accesoión de las secuencias depositadas en el GenBank del NCBI. ....   | 80 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Ilustración de los primers ITS.....  | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Región trnT (UGU) – trnF (GAA) en plantas.....   | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Caracteres florales y formas de la corola..  | 36 |
| <b>Figura 4.</b> Diagrama de flores de <i>Cuscuta</i> , características florales..  | 37 |
| <b>Figura 5.</b> Presencia de <i>Cuscuta</i> en diferentes hospedantes .....  | 42 |
| <b>Figura 6.</b> Características comparativas de la inflorescencia de siete especies de <i>Cuscuta</i> .....  | 49 |
| <b>Figura 7.</b> Morfología comparativa de flores de <i>Cuscuta</i> .....   | 50 |
| <b>Figura 8.</b> Morfología comparativa del cáliz y corola de <i>Cuscuta</i> .....  | 51 |
| <b>Figura 9.</b> Morfología comparativa del corte del cáliz. ....   | 52 |
| <b>Figura 10.</b> Morfología del corte de la corola de <i>Cuscuta</i> .....   | 53 |
| <b>Figura 11.</b> Morfología de escamas infraestaminales de <i>Cuscuta</i> .....  | 54 |
| <b>Figura 12.</b> Morfología comparativa de cápsulas de <i>Cuscuta</i> .....  | 55 |
| <b>Figura 13.</b> Morfología comparativa de semillas de <i>Cuscuta</i> .....  | 56 |
| <b>Figura 14.</b> Distribución geográfica de las especies de <i>Cuscuta</i> recolectadas en cultivos de importancia agrícola y árboles forestales en México. ....   | 57 |
| <b>Figura 15.</b> Número de especies de <i>Cuscuta</i> , recolectadas por estado durante 2011 a 2018. ....  | 60 |
| <b>Figura 16.</b> Número de ejemplares recolectados durante 2011 a 2018 de las siete especies de <i>Cuscuta</i> .....   | 60 |
| <b>Figura 17.</b> Productos de PCR del marcador molecular ITS. Carril 1 y 20, 1-3, <i>C. campestris</i> , 4-6 <i>C. chinensis</i> var. <i>applanata</i> , 7-9 <i>C. corymbosa</i> var. <i>stylosa</i> , 10-12 <i>C. costaricensis</i> , 13-15 <i>C. indecora</i> , 16-18, <i>C. mitriformis</i> . ... | 73 |
| <b>Figura 18.</b> Productos de PCR del marcador molecular ITS. Carril 1 y 7. Marcador molecular 1 kb Invitrogen ®. 19-21, <i>C. tinctoria</i> . Carril 5 y 6, control negativo.....   | 73 |
| <b>Figura 19.</b> Productos de PCR del marcador molecular ITS. Cartucho High Resolution. Qiaxcel Advancen System DNA. MM. Carril 19, Marcador molecular100 – 2.5 kb Qiagen ®, 1-3, <i>C. campestris</i> , 4-6 <i>C. chinensis</i>   |    |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
|                   | var. <i>applanata</i> , 7-9 <i>C. corymbosa</i> var. <i>stylosa</i> , 10-12 <i>C. costaricensis</i> ,<br>13-15 <i>C. indecora</i> , 16-18 <i>C. mitriformis</i> .....  | 74 |
| <b>Figura 20.</b> | Producto de PCR del marcador molecular ITS. Cartucho High Resolution. Qiaxcel Advancen System DNA. MM. Carril 24 Marcador molecular100 – 2.5 kb Qiagen ®, 19-21 <i>C. tinctoria</i> .....  | 74 |
| <b>Figura 21.</b> | Productos de PCR del marcador molecular trnL-F. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. Carril 1 y 17. Marcador molecular 1 kb Invitrogen ®. 1-3, <i>C. campestris</i> , 4-6 <i>C. chinensis</i> var. <i>applanata</i> , 7-9 <i>C. corymbosa</i> var. <i>stylosa</i> , 10-12 <i>C. costaricensis</i> .....   | 75 |
| <b>Figura 22.</b> | Productos de PCR del marcador molecular trnL-F. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. Carril 1 y 12, Marcador molecular 1 kb Invitrogen ®. 13-15 <i>C. indecora</i> , 16-18 <i>C. mitriformis</i> , 19-21 <i>C. tinctoria</i> .....  | 75 |
| <b>Figura 23.</b> | Productos de PCR del marcador molecular trnL-F. Cartucho High Resolution. Qiaxcel Advancen System DNA. MM. Carril 24 Marcador molecular100 – 2.5 kb Qiagen ®, 1-3, <i>C. campestris</i> , 4-6 <i>C. chinensis</i> var. <i>applanata</i> , 7-9 <i>C. corymbosa</i> var. <i>stylosa</i> , 10-12 <i>C. costaricensis</i> , 13-15 <i>C. indecora</i> , 16-18 <i>C. mitriformis</i> , 19-21 <i>C. tinctoria</i> ..... | 76 |
| <b>Figura 24.</b> | Reconstrucción filogenética con 42 secuencias de la región ITS de siete especies de <i>Cuscuta</i> , con ML con modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura Nei (Tamura, 1992)..  | 84 |
| <b>Figura 25.</b> | Reconstrucción filogenética con 42 secuencias de la región trnL-F de siete especies de <i>Cuscuta</i> , con la aproximación de ML, con modelo de sustitución de nucleótidos 3 parametros de Tamura (Tamura, 1992)..  | 85 |
| <b>Figura 26.</b> | Reconstrucción filogenética de 42 secuencias de las región ITS y trnL-F con ML de siete especies de <i>Cuscuta</i> , con EL modelo de sustitución de nucleótidos 2 parametros de Kimura (Tamura, 1992).  | 86 |

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las especies del género *Cuscuta* son consideradas plantas parásitas (Costea, 2008b; Costea y Stefanović, 2010). *Cuscuta* es una planta, es cosmopolita y alrededor de un 75% de las especies se encuentra en el continente americano (Yuncker, 1932; Dawson *et al.*, 1994; García y Martín, 2007; Stefanović *et al.*, 2007; Costea *et al.*, 2008).

*Cuscuta*, tiene importancia agrícola y forestal, debido a las pérdidas que provoca en los cultivos y a como contaminante en las semillas de cultivos que se movilizan entre las naciones (Dawson *et al.*, 1994). Se considera como una de las plagas más dañinas del mundo (Parker y Riches, 1993; Costea y Tardif, 2006; Costea y Stefanović, 2010). De éstas aproximadamente 15 especies pueden producir pérdidas que van del 18 al 86%, dependiendo el cultivo y el grado de infestación (Mishra *et al.*, 2007; Alsaadi *et al.*, 2016). Por lo que *Cuscuta* se considera el tercer grupo más perjudicial de plantas parásitas en el mundo, se les encuentra en cultivos de importancia agrícola y forestal, como: leguminosas forrajeras, plantas herbáceas, arbustos, árboles, alfalfa, trébol, frijoles, soja, arándano, zanahoria, remolacha azucarera (CAB International, 2019), cítricos, tomate (Ashton y Santana, 1976), papas (Selleck *et al.*, 1979) y gramíneas (Stefanović y Olmstead, 2004), en primer lugar se encuentran las plantas de *Striga* y posteriormente *Orobanche* (Parker y Riches, 1993; Costea y Tardif, 2006; Costea *et al.*, 2011).

Las especies del género *Cuscuta* presentan una drástica reducción de órganos vegetativos, lo que limita la identificación morfológica a través del uso de estructuras reproductivas, mediante la diferenciación de las flores de cada especie. La presencia de escamas infraestaminales es una de las características más importantes para la diferenciación de especies de este género (Costea *et al.*, 2012); sin embargo, a pesar de existir información para la identificación morfológica de las especies mediante claves taxonómicas, es necesario estar familiarizado con el género y tener acceso a las estructuras florales para el diagnóstico, condición que muchas veces no se tiene, por lo que el uso de marcadores moleculares pueden apoyar en este proceso. Diferentes trabajos señalan su uso para la identificación de especies de *Cuscuta* principalmente para conocer la relación filogenética entre éstas, las regiones utilizadas son: rbcL

(ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa), nrLSU (Secuencias de nucleótidos de la subunidad grande ribosómica nuclear), ITS (espaciadora interna del transcrito) y trnL (Espaciador intergénico no codificante del cloroplasto) (García *et al.*, 2014; Costea *et al.*, 2015). Por otro lado, el Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL, Consortium for the Barcode of Life *por sus siglas en ingles*) (2009), sugirió el uso de los genes *matk* y *rbcL*; en tanto que, Kress y Erickson (2007) señalaron el uso del *trnH-psbA* (espaciador intergénico entre tRNA His y la subunidad del fotosistema II); mientras que, el grupo del código de barras de las plantas de China (China Plant BOL Group, 2011) utilizó la región espaciadora del transcrito del DNA ribosoma nuclear (ITS2); de forma particular Alsaadi *et al.* (2016) para la identificación de *C. campestris* utilizó las regiones *trnH-psbA* y *rbcL*. Sin que se tenga información de cuál es el o los marcadores moleculares que permiten la diferenciación entre las especies de importancia agrícola para México que se puedan utilizar en el diagnóstico fitosanitario.

En México, de acuerdo a la NOM-043-FITO-1999 “Especificaciones para prevenir la introducción de malezas cuarentenarias a México”, se considera al género *Cuscuta* como una plaga de importancia cuarentenaria, esto es que no está presente en México o estándolo se encuentra en un área localizada y está regulada oficialmente. Dentro de este género, se considera a *Cuscuta campestris* como una plaga reglamentada. En caso de detectar una maleza reglamentada en campo, se debe coleccionar y enviar al Laboratorio de Malezas del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para realizar la identificación. Por lo que, ante la escasa información que apoye el diagnóstico de las diferentes especies del género *Cuscuta*, es necesario generar una guía pictográfica y un protocolo de diagnóstico molecular de marcadores moleculares para identificación de las especies de *Cuscuta* de importancia para México, que apoye a un diagnóstico rápido de especies, que coadyuvare en la toma de decisiones en un menor tiempo y evitar daños o pérdidas en cultivos de importancia agrícola y forestal; sin la necesidad de requerir estructuras morfológicas específicas para su diagnóstico.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Identificar siete especies del género *Cuscuta* mediante morfología y marcadores moleculares.

### Objetivos específicos

- Identificar especies del genero *Cuscuta* mediante caracteres morfológicos.
- Generar una guía ilustrada de las características morfológicas de las especies de *Cuscuta* que apoyen su identificación.
- Identificar marcadores moleculares que puedan ser utilizados para realizar la identificación de especies de *Cuscuta* sp., por medio de análisis bioinformático, de secuencias depositadas en el banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).
- Generar el perfil genético de siete especies de *Cuscuta* de importancia agrícola y forestal para México con los marcadores ITS y trnL-F.

## HIPÓTESIS

- El uso de características morfológicas y marcadores moleculares específicos permitirán la diferenciación de especies de *Cuscuta* de importancia agrícola para Mexico, acortando los tiempos de identificación en comparación con el diagnóstico clásico.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen del género *Cuscuta*

*Cuscuta* es una planta parásita, su primer registro fue publicado por Tournefort en el año 1700. Actualmente cuenta con aproximadamente 200 especies y más de 70 variedades, tanto de plantas holoparásitas como hemiparásitas (Costea *et al.*, 2008a; Costea y Tardif, 2006; García y Martín, 2007; Stefanovid y Olmstead, 2005). Se considera uno de los grupos más diversos de plantas parásitas. La palabra *Cuscuta* tiene origen árabe, que se traduce como "un mechón de cabello enredado" (Austin, 1980), en otros lugares se le conoce como: *Love Vine*, *Tangle Gut*, *Devil's Gut* y *Strangleweed*, aunque el nombre más usado es *Dodder* (Dawson *et al.*, 1994). Es un género cosmopolita, alrededor del 75% de las especies se encuentra en el continente americano (Yuncker, 1932; Dawson *et al.*, 1994; García y Martín, 2007; Stefanović *et al.*, 2007; Costea *et al.*, 2008).

### Clasificación taxonómica

La clasificación del género *Cuscuta*, no está muy clara, los primeros trabajos relacionados con la taxonomía son de Jussieu en 1789, quien indicó la relación que *Cuscuta* tenía con *Convolvulus*. Sin embargo, debido a que la morfología de *Cuscuta* es muy similar a la de las Convolvulaceae, algunos investigadores la ubican en la familia Convolvulaceae (Austin, 1998; Cronquist, 1988; Stefanović y Olmstead, 2004; Takhtajan, 1997) y otros en la familia Cuscutaceae (García y Castroviejo, 2003; García *et al.*, 2014). Yuncker (1932) elaboró una monografía que dividía al género en tres subgéneros *Monogyna*, *Grammica* y *Cuscuta*, con base en la morfología de los estigmas y estilos. El subgénero *Monogyna* (Englm.) Yunck, donde los árboles y arbustos son los principales hospederos (Dawson *et al.*, 1994), este subgénero presenta un gineceo con estilos parciales o completamente unidos, estigmas capitados, cónicos u ovados, representado por nueve especies alrededor del mundo, principalmente en Asia y una especie en América (Sherman *et al.*, 2008); el subgénero *Grammica* (Lour.) Yunck., contiene dos estilos desiguales, estigmas capitados, capsula circuncisil y es el grupo con mayor diversidad de especies, aproximadamente 135, la mayoría de ellas se encuentra en América (Yuncker, 1932; Guerra y García, 2004) y por último el subgénero *Cuscuta*, que

se caracteriza por un gineceo con dos estilos iguales y estigmas alargados, son alrededor de 25 especies que se encuentran en el viejo mundo (Guerra y García, 2004; Sherman *et al.*, 2008; García *et al.*, 2014).

### **Biología, hábitos, ciclo de vida y diseminación**

Las especies de *Cuscuta* presentan cantidades muy pequeñas o no presentan clorofila (Van Der Kooij *et al.*, 2000), algunas especies pueden fotosintetizar de forma limitada o localizada (Dawson *et al.*, 1994; Hibberd *et al.*, 1998; García *et al.*, 2014) por lo que fueron consideradas "crípticamente" fotosintéticas (Funk *et al.*, 2007; MacNeal *et al.*, 2007; Krause, 2008; García *et al.*, 2014).

El parasitismo se asocia a la reducción o modificación de estructuras vegetativas de plantas, las hojas se reducen a escamas y las raíces desaparecen y se reemplazan por haustorios (Kuijt, 1969; Stefanović *et al.*, 2007). Las plantas parásitas se encuentran en al menos 13 familias, con aproximadamente 4000 especies, que equivale a 1% de plantas angiospermas (Stefanović *et al.*, 2007); el término parásita, se refiere a que se alimentan de sus hospederos (del griego *para* = al lado; *sitos* = alimento) y las mantienen vivas hasta que han completado su ciclo de vida (Kaiser *et al.*, 2015).

Las plantas parásitas se clasifican como parásitos obligados o facultativos; son parásitos obligados si dependen totalmente de sus hospederos para completar su ciclo de vida, pero si pueden sobrevivir por sí mismas en ausencia de sus plantas hospedadoras serán parásitos facultativos. También pueden dividirse en hemiparásitos, que dependen parcialmente de una planta hospedera y pueden realizar la fotosíntesis y holoparásitos que dependen completamente de la planta hospedante (Wright, 2011; Ranjan *et al.*, 2014).

El haustorio (del latín "*haurire*" = para beber) es otra característica principal de todas las plantas parásitas, con esta estructura penetran en el tejido de su hospedante y pueden obtener los nutrientes, los solutos y los carbohidratos que se intercambian entre el hospedante y el parásito (Dawson *et al.*, 1994; Hibberd *et al.*, 1998; Hibberd y Jeschke,

2001; Yoshida y Shirasu, 2009; Westwood *et al.*, 2010). Pero esta absorción difiere entre especies; *Striga* se alimentan del xilema, mientras que *Cuscuta* y *Orobanche*, se alimentan del floema (Revill *et al.*, 2005).

*Cuscuta* spp., se puede definir como una holoparásita de tallo obligado, que crece en gran variedad de climas y ecosistemas en casi todos los continentes (Yuncker, 1932; Costea *et al.*, 2009, 2011), la mayor diversidad de las especies se encuentra en América (García y Martín, 2007); parasitan principalmente plantas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas (Dawson *et al.*, 1994).

El ciclo de vida de *Cuscuta* comienza con la germinación de las semillas. De acuerdo a las condiciones ambientales y a las especies, las semillas pueden permanecer latentes y viables en el suelo por un periodo de hasta 15 años (Gaertner, 1950); la germinación de las semillas de *Cuscuta* se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de 15 a 38 °C con temperaturas óptimas entre 30 y 33 °C (Hutchison y Ashton, 1980). Las semillas son muy duras y las recién maduras son impermeables al agua. Para que puedan germinar, las semillas deben de escarificarse, lo cual se produce en la naturaleza a través de la intemperie, la acción microbiana del suelo u otras alteraciones naturales (Gaertner, 1950, Hutchison y Ashton, 1980).

La germinación de las plántulas de *Cuscuta* depende de reservas limitadas que tienen las semillas y de la luz solar o luz incandescente (Runyon *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 1994). Una vez que emergen las plántulas se produce un alargamiento y una torcedura en el tallo de la plántula, con la finalidad de buscar a su hospedero, por medio de señales químicas (Press y Phoenix, 2005), al encontrarlo se une a este en un sentido contrario a las agujas del reloj y deja de estar conectado al suelo (Lanini y Kogan, 2005; Runyon, 2010). Si su hospedero no está vivo, ya que la planta parásita no distingue entre tallos de plantas, estructuras de metal o de madera, la plántula morirá en varios días. Además, la estructura anatómica de un hospedante puede retrasar el crecimiento de la planta parásita, evitando que el haustorio alcance los haces vasculares (Hassar y Rubin, 2003).

Posterior al contacto físico entre la planta parásita y el hospedero, las células parásitas epidérmicas y parenquimáticas comienzan a diferenciarse en un meristemo secundario y desarrollan el pre haustorio, también conocido como disco adhesivo (Dörr, 1968; Heide-Jorgensen, 1991). Las células prehaustoriales producen y secretan sustancias adhesivas como pectinas y otros polisacáridos, lo que refuerza la adhesión (Vaughn, 2002). Conforme se va formando el haustorio este penetra en el tallo del hospedero a través de una fisura. Posteriormente, comienza la formación de hifas que se expanden a lo largo de la pared celular del hospedero (Dawson *et al.*, 1994). De esta manera, los tallos de estas plantas parásitas se adhieren y penetran estableciendo una conexión vascular (Kuijt, 1969; Dawson *et al.*, 1994; Ranjan *et al.*, 2014; García *et al.*, 2014); con eso inicia la etapa de extracción de fotoasimilados y minerales, como la sacarosa, el fósforo y el potasio (Ziegler, 1975), *Cuscuta* crecerá aproximadamente siete cm al día, llegando a cubrir 3 m<sup>2</sup> por día sobre su hospedante y comenzará a formar una densa y gruesa capa sobre él, lo que ocasionará que llegue a matarlo no solo por la absorción de nutrientes, sino también por bloquear el sol y disminuir la cantidad de fotosíntesis que pueda realizar (Lanini y Kogan, 2005). Debido a la conexión entre el haustorio y el hospedero, algunas especies de *Cuscuta* pueden actuar como vectores para la propagación de patógenos de planta a planta (Heintz, 1989).

La dispersión de las diferentes especies del género *Cuscuta* se lleva a cabo por semillas o por propagación vegetativa (Lanini y Kogan, 2005). Las semillas son pequeñas, pero pesadas y no están adaptadas para la dispersión por viento, por lo que los humanos y animales son su principal medio de diseminación (Dawson *et al.*, 1994). Además, de dispersarse en semillas de cultivos contaminados, a través del intercambio internacional de semillas o el movimiento de equipos o suelo (Cudney y Lanini, 2000). Para la dispersión por medio de propagación vegetativa, es necesario que vaya adherida en los tallos de las plantas, dando como resultados la formación de haustorios y el desarrollo de la planta parásita (Lanini y Kogan, 2005). Debido a que esta maleza compite con los cultivos por agua, luz, espacio y nutrientes, se encuentra en el listado de malezas reglamentadas para México, por lo que es necesario que se realicen muestreos para

conocer el impacto que tiene esta maleza en los cultivos, lo que ayuda a que continúe con la campaña de malezas reglamentadas.

### **Distribución a nivel mundial y nacional**

El género *Cuscuta* es cosmopolita, cuenta con aproximadamente 200 especies, distribuida en casi todos los continentes, excepto la Antártida, desde los 60° al norte de Europa, Asia y Sudáfrica, hasta los 47° en Argentina y Chile (Yuncker, 1932; Hunziker, 1950; Mabberley, 1997; Stefanović *et al.*, 2007). La mayor diversidad de especies se encuentra en América (Yuncker, 1932; Stefanović *et al.*, 2007), principalmente en regiones con clima cálido y húmedo (Dawson *et al.*, 1994).

En Europa, se reconocen cinco especies nativas, de estas, *C. europea* L. es la más prominente, se encuentra en 58 países y en dos estados de EE.UU, seguida de *C. pentagona* y *C. campestris* que tienen una distribución mundial y un amplio número de hospederos (Kaiser *et al.*, 2005). Otras especies como: *C. chinensis* Lam. y *C. obtusiflora* Kunth se encuentran en Asia oriental y Europa; *C. epithimum* (L.) se encuentra en 60 países y en 26 estados de EE.UU (CAB International, 2019). *C. japonica* Choisy, pertenece al este de Asia. *C. monogyna* Vahl., se encuentra en el Mediterráneo y Medio Oriente, pero se extiende desde Francia al sur de Europa y Afganistán. *C. reflexa* Roxb., es una especie asiática que abarca desde la India y el Himalaya, se extiende desde Pakistán hasta Afganistán, desde el sur hasta Sri Lanka, China e Indonesia (Braukmann *et al.*, 2012).

En México se han reportado más de 60 especies (Carranza, 2008), entre ellas: *C. corymbosa*, en los estados de Baja California Sur, Colima, Ciudad de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998), *C. tinctoria*, *C. indecora*, *C. chinensis* var. *applanata*, *C. costaricensis* se han identificado en el estado de Sonora (Costea *et al.*, 2012).

## Importancia económica

Algunas especies de *Cuscuta* son reconocidas por ser plagas en cultivos de importancia agrícola y forestal: leguminosas forrajeras, plantas herbáceas, arbustos, árboles, alfalfa, trébol, frijoles, soja, arándano, zanahoria, remolacha azucarera (CAB International, 2019), cítricos y tomate (Ashton y Santana, 1976), papas (Selleck *et al.*, 1979) y gramíneas (Stefanović y Olmstead, 2004). Las pérdidas reportadas van del 18 al 86%, dependiendo el cultivo y el grado de infestación (Mishra *et al.*, 2007; Alsaadi *et al.*, 2016). Aproximadamente 15 especies pueden producir daños considerables a los cultivos, por lo que *Cuscuta* se considera el tercer grupo más perjudicial de plantas parásitas en todo el mundo, después de *Striga* y *Orobancha* (Parker y Riches, 1993; Costea y Tardif, 2006; Costea, 2011).

Algunos reportes indican que la especie *C. campestris*, ocasiona pérdidas en 25 especies de cultivos en 55 países (Lanini y Kogan, 2005; Welsh, 2009). En México se tienen reportes de pérdidas en cultivos de espárragos, garbanzos, lentejas, uvas, cítricos, melones, lespedeza, cultivos de flores, incluido el crisantemo y malezas (CAB International, 2019). *C. chinensis* y *C. obtusiflora* se consideran un problema importante en el cultivo de soja en China (Li, 1987; Parker y Riches, 1993). *C. epithimum* es un grave problema en alfalfa, col, zanahoria, pimientos, papas, trébol morado, tomates y la maleza *Ulex europaea* (Parker y Riches, 1993; Holm *et al.*, 1997; CAB International, 2019); también puede encontrarse parasitando lino, plantas ornamentales y pastos (Holm *et al.*, 1997); los reportes de México indican que parásita arbustos, *Pteridium esculentum* y las leguminosas como *Trifolium* y *Medicago* (CAB International, 2019).

*C. europaea* parásita cultivos de haba, lúpulo, cebolla, frambuesa y remolacha azucarera (CAB International, 2019).

*C. japonica* Choisy tiene como hospederos a especies leñosas y herbáceas (Parker y Riches 1993). *C. monogyna* Vahl. se encuentra comúnmente en cítricos, olivos (*Olea europaea* L.) y otros cultivos de frutas y hortalizas. *C. reflexa* se encuentra principalmente en árboles y arbustos perennes como café arábigo, cidra, lichi y melocotón (Parker y Riches, 1993).

*Cuscuta*, al ser de importancia agrícola y forestal, debido a las pérdidas que provoca en los cultivos y a la infestación en las semillas (Dawson *et al.*, 1994), se encuentra entre las plagas más dañinas del mundo (Parker y Riches, 1993; Costea y Tardif, 2006; Costea *et al.*, 2010). Sin embargo, muchas especies de *Cuscuta* son ecológicamente importantes, ya que son clave en los ecosistemas naturales (Press y Phoenix, 2005) y algunas de ellas están en peligro de extinción y requieren ser conservadas (Costea y Stefanović, 2009; Costea *et al.*, 2009a; Costea *et al.*, 2010; Braukman *et al.*, 2012). La mayoría de las políticas de biodiversidad nacional o internacional y las medidas de manejo se basan en la erradicación, sin importar que las especies de *Cuscuta* sean plagas o se encuentren en peligro de extinción (Costea y Stefanović, 2009; García *et al.*, 2014).

En los ecosistemas, las plantas de *Cuscuta* tienen la capacidad de reducir la biomasa, así como modificar significativamente la estructura de las comunidades vegetales (Pennings y Callaway, 2002). Por ejemplo, *C. salina* var. *major*, juega un papel importante en la diversidad de las comunidades de plantas palustres (Pennings y Callaway, 1996). *C. jepsonii* solo se tiene un holotipo recogido por Willis Linn Jepson en 1892 en California y como no se ha encontrado de nuevo durante más de un siglo, se cree que esta especie está extinta (Costea y Stefanović, 2009).

En la medicina tradicional, *Cuscuta* se utiliza en Asia, ya que presentan inmunoestimulantes, antioxidantes y propiedades antibacteriales, además de efectos benéficos para el sistema reproductor del humano (Bao *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Pal *et al.*, 2006; Costea *et al.*, 2013).

### **Interacción de *Cuscuta* con plantas resistentes**

Existen algunas plantas que rechazan a las especies de *Cuscuta*, como las monocotiledóneas, posiblemente por la disposición de los haces vasculares o la incompatibilidad de señales que son importantes para las conexiones entre la planta parásita y su hospedante (Dawson *et al.*, 1994). Existen reportes que indican que especies de la familia Malvaceae, como, *Gossypium hirsutum* e *Hibiscus rosa-sinensis*,

no han sido penetradas por *Cuscuta* spp., pues se cree que los haces vasculares están bloqueados por un tejido (Capderon *et al.*, 1985).

También se ha observado resistencia cuando *C. reflexa* interactúa con tomate (Ihi *et al.*, 1988; Albert *et al.*, 2005, 2006; Runyon *et al.*, 2010); después de 14 días de la interacción con tomate, *C. reflexa* desaparece, pero especies como *C. pentagona*, *C. suaveolens* y *C. europea*, pueden parasitar este cultivo sin ningún problema (Jiang *et al.*, 2013; Ranjan *et al.*, 2014).

### **Manejo de *Cuscuta***

En 1995, Windsor acuñó el término igualdad de derechos para los parásitos, con la intención de llamar a la comunidad científica a la parcialidad contra especies parásitas y su conservación. Este término aplica para *Cuscuta*, ya que se encuentra de manera indiscriminada en listas de malezas nocivas e invasivas de muchos países (Costea y Tardif, 2006; Costea *et al.*, 2013). En la lista de *British Columbia Manitoba*, Ontario, y Quebec aparece como maleza nociva y como maleza restringida en Alberta (Costea y Tardif, 2006). Además, en cargamentos de semillas que contengan semillas de *Cuscuta* son sujetos a cuarentena (Costea y Tardif 2006; Costea y Stefanović, 2009).

Debido a la capacidad que tiene esta planta parásita de causar daños, el Servicio de Inspección y Salud Animal de las Plantas (APHIS, por sus siglas en inglés *Animal and Plant Health Inspection Service*) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA, por sus siglas en inglés *United States Department of Agriculture*) ha incluido *Cuscuta* spp., como maleza nociva. Aunque numerosas especies de *Cuscuta* requieren medidas de conservación, la mayoría de las políticas internacionales de biodiversidad y medidas de manejo se inclinan hacia la erradicación de todas las especies de este género (Costea y Stefanović, 2009, García *et al.*, 2014).

Si *Cuscuta* se establece en campo, se puede hacer uso de la rotación de cultivos con plantas no hospedantes, el retraso en la siembra y el uso de herbicidas (Dawson, 1987, 1990); para reducir las pérdidas a causa de esta planta parásita (Dawson *et al.*, 1994;

Stefanović y Olmstead, 2004; Costea y Tardif, 2006; Stefanović *et al.*, 2007). Una vez que *Cuscuta* se une a su hospedero, es muy difícil controlarla (Lanini y Kogan, 2005).

Se han probado algunos cultivos genéticamente modificados, pero no se ha tenido un resultado satisfactorio (Nadler-Hassar y Rubin, 2003). El principal método de control contra *Cuscuta* es la exclusión, es decir la no introducción de esta maleza en el campo. La eliminación mecánica se puede realizar mediante la limpieza de semillas, pero no siempre se eliminan todas durante los procesos de limpieza (Lanini y Kogan, 2005). Por medio de la labranza las semillas se pueden enterrar para que no germinen. La eliminación en forma física consume tiempo y no se elimina por completo de las plantas hospederas. La rotación de cultivos con gramíneas forrajeras durante dos o más años puede disminuir significativamente el banco de semillas de *Cuscuta* spp., en campo. Las plántulas emergen y mueren porque rara vez las parasitan.

La infestación por *Cuscuta* debilita las plantas hospederas y las hace susceptibles a enfermedades secundarias, infestación de insectos y nematodos (Lanini y Kogan, 2005).

### **Uso del código de barras para la identificación de *Cuscuta***

La identificación de las diferentes especies de plantas presenta cuatro limitantes, la plasticidad fenotípica, uso de caracteres empleados que pueden llevar a una identificación incorrecta; taxones morfológicamente crípticos que se pasan por alto (Knowlton, 1993; Jarman y Elliott, 2000); el uso de claves morfológicas que se usan en una etapa en particular del individuo que se va a identificar y finalmente el uso de claves que exige un alto nivel de experiencia, ocasionando que al no tener la práctica existan errores muy comunes en los diagnósticos (Hebert *et al.*, 2003).

Por tal motivo, se buscó una herramienta eficiente y confiable que aportará información complementaria para la identificación taxonómica de especies (Hebert *et al.*, 2003) y se decidió hacer uso de los marcadores moleculares, los cuales permiten identificar especies conocidas y descubrir especies nuevas o desconocidas (Baker *et al.*, 1996; Hebert *et al.*, 2003a; Gernandt *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2015; Divakar *et al.*, 2016).

El código de barras del DNA se basa en la información codificada en las secuencias de nucleótidos de regiones conservadas del genoma y sirve como herramienta para la identificación de especies (Son *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004; Bafeel *et al.*, 2011).

Por lo que este código es un método aceptado y confiable para la identificación rápida y precisa de especies de plantas utilizando marcadores de ADN que son pequeños y que están estandarizados (Hebert *et al.*, 2003; Hebert y Gregory, 2005; China Plant BOL Group, 2011; Chen *et al.*, 2014 y Li *et al.*, 2015). Sin embargo, el marcador molecular COI mitocondrial (Subunidad 1 de citocromo oxidasa) que se utiliza en la identificación de animales, no es útil en plantas debido a la baja tasa de sustitución en el genoma mitocondrial de las plantas (Fazekas *et al.*, 2008, China Plant BOL Group, 2011). Por lo que CBOL Plant Working Group, 2009, propone el uso la combinación de regiones del núcleo, mitocondria y cloroplasto de las plantas para realizar análisis filogenéticos, diversidad genética y discriminación de especies en diferentes organismos (Wattoo *et al.*, 2016).

Diferentes autores han señalado diversos marcadores que sirven como códigos de barra de DNA para grupos de especie (Kress y Erickson, 2007; Sass *et al.*, 2007; CBOL, 2009), entre los que se encuentran los marcadores moleculares de la región espaciadora interna del transcrito (ITS) y la región trnH-psbA (espaciador intergénico entre tRNA His y la subunidad del fotosistema II) propuestos por Kress *et al.* (2005), los cuales presentan una buena longitud y alta variación intraespecífica; además, de servir como oligonucleótidos universales, los cuales han sido ratificados por otros autores (China Plant BOL Group, 2011; Yao *et al.*, 2010; Saddhe y Kumar, 2018, CBOL, 2009), el intrón de cloroplasto trnL (UAA) se ha utilizado para reconstruir filogenias entre especies estrechamente relacionadas (Scharaschkin and Doyle, 2005; McDade *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005) o para identificar especies de plantas (Ward *et al.*, 2005). Además, esta región es el único intrón del Grupo I en el ADN del cloroplasto (Shinozaki *et al.*, 1986). Esto significa que tiene una estructura secundaria conservada (Palmer, 1991) con alternancia de regiones conservadas y variables (Quandt *et al.*, 2004). La zona del DNA del cloroplasto trnL-F codifica el tRNA de la leucina (trnL) y el tRNA de la fenilalanina (trnF), contando con cientos de bases de DNA no codificantes entre estos genes

(Taberlet *et al.*, 1991). Así mismo, Lahaye *et al.* (2008) y Newmaster *et al.* (2008), establecieron que la región trnH-psbA y el gen maturasa K (matK), serian regiones potenciales como códigos de barras, ya que con ellos se observó una mayor variación interespecífica. Con base en lo anterior, el Grupo del Código de Barras de la Vida (CBOL) recomendó el uso de una combinación del marcador matK y rbcL (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa) como el código de barras de las plantas (CBOL, 2009; Bafeel *et al.*, 2011; Saddhe y Kumar, 2018), debido a que estas dos regiones de ADN de cloroplasto presentaron una recuperación eficiente de secuencias de buena calidad y altos niveles de discriminación de especies (Burgess *et al.*, 2011). Otros marcadores pueden ser rpoB (ARN polimerasa subunidad beta) y rpoC1 (ARN polimerasa cadena beta) que son genes codificantes de proteínas, y de atpF-atpH (ATP sintasa CF0 subunidad B) y psbK-psbI (fotosistema II de la proteína K y fotosistema II de la proteína I) que son espaciadores intergénicos no codificantes (CBOL, 2009).

Ante la complejidad del uso de regiones pequeñas en la taxonomía de las plantas, se han propuesto un código de barras donde se usa todo el genoma del cloroplasto y un código de barras específico, lo cual serviría en gran medida para la identificación de plantas (Li *et al.*, 2015).

### **Sistema de diagnóstico**

Para la identificación de especies, se puede realizar mediante diagnóstico morfológico con un reducido número de caracteres (Capítulo II) o por medio de marcadores moleculares.

### **Diagnóstico Molecular**

El código de barras es una técnica de identificación molecular de especies de animales, plantas u hongos que consiste en la utilización de una pequeña región de un gen (DNA Barcode). Esta técnica la propuso Paul Hebert de la Universidad de Guelph (Canadá) en 2003 (Hebert *et al.*, 2003). El código de barras biológico consiste de la amplificación de un fragmento de ADN, que comparten las especies de estudio, y que presenta diferentes tasas de variación, lo que permite identificar especies, separar especies crípticas, realizar

estudios de evaluaciones de biodiversidad, estudios de vida y ecológicos entre otros (Cheng *et al.*, 2016).

Para la identificación de plantas se hace uso de marcadores moleculares, los cuales utilizan la amplificación de fragmentos del genoma común en las especies y niveles altos de variación que permite la diferenciación a través de la comparación y la identificación de mutaciones en la secuencia de ácidos nucleicos, los cuales superan las limitaciones de los métodos tradicionales, y son de gran apoyo en el diagnóstico fitosanitario debido a que son rápidos, no requieren un estado fenológico o región específica del organismo, y los resultados tienen un alto nivel de confiabilidad, sin la necesidad de especialistas en el grupo taxonómico de estudio (Phillips *et al.*, 1995; Rallo *et al.*, 2002).

Para poder utilizar el Sistema de Código de barras para la identificación de plantas, es necesario que se cumplan los siguientes criterios en un marcador molecular:

- Marcador molecular variable para discriminar entre especies, pero conservarse para ser menos variable dentro de las mismas especies.
- Estandarizado, con la misma región de ADN utilizada en la medida de lo posible para diferentes grupos taxonómicos.
- Debe tener información filogenética para asignar fácilmente las especies a su grupo taxonómico.
- Tener sitios conservados, amplificaciones y secuenciaciones de ADN confiables.
- La región del ADN objetivo debe ser lo suficientemente corta para permitir la amplificación del ADN degradado (Taberlet *et al.*, 2007; Wallinger, 2012).

Aunque un marcador molecular que cumpla todos estos criterios como tal no existe.

Para Valadez y Kahl (2000) un marcador molecular es cualquier molécula de proteína, RNA o DNA de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de especies. Los marcadores del DNA son pequeñas secuencias de DNA que se obtienen de diferentes individuos y permiten detectar el polimorfismo entre una población o la variación entre especies. De acuerdo a Karp y Edwards (1998) dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas.

- Métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) y VNTRs. (número variable de repeticiones en tándem).
- Técnicas que utilizan oligonucleótidos arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, MAAP (Iniciadores de PCR múltiples aleatorios), RAPD (Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico), RAMPO (Polimorfismo de microsatelite amplificado al azar).
- PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR (Secuencias simples repetidas), ISSR (Inter secuencias simples repetidas).

Las plantas presentan genomas mitocondriales similares a los cloroplastos que evolucionan muy lentamente para proporcionar una variación suficiente, por lo que es necesario secuenciar varias regiones de ADN (Chase *et al.*, 2005), incluidos fragmentos nucleares y de cloroplastos, como la región espaciadora interna del transcrito (ITS) del cistrón ribosómico nuclear 18S – 5.8S – 26S (Álvarez y Wendel, 2003) o la región intergénica del cloroplasto trnH–PsbA (Kress *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares sirven para estudiar procesos como la transmisión, la evolución de la especificidad del huésped y los patrones de especiación. Además, de la búsqueda de especies crípticas (morfológicamente similares, pero genéticamente distintas) (Hung *et al.*, 1999; Jousson *et al.*, 2000; Leignel *et al.*, 2002). El uso de marcadores moleculares con un sistema de muestreo en un espacio geográfico permite hacer un análisis filogeográficos, con lo que es posible identificar regiones geográficas independientes históricamente y evolutivas (Bermingham y Moritz, 1998), comprender la historia de la colonización de especies. Este tipo de estudios, no solo son para conocer el origen de especies y los niveles de diversidad genética en su rango nativo (Criscione *et al.*, 2005), sino también para identificar el patrón de diversificación de las especies y la implementación de medidas de control.

Para la identificación de plantas se pueden utilizar primers específicos en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (King *et al.*, 2008). Sin embargo, el alineamiento de las secuencias no codificantes del cpDNA presentan gran variabilidad entre especies

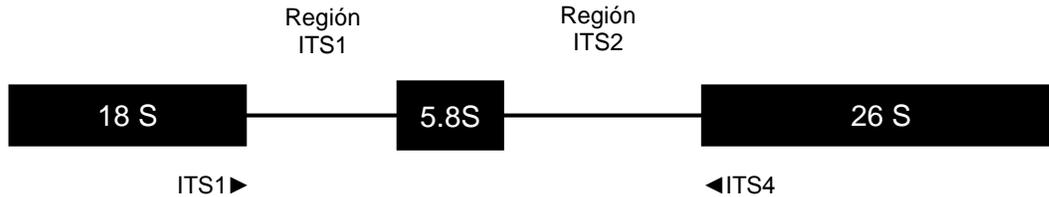
estrechamente relacionadas (Bakker *et al.*, 2000). Por lo que no se tienen muchos primers específicos disponibles para la identificación de plantas y la mayoría de ellos se han obtenido del ADN nuclear (McNickle *et al.*, 2008; Mommer *et al.*, 2008).

De las regiones propuestas por el código de barras para diversos grupos de plantas, se han usado para identificar plantas terrestres los marcadores moleculares *rbcL*, *matK*, *ycf1* e ITS (Chase *et al.*, 2007; Kress y Erickson, 2007; Hollingsworth, 2011; Dong *et al.*, 2015); para algas verdes *rbcL*, ITS y *tufA* (Saunders y Kucera 2010; Buchheim *et al.*, 2011); y para algas rojas ITS y CO1 (Saunders, 2005; Robba *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009).

Algunas regiones propuestas por la CBOL, 2009, se han usado para la identificación de cactáceas, en combinación con otros marcadores, a nivel de familia *matK* y *trnL-F* a nivel de tribu *trnQ-rps16*, *rpl32-trnL*, *psbA-trnH* y nuclear ITS a nivel de género *rpl16* y *psbA-trnH* en *Mammillaria*; *rbcL*, *matK* y *psbA* en *Pereskia*; *rpl16* y *trnL-F* en *Peniocereus*; *atpB-rbcL*, *trnK-rps16* y *trnL-trnF* en *Rebutia*; *trnS-G*, *trnL* y *rlp16* en *Echinopsis* y seis genes de cloroplasto y dos nucleares en *Opuntia* (García *et al.*, 2013). La combinación de *matK* + *rbcL* ha permitido la discriminación entre especies en más de 72% (CBOL, 2009). En plantas medicinales se han usado los marcadores *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL*, subunidad de RNA polimerasa de cloroplasto (*rpoC1*), *ycf5*, ITS2 e ITS. En donde ITS2 obtuvo un 92.7% de discriminación. Los marcadores de plástidos *rbcL* y *matK* loci mostraron una resolución pobre en géneros ricos en especies y taxones complejos de *Lysimachia*, *Ficus*, *Holcoglossum* y *Curcuma* (Saddhe y Kumar, 2018).

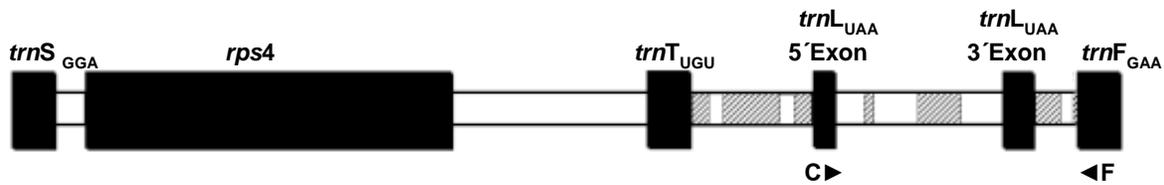
Los ITS (Internal Transcribed Spacer) al encontrarse entre los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del DNA nuclear y presentar una alta variabilidad permitiendo diferenciar individuos relacionados genéticamente (Atkins y Clark, 2004), se propusieron como marcadores moleculares del código de barras para plantas con flores (Kress *et al.*, 2005); de acuerdo a estudios que se han realizado, se recomienda una combinación de marcadores moleculares del genoma nuclear y del genoma del plástido para poder obtener una identificación precisa de las especies (Chase y Fay 2009; Fazekas *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2010).

Las regiones codificadoras conservadas de esta región son utilizadas para estudiar familias, mientras que las regiones con tasa de mutación más alta, como los ITS 1 y 2, que pertenecen al transcrito de ADN nuclear (Figura 1), se utilizan para comparar especies o géneros cercanos. Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los ITS son altamente conservados, estos se encuentran entre los genes ADNr 18 y 26 S. (Soltis *et al.*, 1998). De estos los más utilizados son ITS1 + ITS4 (White *et al.*, 1990), los cuales fueron diseñados para la amplificación de hongos. Estos presentan bajo porcentaje de amplificación en las PCR y de secuenciación (Hollingsworth, 2011), a pesar de esto, se siguen utilizando en la identificación de especies de plantas.



**Figura 1.** Ilustración de los primers ITS. ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Los oligonucleótidos amplifican la región del extremo final del gen 18S, incluye la región ITS1, el gen 5.8, la región ITS2 y el extremo inicial del gen 26S.

Las regiones no codificantes del DNA de cloroplasto (cpDNA) se han usado para estudios filogenéticos a nivel interespecífico e intraespecífico debido a su alta tasa evolutiva (Shaw *et al.*, 2005). La región trnT (UGU) a la región trnF (GAA) del cpDNA (Figura 2) contiene regiones variables no codificantes además de los genes trn conservados. Por lo que los seis oligonucleótidos (a-f) que se encuentran en esta región pueden amplificar 3 secciones no codificantes, incluida la región espaciadora intergénica entre trnT (UGU) y el exón trnL (UAA) 5 '(primers a y b), el intrón trnL (UAA) (oligonucleótidos c y d), y la región espaciadora intergénica entre el exón y trnF trnL (UAA) 3 ' y trn F (GAA) (primers e y f) (Taberlet *et al.*, 1991).



**Figura 2.** Región trnT (UGU) – trnF (GAA) en plantas. Las cajas negras representan regiones codificantes, las regiones variables se representan por cajas sombreadas. El tamaño y la posición de las regiones variables cambian de acuerdo al grupo de estudio. La localización de los oligonucleótidos se indica con las letras (C y F). La longitud de la región presentada está basada en la región de *Campylopus flexuosus*. Tomado y adaptado de: Quandt *et al.* (2004).

### Literatura citada

- Albert M. 2005. Studien zur Interaktion des Pflanzlichen Parasiten *Cuscuta reflexa* mit dem Inkompatiblen Wirt *Lycopersicum esculentum*. Ph.D. thesis, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt. pp: 113.
- Albert M., X. Belastegui-Macadam, and R. Kaldenhoff. 2006. An attack of the plant parasite *Cuscuta reflexa* induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato. *The Plant Journal* 48: 548–556.
- Alsaadi A., M. Saif., M. Yasser, S. Gaur., H. El-wakil., L. Maloukh and T.V.R. Lakshmi. 2016. Identification of *Cuscuta campestris* Yunker in UAE: study of bar code loci-*rbcL*, *matk* and *trnH-psbA* in the UAE and Egyptian cultivars and in the respective host plants basil and jutte. *International Journal of Reseach in Science* 2 (2): 9-12.
- Álvarez I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics Evolution* 29: 417–434.
- Ashton F. M. and D. Santana. 1976. *Cuscuta* spp. (Dodder): A literature review of its biology and control. Division of Agriculture, University California Bull. 1880. pp: 24.
- Atkins S. and I. Clark. 2004. Fungal Molecular Diagnostics: A mini review. *Journal of Applied genetics* 45: 3-15.
- Austin D. F. 1980. Studies of the Florida Convolvulaceae – III. *Cuscuta*. *Florida Scientist* 43(4):294-302.
- Austin D. F. 1998. Parallel and convergent evolution in the Convolvulaceae. *In*: P. Mathews [ed.], *Biodiversity and taxonomy of tropical flowering plants*. Mentor Books, Calicut, India. pp: 201-234.

- Bafeel S. O., I. A. Arif, M. A. Bakir, H. A. Khan, A. H. Al Farhan, A. A. Al Homaidan, A. Ahamed and J. Thomas. 2011. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (matK) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics Journal* 4(4): 195-198.
- Bakker F., A. Culham, R. Gomez-Martinez, J. Carvalho, and J. Compton. 2000. Patterns of nucleotide substitution in angiosperm cpDNA trnL (UAA) –trnF (GAA) regions. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1146–1155.
- Baker C. S., F. Cipriano, and S. R. Palumbi, 1996. Molecular Genetic Identification of Whale and Dolphin Products from Commercial Markets in Korea and Japan. *Molecular ecology* 5: 671- 685.
- Bao H., Z. Wang, J. Fang, and X. Li. 2002. Structural features of an immunostimulating and antioxidant acidic polysaccharide from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Planta Medica* 68: 237–243.
- Bermingham E. and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367–369.
- Braukmann T., M. Kuzmina, and S. Stefanović. 2012. Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss. *Journal of experimental botany* 64(4): 977-989.
- Buchheim M. A., A. Keller, C. Koetschan, F. Förster, B. Merget and M. Wolf. 2011. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. *PLoS ONE* 6(2): e16931. doi.org/10.1371/journal.pone.0016931.
- Burgess K.S, A. Fazekas J., P. R. Kesanakurti, S. W. Graham, B. C. Husband, S. G. Newmaster, D. M. Percy, M. Hajibabaei and S. C. H. Barret. 2011. Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+ matK DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution* 2: 333-340. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00092.x.
- CAB International. 2019. *Cuscuta* spp. In: *Crop Protection Compendium*, 2019 edition. Wallingford, UK: CAB International. Consultado el 25 de enero de 2019. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17111>.
- Capderon M., A. Fer, and P. Ozenda. 1985. About an unreported system leading to the expulsion of a parasite – *Cuscuta* on cotton-plant (*Cuscuta-Lupuliformis* Krock on *Gossypium-Hirsutum-L*). *Comptes rendus de l'Académie des sciences III-Vie* 300: 227–232.
- Carranza E. 2008. Flora del bajío y de regions adyacentes. Convolvulaceae II. Fascículo 155. Instituto de Ecología A. C.

- CBOL, Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 12794-12797.
- Chase M. W., N. Salamin, M. Wilkinson, J. M. Dunwell, R. P. Kesanakurthi, N. Haidar and V. Savolainen. 2005 Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1889–1895. doi: 10.1098/rstb.2005.1720.
- Chase M. W., R. S. Cowan, P. M. Hollingsworth, C. van den Berg, S. Madriñán, G. Petersen, O. Seberg, T. Jørgensen, K. M. Cameron, M. Carine, N. Pedersen, T. A. J. Hedderson, F. Conrad, G. A. Salazar, J. E. Richardson, M. L. Hollingsworth, T. G. Barraclough, L. Kelly and M. Wilkinson. 2007 A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56(2): 295–299.
- Chase M. W. and M. F. Fay. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science* 325: 682-683.
- Chen, S., T. Xia, Y. Wang, J. Liu, and S. Chen. 2005. Molecular systematics and biogeography of *Crawfordia*, *Metagentiana* and *Tripterosperrum* (Gentianaceae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* 96: 413–424.
- Chen, S.L., X.H. Pang, J.Y. Song, L.C. Shi, H. Yao, and J. P. Han. 2014. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA. *Biotechnology Advances* 32: 1237-1244. Doi:10.1093/aob/mci188.
- Cheng, T., X. Chao, L. Lei, Li, C. and S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16: 138–149.
- China Plant BOL Group, DZ. Li, L. M. Gao, H. T. Li, H. Wang, X. J. Ge, J. Q. Liu, Z. D. Chen, S. L. Zhou, S. L. Chen, J. B. Yang, C. X. Fu, C. X. Zeng, H. F. Yan, Y. J. Zhu, Y. S. Sun, S. Y. Chen, L. Zhao, K. Wang, T. Yang and G. W. Duan. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 19641-19646.
- Criscione, C., R. Poulin and S. Blouin. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular ecology* 14: 2247- 2257. doi: 0.1111/j.1365-294X.2005.02587.x
- Costea M., and J. Tardif, F. 2006. Biology of Canadian weeds. *Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. ex Schult., *C. umbrosa* Beyr. ex Hook., *C. epithymum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe. *Canadian Journal of Plant Sciences* 86: 293–316.
- Costea M., F. Aiston, and S. Stefanović. 2008. Species delimitation, phylogenetic relationships, and two new species in the *Cuscuta gracillima* complex (Convolvulaceae). *Botany* 86(7): 670–681.

- Costea M., I. Garcia R. and M. Welsh. 2008a. A new species of *Cuscuta* (Convolvulaceae) from Michoacán, México. *Brittonia* 60(3): 235-239.
- Costea M. and S. Stefanović. 2009. *Cuscuta jepsonii* (Convolvulaceae): An invasive weed or an extinct endemic American Journal of Botany 96: 1744–1750.
- Costea M., R. M. Wright A., and S. Stefanović. 2009a. Untangling the systematics of salt marsh dodders: *Cuscuta pacifica* a new segregate species from *Cuscuta salina* (Convolvulaceae). *Systematic Botany* 34(4): 787–795.
- Costea M. and S. Stefanović. 2010. Evolutionary history and taxonomy of the *Cuscuta umbellate* complex (Convolvulaceae): Evidence of extensive hybridization from discordant nuclear and plastid phylogenies. *Taxon* 59(6): 1783-1800.
- Costea M., I. Spence, and S. Stefanović. 2011. Systematics of *Cuscuta chinensis* species complex (subgenus *Grammica*, Convolvulaceae): evidence for long-distance dispersal and one new species. *Organisms Diversity and Evolución* 11:373-386.
- Costea M., R. S. Felger, D. F. Austin, T. R. Van Devender, and J. J. Sanchez-Escalante. 2012. Convolvulaceae of Sonora, México. II: *Cuscuta*. *Journal of the botanical research institute of Texas* 6(2): 529-550.
- Costea M., I. García R., K. Dockstader, and S. Stefanović. 2013. More problems despite bigger flowers: Systematics of *Cuscuta tinctoria* clade (subgenus *Grammica*, Convolvulaceae) with description of six new species. *Systematic Botany* 38(4): 1160-1187.
- Costea M., M. A. García, and S. Stefanović. 2015. A phylogenetically based infrageneric classification of the parasitic plant genus *Cuscuta* (Dodder, Convolvulaceae). *Systematic Botany* 40(1): 269-285.
- Cronquist A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden, Bronx, New York, USA. pp: 555.
- Cudney D. and W. T. Lanini. 2000. Dodder. *Encyclopedia Plant Pathology* 1: 376–379
- Dawson J. H. 1987. *Cuscuta* (Convolvulaceae) and its control. *In: Parasitic flowering plants* (H. C. Weber and W. Forstreuter, eds.). Philipps-Universität, Marburg, Germany. pp: 137–149
- Dawson, J. H. 1990. Dodder (*Cuscuta* spp.) control with dinitroaniline herbicides in alfalfa (*Medicago sativa*). *Weed Technology* 4:341– 348.
- Dawson J.H., L. J. Musselman, P. Wolswinkel, I. Dorr. 1994 Biology and control of *Cuscuta*. *Reviews of Weed Science* 6: 265–317.
- Divakar, P., S. Leavitt, M. Molina, R. Del-Prado, T. Lumbsch and A. Crespo. 2016. A DNA barcoding approach for identification of hidden diversity in Parmeliaceae

- (Ascomycota): *Parmelia* sensu stricto as a case study. *Botanical Journal of the Linnean Society* 180: 21-29.
- Dong W, C. Xu and C. Li 2015. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports* 5: 8348.
- Dörr I. 1968. Localization of cell contacts between *Cuscuta odorata* and different higher hostplants. *Protoplasma* 65: 435–448.
- Fazekas A. J., K. S. Burgess, P. R. Kesanakurti, S. W. Graham, S. G. Newmaster, and B. C. Husband. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802.
- Funk H. T., S. Berg, K. Krupinska, G. Maier U. and K. Krause. 2007. Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *BMC Plant Biology* 7: 45. doi: 10.1186/1471-2229-7-45.
- Gaertner E. E. 1950. Studies of seed germination, seed identification and host relationships in Dodders, *Cuscuta* spp. Cornell University 56 pp.
- García M. A., y S. Castroviejo. 2003. Estudios citotaxonómicos en las especies ibéricas del género *Cuscuta* (Convolvulaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 60: 33–44.
- García M. A. and M. P. Martín. 2007. Phylogeny of *Cuscuta* (Convolvulaceae) based on nrDNA ITS and chloroplast trnL intron sequences. *Systematic Botany* 32 (4): 899-916.
- García A. M. A., T. Terrazas, O. Segura L., S. Arias, H. Vibrans y L. López-Mata. Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México. 2013. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (1): 13 – 22.
- García M. A., M. Costea, M. Kuzmina, and S. Stefanović. 2014. Phylogeny, carácter evolution, and biogeographu of *Cuscuta* (Dodders: Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. *American Journal of Bonaty* 101(4): 670-690.
- Guerra M. and M. A. García. 2004. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47: 134–140.
- Gernandt, D., G. Salazar, F. Vergara, S. Arias, V. Sosa, A. García, J. Reyes, L. Cabrera, y P. Rosas. 2011. Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México. (Informe final SNIB-CONABIO, proyecto N°. GE021). México D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Instituto de Ecología, A.C. 33 p.

- Gong W., Y. Liu, J. Chen, Y. Hong, and H. Kong. 2015. DNA barcodes identify Chinese medicinal plants and detect geographical patterns of *Sinosenecio* (Asteraceae). *Journal of systematics and Evolution* 54(1): 83-91.
- Gupta M., U. K. Mazumder, D. K. Pal, and S. Bhattacharya. 2003. Onset of puberty and ovarian steroidogenesis following administration of methanolic extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. stem and *Corchorus olitorius* L. seed in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 55–59.
- Hassar T. N. and B. Rubin. 2003. Natural tolerance of *Cuscuta campestris* to herbicides inhibiting amino acid biosynthesis. *Weed Research Society* 43: 341-347.
- Hebert P., A. Cywinska, S. Ball, and J. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Science* 270: 313-321.
- Hebert P., S. Ratnasingham and J. deWaard. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Science* 270: 96-99.
- Hebert P.D., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen and W. Hallwachs. 2004 Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(41): 14812- 4817.
- Hebert P.D.N. and T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852–859.
- Heide-Jorgensen H. S. 1991. Anatomy and ultrastructure of the haustorium of *Cassytha pubescens* R Br I the adhesive Disk. *Bot. Gazette* 152: 321–334. doi: 10.1086/337896.
- Heintz W. 1989. Transmission of a New Mycoplasma-Like Organism (MLO) from *Cuscuta odorata* (Ruiz et Pav.) to Herbaceous Plants and Attempts to its Elimination in the Vector. *Journal of Phytopathology* 125 (2): 171-186.
- Hibberd J. M. and W. D. Jeschke. 2001. Solute flux into parasitic plants. *J. Exp. Bot.* 52: 2043–2049.
- Hibberd J. M., R. A. Bungard, M. C. Press, W. D. Jeschke, J. D. Scholes and W. P. Quick. 1998. Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta* 205: 506–513. Doi: 10.1007/s0042500 50349.
- Holm L., J. Doll, E. Holm, J. Pancho, and J. Herberger. 1997. The obligate parasitic Weeds. *Cuscuta*, Convolvulaceae, morning glory family. In John Wiley y Sons, Inc., eds. *World weeds: Natural Histories and Distribution*. New York. pp: 249-265.

- Hollingsworth P. M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19451–19452.
- Hu Z., M. D. Guiry and D. Duan. 2009. Using the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a complement marker for species identification of red macroalgae. *Hydrobiologia* 635: 279–287.
- Hung G. C., N. B. Chilton, I. Beveridge, X. Q. Zhu, J. R. Lichtenfels and R. B. Gasser. 1999. Molecular evidence for cryptic species within *Cylicostephanus minutus* (Nematoda: Strongylidae). *International Journal of Parasitology* 29: 285–291.
- Hunziker A. T. 1950. Las especies de *Cuscuta* (Convolvulaceae) de Argentina y Uruguay. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 13: 178–251.
- Hutchison J. M. and Ashton, F. M. 1980. Germination of Field Dodder (*Cuscuta campestris*). *Weed Science* 28 (3): 330-333.
- Ihi B., N. Tutakhil, A.Hagen, and F. Jacob. 1988. Studies on *Cuscuta Reflexa* Roxb.7. Defense-mechanisms of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Flora* 181: 383–393.
- Jarman S. N. and N. G. Elliot. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspidae, "living fossils" from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 624-633.
- Jiang L. J., A. J. Wijeratne, S. Wijeratne, M. Frage, T. Meulia, and D. Doohan. 2013. Profiling mRNAs of two *Cuscuta* species reveals possible candidate transcripts shared by parasitic plants. *PLoS ONE* 8(11): e81389. doi: 10.1371/journal.pone.0081389.
- Jousson O., P. Bartoli and J. Pawlowski. 2000. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *Journal of Evolutionary Biology* 13: 778– 785.
- Kaiser B., G. Vogg, U. B. Fürst, and M. Albert. 2015. Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Frontiers in plant science* 45: 1-9.
- Karp A. and K. Edwards. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- King R, D. Read, M. Traugott and W. Symondson. 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology* 17: 947–963.
- Knowlton N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 189–216.

- Krause K. 2008. From chloroplasts to “cryptic” plastids: Evolution of plastid genomes in parasitic plants. *Current Genetics* 54: 111 – 121.
- Kress J., K. Wurdack, E. Zimmer, L. Weigt and D. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of sciences* 102: 8369-8374.
- Kress W. and D. Erickson. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnHpsbA* Spacer Region. *Plos One* 2(6): 1-10.
- Kuijt J. 1969. *The biology of parasitic flowering plants*. University of California Press, Berkeley, California, USA. pp: 248.
- Lahaye R., M. van der Bank, D. Bogarin, J. Warner, F. Pupulin, G. Gigot and V. Savolainen. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of sciences* 105: 2923-2928.
- Lanini W. and M. Kogan. 2005. Biology and management of *Cuscuta* in crops. *Ciencia e Investigación Agraria* 32: 165–179.
- Leignel V., J. Cabaret and J. F. Humbert. 2002. New molecular evidence that *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae) is a species complex. *Journal of Parasitology* 88: 135–140.
- Li X.W., Y. Yang, R. J. Henry, M. Rosetto, Y. T. Wang and S. L. Chen. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews* 90: 157-166.
- Li Y. H. 1987. Parasitism and integrated control of dodder on soybean. In H. C. Weber and W. Forstreuter, eds. *Proceedings of the 4th International Symposium Parasitic Flowering Plants*. Marburg, Germany. pp: 591-596.
- Mabberley D. J. 1997. *The plant-book*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp: 858.
- McDade L. A., T. F. Daniel, C. A. Kiel, and K. Vollesen. 2005. Phylogenetic relationships among Acantheae (Acanthaceae): major lineages present contrasting patterns of molecular evolution and morphological differentiation. *Systematic Botany* 30: 834–862.
- Mcneal J. R., K. Arumugunathan, J. V. Kuehl, J. L. Boore and C. W. Depamphilis. 2007. Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC Biology* 5: 55.
- McNickle G., J., Cahill and M. Deyholos. 2008. A PCR-based method for the identification of the roots of 10 co-occurring grassland species in mesocosm experiments. *Botany* 86: 485–490.

- Mishra J. S., B. T. S. Moorthy, M. Bhan, and N. Yaduraju. T. 2007. Relative tolerance of rainy season crops to field dodder (*Cuscuta campestris*) and its management in Niger (*Guizotia abyssinica*). *Crop protection* 26 (4): 625-629.
- Mommer L, C., Wagemaker, H. DeKroon and N. Ouborg. 2008. Unravelling belowground plant distributions: a real-time polymerase chain reaction method for quantifying species proportions in mixed root samples. *Molecular Ecology Resources* 8: 947–953.
- Nadler-Hassar T., and B. Rubin. 2003. Natural tolerance of *Cuscuta campestris* to herbicides inhibiting amino acid biosynthesis. *Weed Research* 7 43: 341–347.
- Newmaster S. G., A. J. Fazekas, A. D. Steeves and J. Janovec. 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8(3): 480-490.
- Pal D. K., M. Mandal, G. P. Senthilkumar, and A. Padhiari. 2006. Antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* stem and corchorus olitorius seed. *Fitoterapia* 77: 589-591.
- Palmer J. D. 1991. Plastid chromosomes: structure and evolution. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* 7A 5–53.
- Parker C, and C. R. Riches. 1993. Parasitic weeds of the world. *Biology and control*. Wallingford, UK: CAB International. pp: 332
- Pennings S. C. and R. M. Callaway. 1996. Impact of a native parasitic plant on salt marsh vegetation structure and dynamics. *Ecology* 77: 1410 – 1419.
- Pennings S. C. and R. M. Callaway. 2002. Parasitic plants: Parallels and contrasts with herbivores. *Oecologia* 131: 479–489.
- Phillips W., H. Rodríguez, and P. Fritz 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. p.183.
- Press M. C., and G. K. Phoenix. 2005. Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist* 166: 737–751.
- Quandt D., K. Müller, M. Stech, J. P. Frahm, W. Frey, K. W. Hilu and T. Borsch. 2004. Molecular evolution of the chloroplast trnL-F region in land plants. *Monographs in Systematic Botanic from the Missouri Botanical Garden* 98: 13–37.
- Rallo P., A. Belaj, R. De La Rosa and I. Trujillo. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado: 1 agosto 2018. Disponible en [http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio\\_2000/almazara/almazara1.htm](http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm)

- Ranjan A., Y. Ichihashi, M. Farhi, K. Zumstein, B. Townsley, R. David-Schwartz, and N. R. Sinha. 2014. De novo assembly and characterization of the transcriptome of the parasitic weed dodder identifies genes associated with plant parasitism. *Plant physiology* 166: 1186-1199.
- Reville M. J. W., Stanley S., and J. M. Hibberd. 2005. Plastid genome structure and loss of photosynthetic ability in the parasitic genus *Cuscuta*. *Journal of experimental Botany* 56(419): 2477-2486.
- Robba L., S.J. Russell, G.L. Barker and J. Brodie. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93: 1101–1108.
- Roy S, A. Tyagi, V. Shukla, A. Kumar, U. M. Singh, L. B. Chaudhary, B. Datt, S. K. Bag, P. K. Singh, N. K. Nair, T. Husain and R. Tuli. 2010. Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: a case study with Indian *Berberis* Species. *PLoS ONE* 5: e13674.
- Runyon J. B., Mescher, M. C., and De Moraes, C. M. 2006. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science* 3: 1964-1967.
- Runyon J. B., M. C. Mescher, G. W. Felton, and C. M. De Moraes. 2010. Parasitism by *Cuscuta pentagona* sequentially induces JA and SA defence pathways in tomato. *Plant Cell Environ* 33: 290–303.
- Sadhe A. A. and K. Kumar. 2018. DNA barcoding of plants: Selection of core markers for taxonomic groups. *Plant Science Today* 5(1): 9-13.
- Sass C., D. Little, D. Stevenson and D. Specht. 2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *Plos One* 2(11): 1-9.
- Saunders G.W. 2005 Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1879–1888.
- Saunders G. W. and Kucera H. 2010. An evaluation of *rbcl*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie. Algologie* 31: 487–528.
- Scharaschkin T. and J. A. Doyle. 2005. Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphology and noncoding chloroplast sequence data. *Systematic Botany* 30: 712–735.
- Selleck G. W., R. S. Greider, and J. F. Creighton. 1979. Herbicides for dodder control in potatoes. *Proceedings of the Northeastern Weed Science Society* 33: 191-195.

- Shaw J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling, and R. L. Small. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- Sherman T. D., A. J. Bowling, B. T. Wayne, and K. C. Vaughn. 2008. The vestigial root of dooder (*Cuscuta pentagona*) seedlings. *International Journal of Plant Sciences* 169 (8): 998-1012.
- Shinozaki K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada, and M. Sugiura. 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The Embo Journal* 5: 2043–2049.
- Soltis D.E., P. S. Soltis and J. J. Doyle. 1998. *Molecular systematics of plants II, DNA sequencing*, Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- Son YO, J. Kim, J. C. Lim, Y. Chung, G. H. Chung and J. C. Lee. 2003. Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology* 41(10): 1421-1428.
- Stefanović S. and R. G. Olmstead. 2004. Testing the Phylogenetic Position of a parasitic plant (*Cuscuta*, Convolvulaceae, asteridae): Bayesian inference and the parametric bootstrap on Data Drawn from three genomes. *Systematic Biology* 53 (3): 384-399.
- Stefanović S. and R. G. Olmstead. 2005. Down the slippery slope: plastid genome evolution in Convolvulaceae. *Journal of Molecular Evolution* 61:292-305.
- Stefanović S., M. Kuzmina, and M. Costea. 2007. Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 94 (4): 568-589.
- Taberlet P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Taberlet P., E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly, C. Miquel, A. Valentini, T. Vermet, G. Corthier, C. Brochmann and E. Willerslev. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 3.
- Takhtajan, A. 1997. *Diversity and classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, New York, USA. pp: 643.

- USDA (United States Department of Agriculture). 2019. Federal noxious weed listing. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). Plant Protection Quarantine (PPQ). Consultado el 20 de enero de 2019. Disponible en: [https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/import-information/permits/regulated-organism-and-soil-permits/sa\\_noxious\\_weeds/ct\\_federal\\_noxious\\_weeds\\_home](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/import-information/permits/regulated-organism-and-soil-permits/sa_noxious_weeds/ct_federal_noxious_weeds_home)
- Valadez M. E and G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa México. Pp: 147.
- Van Der Kooij T. A. W., K. Krause, I. Dörr, and K. Krupinska. 2000. Molecular, functional and ultrastructural characterization of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta* 210: 701–707.
- Vaughn K. C. 2002. Attachment of the parasitic weed dodder to the host. *Protoplasma* 219: 227–237.
- Villaseñor J. L. R. y F. J. Espinosa G. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp: 448.
- Wallinger C., A. Juen, K. Staudacher, N. Schallhart, E. Mitterrutzner, E. M. Steiner, B. Thalinger, M. Traugott. 2012. Rapid Plant Identification Using Species- and Group Specific Primers Targeting Chloroplast DNA. *PLOS ONE* 7: 1-12, e29473.
- Ward J., R. Peakall, S. R. Gilmore, and J. Robertson. 2005. A molecular identification system for grasses: a novel technology for forensic botany. *Forensic Science International* 152: 121–131.
- Wattoo J. I., M. Z. Saleem, M. S. Shahzad, A. Arif, A. Hameed, M. A. Saleem. 2016. DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of *rbcl* and *matK* genome regions in three divergent plant species. *DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of rbcl and matK genome regions in three divergent plant species. Advancement in Life Sciences* 4(1): 03-07.
- Welsh M. 2009. Evolution and systematic significance of reproductive structures in the genus *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae): pollen and gynoecium. Theses and dissertations. pp: 957.
- Westwood J. H., J. I. Yoder, M. P. Timko, and C. W. Depamphilis. 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* 15: 227–235. doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.004 White T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, in: A. Innis, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky 1990. *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, USA, pp: 315-322.
- Wright M. 2011. The evolution of sexual reproduction in *Cuscuta* (Convolvulaceae). Theses and dissertations. pp: 1039.

- Yao H., J. Y. Song, C. Liu, K. Luo, J. P. Han and Y. Li. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PloS ONE 5: e13102.
- Yoshida S. and K. Shirasu. 2009. Multiple layers of incompatibility to the parasitic witchweed, *Striga hermonthica*. New Phytologist 183: 180–189.
- Yuncker T. G. 1932. The genus *Cuscuta*. Memoirs of the Torrey Botanical Club 18: 113–331.
- Ziegler H. 1975. Nature of transported substances. In M. H. Zimmermann and J. A. Milburn, eds. Phloem Transport. Encyclopedia of Plant Physiology New Series. Vol. I. Springer-Verlag, Berlin. pp: 50-100.

# CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE SIETE ESPECIES DEL GENERO *Cuscuta* DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA PARA MÉXICO

## 1.1. Introducción

En general la identificación de especies vegetales, se realiza mediante taxonomía, usando características morfológicas como son: tamaño, forma, color, tipos de hojas, flores, frutos, semillas, entre otras (Cullen, 2006). No obstante, aunque esta identificación sea de gran ayuda, puede presentar algunas limitaciones que deben de considerarse al momento de realizar la identificación de una especie, estas limitantes son la plasticidad fenotípica y variabilidad genética de las características usadas para la identificación de las especies (Chase y Fay, 2009; Jarman y Elliott 2000), existencia de taxones crípticos, la poca utilidad de las claves taxonómicas en una etapa fenológica de la planta y la falta de especialistas en cada uno de los grupos de interés (Hebert *et al.*, 2003a; Ratnasingham y Hebert, 2007; Paz *et al.*, 2011).

Puede existir una limitante en la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética en los caracteres para la identificación de especies (Paz *et al.*, 2011), ya que los genotipos tienen la habilidad de producir diferentes fenotipos en respuesta a las condiciones ambientales en que se desarrollan. Las plantas usan la plasticidad fenotípica para modificar su morfología y fisiología con el fin de adaptarse al medio ambiente donde crecen (Palacio-López y Rodríguez-López, 2007).

Por otro lado, no se estudian taxones morfológicamente crípticos que son comunes en muchos grupos (Hebert *et al.*, 2003). Además, las claves taxonómicas con las que usualmente se cuentan son útiles para una etapa fenológica del individuo, ya que la característica morfológica que se busca para la identificación es usualmente en edad adulta, por lo que una clave solo sería útil en ese momento (Hebert *et al.*, 2003; Paz *et al.*, 2011). Por último, el uso de estas claves taxonómicas requiere de un elevado nivel de conocimientos para evitar diagnósticos incorrectos (Chase y Fay, 2009).

En la actualidad se identifica una planta mediante comparación directa con ejemplares de herbario o con la ayuda de claves taxonómicas, generando que nuevas especies sean identificadas y se les pueda dar un nombre científico; basándose en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica; con el nombre de un taxón se puede obtener información como distribución, clima, hábitat, etc. La identificación de especies por medio de taxonomía ayuda al reconocimiento de la vegetación de cada país, así mismo proporciona estudios de flora o revisiones de grupos taxonómicos, si la información se basa en ejemplares de herbarios se puede obtener información sobre el rango de variación de las especies debido a las condiciones ambientales o a las respuestas genéticas de su adaptación (Benítez *et al.*, 2006). Basándonos en las características antes mencionadas, es factible decir que, la identificación de especies por medio de taxonomía seguirá usándose continuamente.

#### **1.1.1. Sistema de diagnóstico**

#### **1.1.2. Diagnóstico por caracteres morfológicos**

La identificación de plantas se realiza mediante el uso de claves taxonómicas y/o por comparación de características con ejemplares de herbario previamente identificados. Los caracteres para la identificación son principalmente de la etapa adulta, flor, fruto y semillas. La persona que realiza esta identificación debe conocer la familia a la que pertenece la planta a identificar, lo cual reduce la búsqueda del género y la especie. Además de conocer y estar familiarizado con los caracteres que se utilizan en las claves taxonómicas, para una correcta separación de los taxones, en sí, una clave resume la combinación de caracteres que deben de analizarse para poder identificar una planta (García-Beltran *et al.*, 2017).

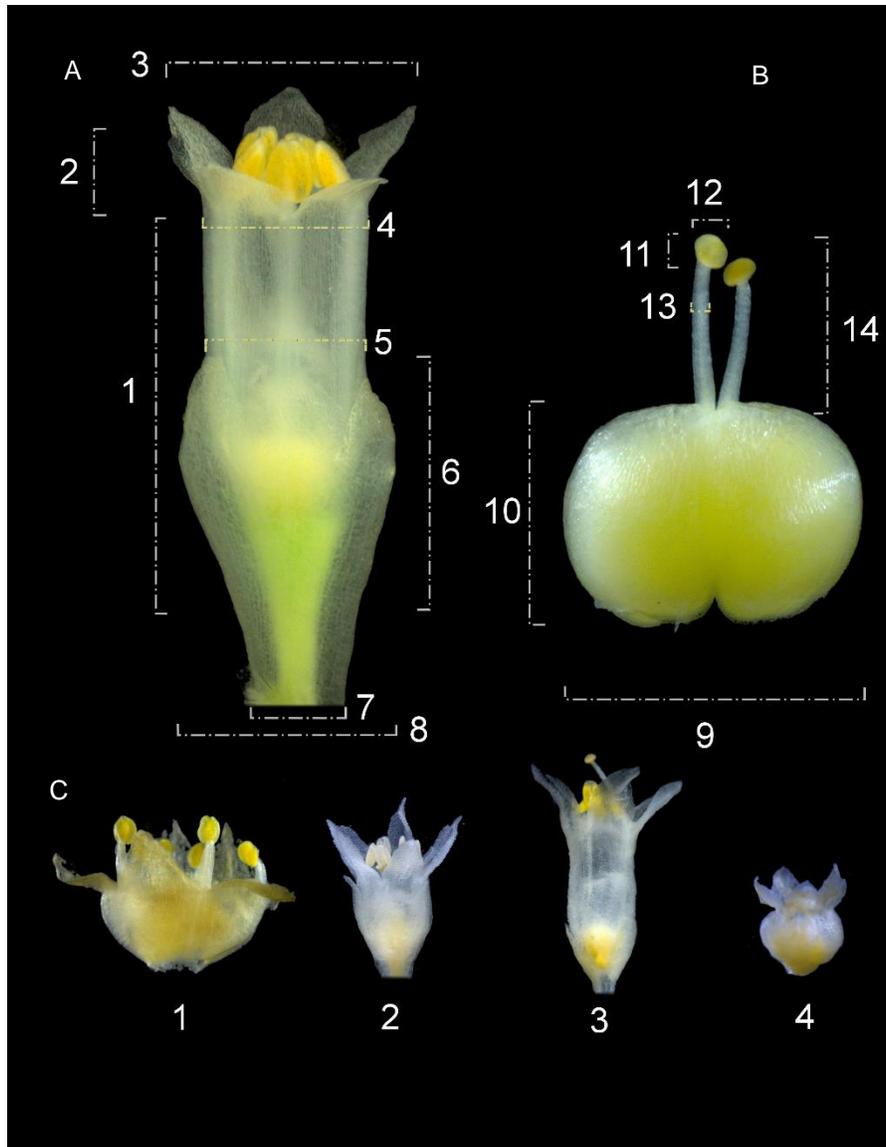
### **1.2. Descripción y morfología de *Cuscuta***

Las especies del género *Cuscuta*, se consideran plantas parásitas por que dependen de otras plantas de forma total o parcial para su supervivencia. Plantas anuales o en ocasiones perennes (Costea y Tardif, 2006). Presentan tallos filiformes trenzados de color verde pálido, hojas pequeñas reducidas a escamas, con flores pequeñas, no presenta raíz (Kuijt, 1969; Wright, 2011; Braukman *et al.*, 2012).

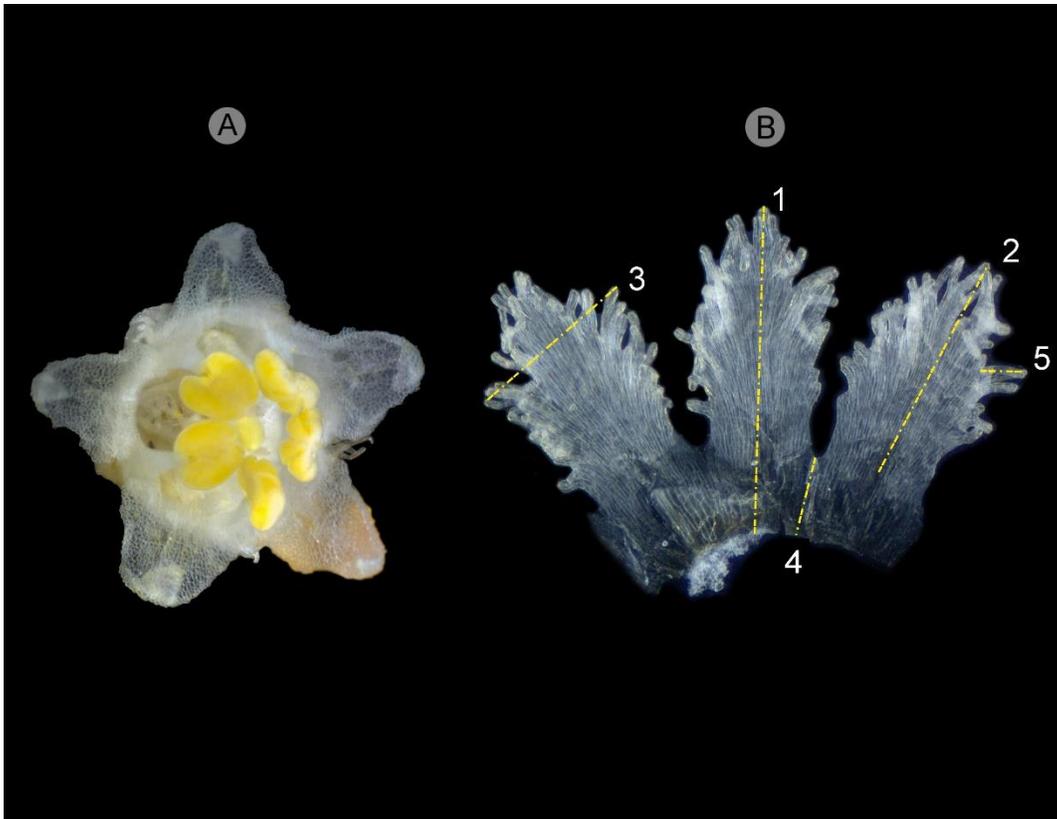
*Cuscuta* es uno de los grupos más diversos de la familia Convolvulaceae, debajo de la tribu Ipomoeae (“gloria de la mañana”) (Yuncker, 1932). Las diversas especies de *Cuscuta* se identifican con base a las estructuras florales y frutos (Figura 3); a la forma y tamaño del cáliz y la corola, morfología del estilo y estigma, así como, de la dehiscencia de la cápsula, debido a que presenta estructuras vegetativas reducidas y variabilidad infraespecífica (McNeal *et al.*, 2007; Alsaadi, 2016). Sus tallos filiformes miden de 0.3 a 2.0 mm de grueso, amarillos, naranjas o rojizos, glabros, que se enroscan de forma dextrorsa y se adhieren al hospedante por medio del haustorio (Costea y Tardif, 2006; Carranza, 2008). Las inflorescencias de plantas de *Cuscuta*, son estructuras cimosas, pero pueden ser cimas abiertas hasta grupos densos y globulares; además, de flores que se pueden enroscar alrededor de los tallos del hospedero. No todas las flores de una inflorescencia se abren a la vez, pero en el caso de las plantas de *Cuscuta*, presentan cientos de flores abiertas en muchas inflorescencias (Gómez, 1994; Wright, 2011). Sus flores miden aproximadamente 5.0 mm, son hermafroditas y actinomorfas, para expresar los caracteres de las flores de *Cuscuta* se indica con la siguiente fórmula:  $K(5)[C(5)A5]G(2)$ , que significa que es una dicotiledónea pentámera, cáliz con cinco sépalos unidos, corola con cinco pétalos juntos, androceo con cinco estambres unidos a los pétalos, gineceo supero con dos carpelos (Yuncker, 1932; Kuijt, 1969). El perianto es de tonos blanco-crema hasta rosas débiles y rojos purpúreos. El cáliz es gamosépalo generalmente persistente en el fruto (Yuncker, 1932), más corto que la corola, ocasionalmente más largo y envolvente, lóbulos variables, obtusos, agudos o acuminados, en algunas especies con proyecciones a manera de espolones o cuernos (Costea y Tardif, 2006; Carranza, 2008), la corola es gamosépala de forma variable, campanulada, tubular o cupular, lóbulos variables por lo regular ovados a lanceolados, erectos a extendidos, en ocasiones inflexos, obtusos, agudos o acuminados, comúnmente con apéndices dentados, orlados o fimbriados, llamados escamas infraestaminales (Costea y Tardif, 2006; Carranza, 2008), fusionados con el tubo del estambre de la corola adaxial, estas escamas pueden ser solitarias o unidas por puentes de tejido (Yuncker, 1932) (Figura 4), aunque aun no se ha determinado la función de las escamas infraestaminales (Stefanović *et al.*, 2007), algunos autores sugieren que sirven como protección y/o que están involucradas en la polinización (Heide-Jorgensen, 2008).

Estambres alternados con los lóbulos de la corola, insertos en o cerca de los senos, anteras ovadas, oblongas u orbiculares, sésiles o más comúnmente sobre filamentos delgados o más o menos subulados; ovario bilocular, cada lóculo con 2 óvulos anátropos, dos estilos terminales, separados o en ocasiones más o menos unidos, estigmas capitados o lineares; fruto a manera de cápsula globosa u ovoide, dehiscente e indehiscente, reventando irregularmente, o bien, abriendo por una línea de circuncisión regular o irregular cerca de la base; semillas de una a cuatro por cápsula, con frecuencia maduran sólo de 1 a 3, lisas o ligeramente arrugadas, rodeadas por el área umbilical, hilo pequeño, circular o alargado, embrión delgado, rodeado por una delgada capa de endospermo (Costea y Tardif, 2006; Carranza, 2008).

Derivado de la complejidad para realizar una adecuada identificación de las especies del género *Cuscuta*, el objetivo del presente trabajo fue elaborar un estudio sobre siete especies del género *Cuscuta*, con reporte de presencia en México, y generar una guía ilustrada que incluya características que apoyen a la identificación de estas especies; así mismo, elaborar un mapa de distribución geográfica a nivel nacional de las especies identificadas en campo que están afectando a cultivos de importancia agrícola y forestal.



**Figura 3.** Caracteres florales y formas de la corola. **A, Flor** 1) longitud del tubo de la corola, 2) longitud superior de los estambres al tubo de la corola, 3) ancho de los lóbulos de la corola, 4) diámetro de la boca del tubo de la corola, 5) diámetro del tubo de la corola en las puntas del lóbulo del cáliz, 6) longitud del cáliz, 7) ancho del pedicelo, 8) ancho del cáliz. **B, Gineceo** 9) ancho de ovario, 10) longitud del ovario, 11) longitud del estigma, 12) ancho del estigma, 13) ancho promedio del estilo, 14) longitud media del estilo. Medidas en milímetros de imágenes calibradas. **C, Formas de la corola.** 1) Cupular, 2) campanulada, 3) cilíndrica o tubular, 4) globosa. Tomado y adaptado de Wright *et al.* (2012).



**Figura 4.** Diagrama de flores de *Cuscuta*, características florales. **A)** Diagrama de flor con un cáliz gamosépalo y escamas fusionadas, corola y androceo. **B)** Mediciones de las escamas infraestaminales. 1) longitud total de la escama (puente y fimbria), 2) largo de la escama (no se incluye el puente), 3) ancho de la escama (incluyendo fimbrias), 4) longitud del puente, 5) longitud de la fimbria. Tomado y adaptado de Riviere *et al.* (2013).

### 1.3 Materiales y métodos

Desde el 2011, el laboratorio de Malezas del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) recibió de los 17 estados donde está vigente la Campaña contra Malezas Reglamentadas, ejemplares de *Cuscuta* que se encontraban parasitando cultivos, árboles o malezas. Por lo que se decidió revisar los ejemplares depositados en el Herbario del CNRF y ejemplares que se recolectaron con presencia de estructuras florales para su identificación, en los recorridos de campo que se hicieron durante 2018 en el estado de México, Morelos y Sonora (Figura 3), que se encontraban parasitando cultivos de importancia agrícola o forestal; además, que presentaran las estructuras florales para su identificación.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del CNRF de la Dirección General de Sanidad Vegetal, en el Laboratorio de Roedores, Aves y Malezas. Se revisaron 56 ejemplares depositados en el herbario del laboratorio para confirmar su identificación y se realizó una colecta de tres ejemplares con presencia de estructuras florales para su identificación (Cuadro 1), que se encontraban parasitando cultivos de importancia agrícola o forestal, en recorridos de campo en el Estado de México, Morelos y Sonora (Figura 3), los ejemplares recolectados se fotografiaron *in situ*, con una cámara Canon, EOS 1000D (Canon Mexicana, S. de R.L. de C.V., CDMX, México). En total, se analizaron 59 ejemplares.

Los ejemplares recolectados se llevaron al laboratorio para su posterior identificación. Cada uno de los especímenes se identificó usando las estructuras florales, siguiendo la metodología de acuerdo a Wright (2011); de cada ejemplar se removieron algunas flores y se colocaron en un vaso de precipitado de 50 mL, se agregó etanol al 50% para rehidratarlas. Posteriormente, se colocó el vaso sobre una plancha de calentamiento con agitación hasta alcanzar el punto de ebullición.

Después de enfriarse, las flores se tomaron con una pinza de relojero, se depositaron en una caja Petri con alcohol al 50%, se observaron en un microscopio estereoscopio Stemi 2000-C, (Carl Zeiss de México, S. A. de C. V., CDMX., México) posteriormente, se separaron las partes, para observar los caracteres taxonómicos de la flor: cáliz, corola, escamas infraestaminales, estilos, estigmas, cápsula y semillas. Con la cámara fotográfica AxioCam ERc5s y el software ZEN 2012 blue edition (Carl Zeiss de México, S. A. de C. V., CDMX., México), se tomaron fotografías de estos caracteres, utilizando diferentes aumentos según el tamaño de las estructuras.

**Cuadro 1.** Información de los ejemplares de *Cuscuta* que se revisaron y recolectaron en la presente investigación.

| Especies   | Estados          | Municipio                | Cultivo           | Latitud    | Longitud    | Fecha de recolecta |
|--|------------------|--------------------------|-------------------|------------|-------------|--------------------|
| <i>Cuscuta campestris</i> Yunck.   | Jalisco          | Autlán de Navarro        | Alfalfa           | 19.8166    | -104.2578   | 13/05/2013         |
|  | Jalisco          | Autlán de Navarro        | Alfalfa           | 19.76287   | -104.30277  | 10/10/2012         |
|  | Hidalgo          | Metztlitlan              | Zanahoria         | 20.60418   | -98.79147   | 13/04/2018         |
|  | Sonora           | Huatabampo               | Cártamo           | 26.84097   | -109.66437  | 12/06/2017         |
| <i>Cuscuta chinensis</i> Lam. var. <i>applanata</i> (Engelm.) Costea y Stefanov. | Zacatecas        | Ojo caliente             | Frijol            | 22.99282   | -102.29036  | 17/09/2012         |
|  | Zacatecas        | Guadalupe                | Chile             | 22.63279   | -102.22033  | 06/09/2013         |
|  | Chihuahua        | Juárez                   | Alfalfa           | 31.45411   | -106.19349  | 17/08/2015         |
| <i>Cuscuta corymbosa</i> Ruiz y Pav. var. <i>stylosa</i> Engelm.                 | Distrito federal | Xochimilco               | Maíz criollo      | 19.253056  | -98.991806  | 03/11/2009         |
|  | Morelos          | Zacatepec                | Bugambilia        | 18.65586   | -99.19257   | 10/02/2014         |
|  | Estado de México | Chalco                   | Huazontle         | 19.23616   | -98.93892   | 30/10/2014         |
|  | Hidalgo          | El Arenal                | Pirúl             | 20.18408   | -99.89152   | 22/06/2015         |
|  | Morelos          | Amacuzac                 | Cultivo de Pápalo | 18.61926   | -99.33846   | 10/02/2014         |
| <i>Cuscuta costaricensis</i> Yunck.  | Querétaro        | San Juan del Río         | Maíz              | 20.4368    | -100.04273  | 10/10/2011         |
|  | Querétaro        | Corregidora              | Alfalfa           | 20.45179   | -100.39243  | 17/10/2012         |
|  | Aguascalientes   | Rincón de Romos          | Membrillo         | 22.22177   | -102.27663  | 04/09/2018         |
| <i>Cuscuta indecora</i> Choisy   | Chihuahua        | Delicias                 | Alfalfa           | 28.16539   | -105.49928  | 30/06/2015         |
|  | Hidalgo          | San Salvador             | Alfalfa           | 20.2842    | -99.0203    | 28/04/2015         |
|  | Nuevo Leon       | General Terán            | Guaje             | 25.41515   | -99.55708   | 21/10/2013         |
|  | Querétaro        | Colón                    | Alfalfa           | 20.7641    | -100.031012 | 22/10/2014         |
|  | Hidalgo          | Chapantongo              | Alfalfa           | 20.28282   | -99.41673   | 07/07/2017         |
|  | Sonora           | Hermosillo               | Alfalfa           | 29.076355  | -110.941672 | Sin información    |
|  | Chihuahua        | Julimes                  | Alfalfa           | 28.48255   | -105.45563  | 25/07/2014         |
|  | Chihuahua        | Julimes                  | Alfalfa           | 28.48203   | -105.44769  | 25/07/2014         |
|  | Chihuahua        | Rosales                  | Alfalfa           | 28.4583    | -105.58012  | 24/07/2014         |
|  | Chihuahua        | Galeana                  | Alfalfa           | 30.002209  | -107.5479   | 29/07/2014         |
|  | Chihuahua        | Buenaventura             | Alfalfa           | 29.96421   | -106.81811  | 29/07/2014         |
|  | Chihuahua        | San Francisco de Conchos | Alfalfa           | 27.5818    | -105.3533   | 21/06/2015         |
|  | Chihuahua        | Buenaventura             | Alfalfa           | 29.95271   | -106.77189  | 25/06/2015         |
|  | Chihuahua        | Delicias                 | Alfalfa           | 28.26434   | -105.4239   | 30/06/2015         |
|  | Chihuahua        | Ojinaga                  | Alfalfa           | 29.56373   | -104.45871  | 21/07/2015         |
|  | Chihuahua        | Ojinaga                  | Alfalfa           | 29.55995   | -104.43341  | 21/07/2015         |
| Chihuahua  | Juárez           | Alfalfa                  | 31.3704           | -105.97718 | 17/07/2015  |                    |

|   |                  |                  |                      |           |             |                 |
|---|------------------|------------------|----------------------|-----------|-------------|-----------------|
|   | Chihuahua        | R. el Refugio    | Alfalfa              | 26.70881  | -105.14914  | Sin información |
|   | Hidalgo          | Tlahuelilpan     | Alfalfa              | 20.11121  | -99.22571   | 11/12/2014      |
|   | Hidalgo          | Ixmiquilpan      | Alfalfa              | 20.46174  | -99.14112   | 04/12/2013      |
|   | Hidalgo          | Chicautla        | Alfalfa              | 20.39859  | -99.19546   | 10/06/2014      |
|   | Hidalgo          | Ajacuba          | Alfalfa              | 20.13446  | -99.08709   | 26/06/2014      |
|   | Hidalgo          | Col. Morelos     | Alfalfa              | 20.24116  | -99.145     | 14/04/2015      |
|   | Nuevo León       | General Terán    | Limón                | 25.24757  | -99.71989   | 18/10/2013      |
|   | Nuevo León       | General Terán    | Anacuas y huizaches  | 25.3173   | -99.74506   | 01/11/2012      |
|   | Nuevo León       | General Terán    | Anacuas y huizaches  | 25.31602  | -99.74378   | 01/11/2012      |
|   | Nuevo León       | General Terán    | Ébanos y huizaches   | 25.31761  | -99.71841   | 01/11/2012      |
|   | Nuevo León       | General Terán    | Anacuas y Huizache   | 25.3173   | -99.74506   | 01/11/2012      |
|   | Nuevo León       | Allende          | Chaparro prieto      | 25.3148   | -100.04552  | 30/10/2012      |
|   | Nuevo León       | Allende          | Chaparro prieto      | 25.3148   | -100.04552  | 30/10/2012      |
|   | Puebla           | Oriental         | Alfalfa              | 18.34015  | -97.22921   | 03/02/2011      |
|   | Querétaro        | Ezequiel Montes  | Alfalfa              | 20.65597  | -99.95792   | 29/05/2014      |
|   | Querétaro        | El Marqués       | Alfalfa              | 20.53541  | -100.1936   | 29/07/2014      |
|   | Querétaro        | El Marques       | Alfalfa              | 20.755712 | -100.364709 | 11/09/2014      |
|   | Querétaro        | Tolimán          | Alfalfa              | 20.8773   | -99.9956    | Sin información |
|   | Querétaro        | San Juan del Río | Alfalfa              | 20.436141 | -100.06279  | Sin información |
| <b><i>Cuscuta mitriformis</i> Engelm. Ex Hemsl.</b> | CDMX             | Xochimilco       | Ebo                  | 19.18443  | -99.12026   | 12/07/2016      |
|   | Estado de México | Juchitepec       | Frijol               | 19.08668  | -98.90679   | Sin información |
|   | Estado de México | Ixtapaluca       | Ebo                  | 19.36572  | -98.84572   | 30/11/2016      |
| <b><i>Cuscuta tinctoria</i> Mart. ex Engelm</b>     | Querétaro        | Querétaro        | Pirú                 | 20.58849  | -100.43378  | 10/09/2013      |
|   | Aguascalientes   | Aguascalientes   | árbol en zona urbana | 21.8866   | -102.3172   | Sin información |
|   | Estado de México | Tecámac          | Pirú                 | 19.710248 | -98.974305  | 07/09/2018      |
|   | Morelos          | Tepoztlán        | Árbol forestal       | 18.9538   | -99.09608   | 20/07/2018      |
|   | Hidalgo          | Chicautla        | Pirú                 | 20.32685  | -99.22945   | 26/05/2014      |

Las fotografías de las diferentes estructuras de la flor, se ensamblaron mediante el programa CombineZP 1.0 (CombineZ-Pyramid por sus siglas en inglés) (Hadley, 2006), con la finalidad de obtener una sola fotografía de calidad de cada estructura. Se usó el programa GIMP 2.10.0 (GNU Image Manipulation Program, por sus siglas en inglés), para limpiar el fondo de las fotografías y agregar la escala milimétrica. Se realizaron algunas mediciones de las características florales con el programa ZEN 2012 blue edition, (Carl Zeiss de México, S. A. de C. V., CDMX., México) que se compararon con las mediciones que son presentadas por Welsh *et al.* (2010), Wright *et al.* (2012) y Riviere *et al.* (2013); además, de servir como apoyo en la identificación junto con las claves taxonómicas y descripciones de acuerdo a Yuncker (1932; 1965) Costea y Tardif (2006), Costea *et al.* (2006, 2011, 2011a, 2012, 2013); así mismo, se consultaron ejemplares de colección determinados por el Dr. Mihai Costea, especialista de este género, del Departamento de Biología, Universidad Wilfrid Laurier, Canadá; así como, la observación de 226 ejemplares escaneados de los herbarios MEXU del Instituto de Biología de la UNAM y 18 ejemplares del New York Botanical Garden Steere Herbarium. El mapa de distribución de los sitios de recolecta de las siete especies de *Cuscuta*, se realizó utilizando el programa ArcGIS Versión 10.1 (ESRI, 2012).

#### **2.4. Resultados y discusión.**

De las recolectas que se realizaron entre 2011 a 2018, se revisaron 59 ejemplares del género *Cuscuta* los cuales se encontraban parasitando los cultivos de *Medicago sativa* (alfalfa) *Daucus carota* (zanahoria), *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Capsicum annuum* (chile), *Zea mays* (maíz), *Bougainvillea glabra* (bugambilia), *Chenopodium nuttalliae* (huazontle) y algunos árboles como *Leucaena leucocephala* (guaje), *Cydonia* (membrillo), *Schinus molle* (pirúl), *Ficus* (ficus), *Vicia sativa* (ebo) y otros árboles forestales (Figura 5).



**Figura 5.** Presencia de *Cuscuta* en diferentes hospedantes. A) y B) árbol invadido por plantas de *Cuscuta* en Morelos, México. C) Invasión de *Cuscuta* en árbol de pirúl Estado de México, México. D) Disminución de biomasa en el cultivo de alfalfa a causa de *Cuscuta*, Sonora, México.

Con ayuda de claves taxonómicas, mediciones, fotografías y comparación de ejemplares, se identificaron siete especies:

1. *C. campestris* Yunck.
2. *C. chinensis* Lam. var. *applanata* (Engelm.) Costea y Stefanov.
3. *C. corymbosa* Ruiz y Pav. var. *stylosa* Engelm.
4. *C. costaricensis* Yunck.
5. *C. indecora* Choisy
6. *C. mitriformis* Engelm. ex Hemsl.
7. *C. tinctoria* Mart. ex Engelm.

Los cortes que se realizaron a las flores permitieron observar las estructuras para identificar las especies, en el Cuadro 2 se describen los caracteres morfológicos tomados

de las claves taxónomicas para cada una de ellas: tamaño de los pedicelos, tipo de inflorescencia, tamaño de las flores, presencias de laticíferos en cáliz, corola, tamaño y forma de escamas; además, la información del cuadro 3 presenta las medidas de las estructuras florales conforme a las figuras 1 y 2 de las especies identificadas, que se complementó con las fotografías que se tomaron del tipo de inflorescencia (Figura 6), flor (Figura 7), cáliz y corola (Figura 8), corte del cáliz (Figura 9), corte de la corola (Figura 10), escamas infraestaminales (Figura 11), cápsula (Figura 12) y semillas (Figura 13), para que se pudieran observar las características y diferencias de cada una de estas especies.

**Cuadro 2.** Caracteres morfológicos de siete especies de *Cuscuta* de importancia agrícola y forestal en México.

| Estructuras    |                           | <i>C. campestris</i><br>Yunck.                         | <i>C. chinensis</i> Lam.<br>var. <i>applanata</i><br>(Engelm) Costea y<br>Stefanov. | <i>C. corymbosa</i><br>Ruiz y Pav. var.<br><i>stylosa</i> Engelm. | <i>C. costaricensis</i><br>Yunck                            | <i>C. indecora</i> Choisy                                  | <i>C. mitriformis</i><br>Engelm. ex<br>Hemsl.      | <i>C. tinctoria</i> Mart. ex<br>Engelm.                |
|----------------|---------------------------|--|---|---|---|--|--|--|
| Pedicelos      | Grosor                    | delgados a medios                                      | delgados  | grosor medio  | delgados a medios   | delgados a medios  | gruesos  | medianos   |
|                | Color                     | amarillo-naranjas                                      | amarillos a cremosos  | naranja   | amarillo-naranja  | amarillo-naranja   | naranjas   | amarillo-naranja                                       |
|                | Tamaño (mm)               | -  | 0.4-3.0   | 2.0-6.0   | 0-1.5   | 0.5-6.0  | 0.5-2.0  | 0.5-2.6  |
| Inflorescencia | Tipo                      | cimas aglomeradas,<br>compactas                        | glomeruladas a<br>paniculiformes<br>densas  | cimas<br>corimbiformes  | racimos<br>glomerulados                                     | paniculiformes o<br>coribiformes sueltas<br>a densas       | racimos<br>compactos                               | glomerulos densos                                      |
|                | Tipo                      | Pentámera  | pentámera   | pentámera   | pentámera   | pentámera  | pentámera  | pentámera  |
| Flores         | Color                     | blanca – amarilla                                      | blanco cremosos -<br>amarillo cremoso   | blanca – marrón   | blanco - cremosas   | blanco translucido-<br>amarillo cremoso o<br>marrón oscuro | blanco - marrón<br>cremoso                         | blancas - marrón<br>rojizas                            |
|                | Tamaño (mm)               | aprox. 1.5-2.0   | 2.5-3.5   | 4.5-6.5 (-7)  | aprox. 4.0  | 2.0-5.0  | 3.2-5.5  | 3.0-5.2  |
|                | Tamaño (mm)               | aprox. 1.5-2.0   | 1.5 – 2.0   | 2.0-2.5   | 3.2 - 3.5   | 1.2-2.0  | aprox. 3.0   | 2.0- 3.0   |
| Cáliz          | Lóbulos                   | Ovados   | ovado triangulares  | obtusos   | ovado, agudos o<br>acuminados,<br>ligeramente<br>imbricados | triangular ovado   | ovados, obtusos                                    | obtusos  |
|                | Ápices                    | obtusos a<br>redondeados                               | obtusos a redondeado  |   |   | agudos   |  | redondeados  |
|                | Laticíferos               |  | si  |   |   | si   |  | protuberancias<br>multicelulares                       |
|                | Forma                     | Cupulada   | campanulada   | cilíndrica  | cilíndrica a<br>campanulada                                 | campanulada a<br>campanulada<br>cilíndrica                 | campanulada,<br>cilíndrica                         | campanulada  |
| Corola         | Tamaño (mm)               | 1.5-2.0  | 2.0-3.3   | 4.0   | 3.0-4.0   | 2.5-4.5  | 3.0  | 2.8-5.0  |
|                | Lóbulos                   | triangulares a<br>sublanceolados                       | ovado-lanceolados   | ovalado-oblongos,<br>obtusos, erectos                             | ovados o<br>suborbiculares,<br>erectos o extendidos         | triangular-ovado   | ovados, obtusos                                    | ovados a oblongos,<br>obtusos                          |
|                | Tamaño de<br>lóbulos (mm) | 1.5-2.0  | 0.9-1.3   | 1/4-1/2 del tubo<br>de la corola                                  | más cortos que el<br>tubo de la corola                      | 0.7-1.5  | tan largos como<br>el tubo de la<br>corola         | Igual que el tubo de<br>la corola                      |
|                | Ápices                    | agudos e inflexos                                      | obtusos a redondeado  | no  | agudos o<br>acuminados, cúspide<br>de 0.1 - 0.3 mm          | agudos inflexos  |  | margen entero o<br>serrulado                           |
|                | Tamaño (mm)               | más cortos que los<br>lóbulos de la corola,<br>1.5-2.0 | más cortos que los<br>lóbulos de la corola,<br>2.0-3.3                              | mitad de largo<br>que los lóbulos de<br>la corola, 4.0            | más cortos que los<br>lóbulos de la corola,<br>3.0-4.0      | más cortos que los<br>lóbulos de la corola,<br>2.5-4.5     | más cortos que<br>los lóbulos de la<br>corola, 3.0 | más cortos que los<br>lóbulos de la corola,<br>2.8-5.0 |

|                                     |                            |   |                    |  |  |  |   |                                       |
|-------------------------------------|----------------------------|---|--------------------|--|--|--|---|---------------------------------------|
| <b>Escamas<br/>Infraestaminales</b> | Tamaño (mm)                | 1.5-2.0                                     | 1.2-1.8            | 1/2 - 3/4 del<br>tamaño del tubo<br>de la corola | 2.0-2.8                                | 1.5-2.8                                | 1.5-3.5                                   | 1.4-3.0                               |
|                                     | Forma                      | oblongo - ovadas                            | obovadas           | oblongas   | obovadas a<br>espatuladas,<br>oblongas | obovadas a<br>espatuladas,<br>oblongas | oblongas                                  | oblonga, elíptica,<br>obovada         |
|                                     | Tamaño de<br>fimbrias (mm) | 0.3-0.4 (-0.5)                              | 0.2-0.4            | 0.1-0.3  | 0.2-0.4                                | 0.2-0.4                                | 0.1-0.4                                   | 0.2-0.5                               |
| <b>Ovario</b>                       | Forma                      | globoso                                     | globoso            | globoso u ovoideo                                | globoso                                | globoso                                | cónico                                    | globoso                               |
| <b>Estilo</b>                       | Tamaño                     | delgados, más<br>pequeños que la<br>capsula | 0.8 - 1.8 mm       | delgados y más<br>largos que la<br>capsula       | delgados, desiguales                   | 1 - 2.5 mm                             | subulados, más<br>cortos que el<br>ovario | delgados, más<br>largos que el ovario |
| <b>Capsula</b>                      |                            | indehiscente                                | dehiscente         | dehiscente                                       | circuncil                              | indehiscente                           | dehiscentes                               | circuncil                             |
| <b>Semilla</b>                      | Número                     | 4.0   | 3.0 o 4.0          | 1.0 a 4.0  | 2.0 o 3.0                              | 2.0 a 4.0                              | 4.0                                       | 3.0 a 4.0                             |
|                                     | Tamaño (mm)                | 1.5   | 0.85-1.2 * 0.8-1.1 | 1.5  | 1.4 - 1.7                              | 1.7                                    | 2.0                                       | 1.5                                   |

**Cuadro 3.** Medidas de los caracteres florales y escamas infraestaminales de siete especies de *Cuscuta* de importancia agrícola y forestal en México.

|  | <i>C. campestris</i><br>Yunck. | <i>C. chinensis</i> Lam. var.<br><i>applanata</i> (Engelm)<br>Costea y Stefanov. | <i>C. corymbosa</i> Ruiz<br>y Pav. var. <i>stylosa</i><br>Engelm. | <i>C. costaricensis</i><br>Yunck | <i>C. indecora</i> Choisy | <i>C. mitriformis</i><br>Engelm. ex Hemsl. | <i>C. tinctoria</i> Mart.<br>ex Engelm. |
|--|--------------------------------|--|---|----------------------------------|---------------------------|--|---|
| <b>Forma de la corola</b>  | cupulada                       | campanulada  | tubular   | campanulada                      | campanulada               | campanulada                                | campanulada                             |
| <b>Longitud del tubo de la corola (mm)</b>                           | 1.1                            | 2.2  | 3.4   | 2.3                              | 2.4                       | 2.3  | 2.7                                     |
| <b>Longitud de las proyecciones que sobresalen de la corola (mm)</b> | 0.5                            | 1.1  | 1.0   | 1.3                              | 1.5                       | 1.1  | 1.7                                     |
| <b>Ancho de los lóbulos de la corola (mm)</b>                        | 3.1                            | 3.4  | 2.8   | 4.6                              | 4.7                       | 4.1  | 3.3                                     |
| <b>Longitud del cáliz (mm)</b>                                       | 1.5                            | 2.0  | 1.3   | 2.5                              | 2.3                       | 2.4  | 2.6                                     |
| <b>Ancho del pedicelo (mm)</b>                                       | 0.5                            | 0.4  | 1.0   | 0.8                              | 0.6                       | 0.7  | 0.8                                     |
| <b>Ancho del cáliz (mm)</b>  | 2.0                            | 2.4  | 1.6   | 2.8                              | 2.9                       | 3.1  | 3.1                                     |

|  |                  |                |                |                  |                                 |                |                               |
|--|------------------|----------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|-------------------------------|
| <b>Escamas presentes</b>                     | si               | Si             | si             | si               | si                              | si             | si                            |
| <b>Tipo de escamas</b>                       | <i>Cuscuta</i>   | <i>Cuscuta</i> | <i>Cuscuta</i> | <i>Cuscuta</i>   | <i>Cuscuta</i>                  | <i>Cuscuta</i> | <i>Cuscuta</i>                |
| <b>Forma de la escama</b>                    | Oblonga, obovada | Obovada        | Oblonga        | Oblonga, obovada | Obovada,<br>espatulada, oblonga | Oblonga        | Oblonga, elíptica,<br>obovada |
| <b>Forma del apéndice de la escama</b>       | Redondeado       | Redondeado     | Redondeado     | Redondeado       | Redondeado                      | Redondeado     | Redondeado                    |
| <b>Longitud de la escama (mm)</b>            | 1.8              | 1.6            | 2.0            | 2.0              | 2.8                             | 1.9            | 2.6                           |
| <b>Longitud del cuerpo de la escama (mm)</b> | 1.3              | 0.9            | 1.6            | 1.3              | 2.0                             | 1.2            | 1.6                           |
| <b>Longitud del puente (mm)</b>              | 0.4              | 0.6            | 0.4            | 0.7              | 0.6                             | 0.8            | 0.9                           |
| <b>Ancho de la escama (mm)</b>               | 0.9              | 1.0            | 0.6            | 0.8              | 1.5                             | 0.8            | 1.1                           |
| <b>Longitud de las fimbrias (mm)</b>         | 0.4              | 0.2            | 0.3            | 0.2              | 0.6                             | 0.3            | 0.2                           |

Se realizaron las identificaciones taxonómicas del género *Cuscuta* con base a lo reportado por Yuncker (1932); Carranza (2008); Costea y Tardif (2006); Costea *et al.*, (2006, 2011, 2011a, 2012, 2013), además de Riviere *et al.*, (2013); Welsh *et al.*, (2010) y Wright *et al.*, (2012).

De acuerdo a lo mencionado por Costea y Tardif (2006) las flores de *C. campestris* llegan a medir entre 1.5–2.0 mm de largo, mientras que los tubos de la corola de las especies recolectadas midieron 1.1 mm, se observó un tamaño menor a lo reportado. La diferencia de tamaño puede deberse a la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética que puede influir en los caracteres para identificación, como indicó Palacio-López y Rodríguez-López (2007), quienes mencionaron que las plantas se adaptan y pueden producir diferentes respuestas a las condiciones ambientales en las que se están desarrollando.

Por otro lado *C. chinensis* var. *applanata*, no muestra cambios significativos, el tamaño es similar a lo reportado por Costea *et al.* (2011).

El caso de *C. corymbosa*, la corola mide aproximadamente 4 mm, según lo que indica Carranza (2008), la medición que se obtuvo de la corola fue de 3.4 mm, para diferenciar entre las dos variedades existentes, se revisaron las descripciones de Costea *et al.* (2012) y Carranza (2008); para *C. corymbosa* var. *grandiflora* las flores tienen una longitud de 4.5-6.5(-7) mm, la corola mide 4-6 mm de longitud (Costea *et al.*, 2012). Sin embargo, para *C. corymbosa* var. *stylosa*, de acuerdo a Carranza (2008), reporto que las flores miden 3.0 mm de longitud, las escamas infraestaminales alcanzan la mitad del tubo de la corola. De acuerdo a esta descripción, la especie identificada en este trabajo fue *C. corymbosa* var. *stylosa*.

El tamaño de *C. indecora* corresponde a lo indicado por Costea *et al.* (2006) y Yuncker (1932).

Las medidas obtenidas en este trabajo para *C. costaricensis*, están dentro de los valores que reportó Carranza (2008) y Costea *et al.* (2011), para la longitud de flor, escamas y

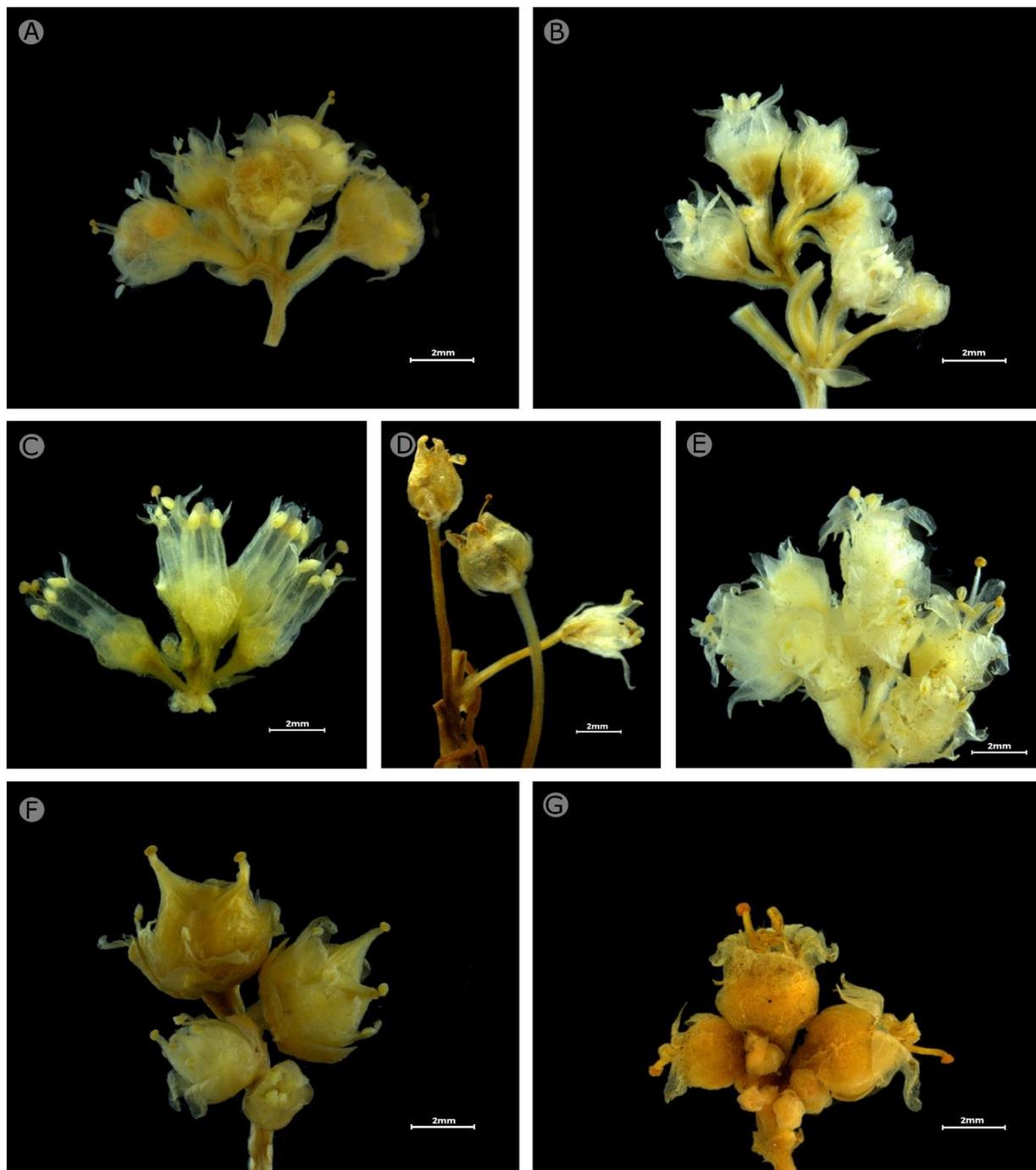
fimbrias, pero existe una diferencia en la longitud del cáliz de 0.7 mm, ya que lo reportado es de 3.2-3.5 mm y la medida que se tomó fue de 2.5 mm, causado quizás por cuestiones ambientales del medio donde se desarrolló,

No existió diferencia en las medidas que se tomaron en *C. mitriformis* y lo reportado por Carranza (2008); así mismo, las medidas de *C. tinctoria*, se encuentran dentro del rango que indican Yuncker (1932) y Costea (2013).

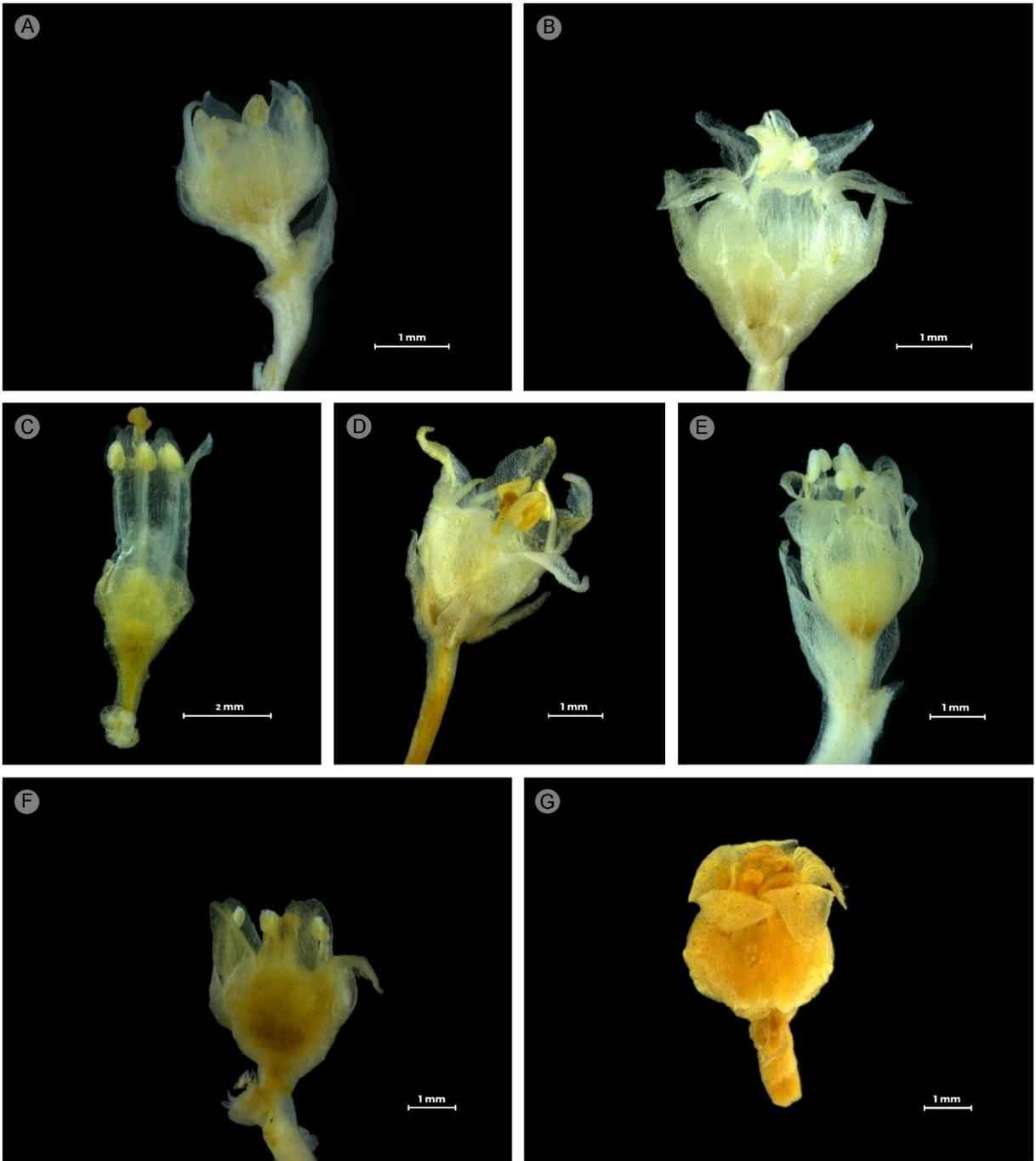
Las medidas que se obtuvieron de la corola, el cáliz y las escamas infraestaminales de algunas especies de *Cuscuta*, no concordaron al 100% con las que indican Riviere *et al.* (2013), Welsh *et al.* (2010) y Wright *et al.* (2012); sin embargo, la información que se obtuvo ayudó a descartar a otras especies del género, ya que las medidas que se tomaron, se complementaron con las características presentes en el cuadro 3, la comparación de estructuras de los ejemplares determinados por el especialista de este género el Dr. Mihai Costea y los ejemplares escaneados de los herbarios virtuales.

Aunque algunas especies, como indican Costea y Stefanović (2009), Costea *et al.* (2009a), Costea (2010) y Braukman *et al.* (2012), deben de conservarse ya que son especies endémicas, también debemos ver que algunas especies están afectando a cultivos, como se observa en el cuadro 1, algunas especies solo se encontraron una vez en esos cultivos, pero existen otras especies como *C. indecora*, la cual tuvo un mayor número de recolectas en el cultivo de alfalfa, posiblemente derivado de la importación de semillas con origen de Australia, E.E. U.U. y España. Además, de los reportes de productores y la campaña contra malezas reglamentadas que se lleva a cabo en todos los estados de la república.

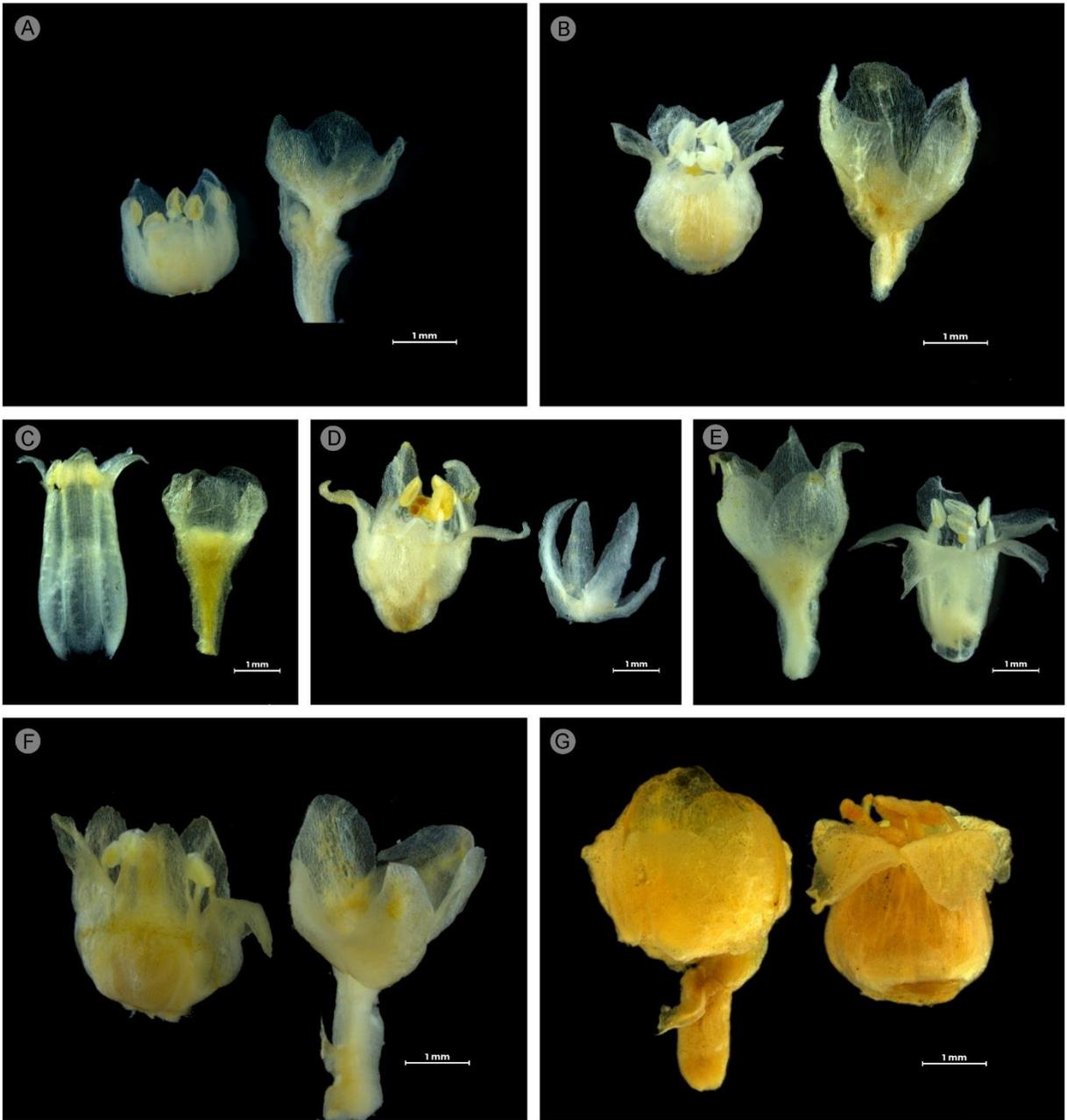
#### 1.4.1. Caracteres morfológicos para la identificación de siete especies de *Cuscuta*



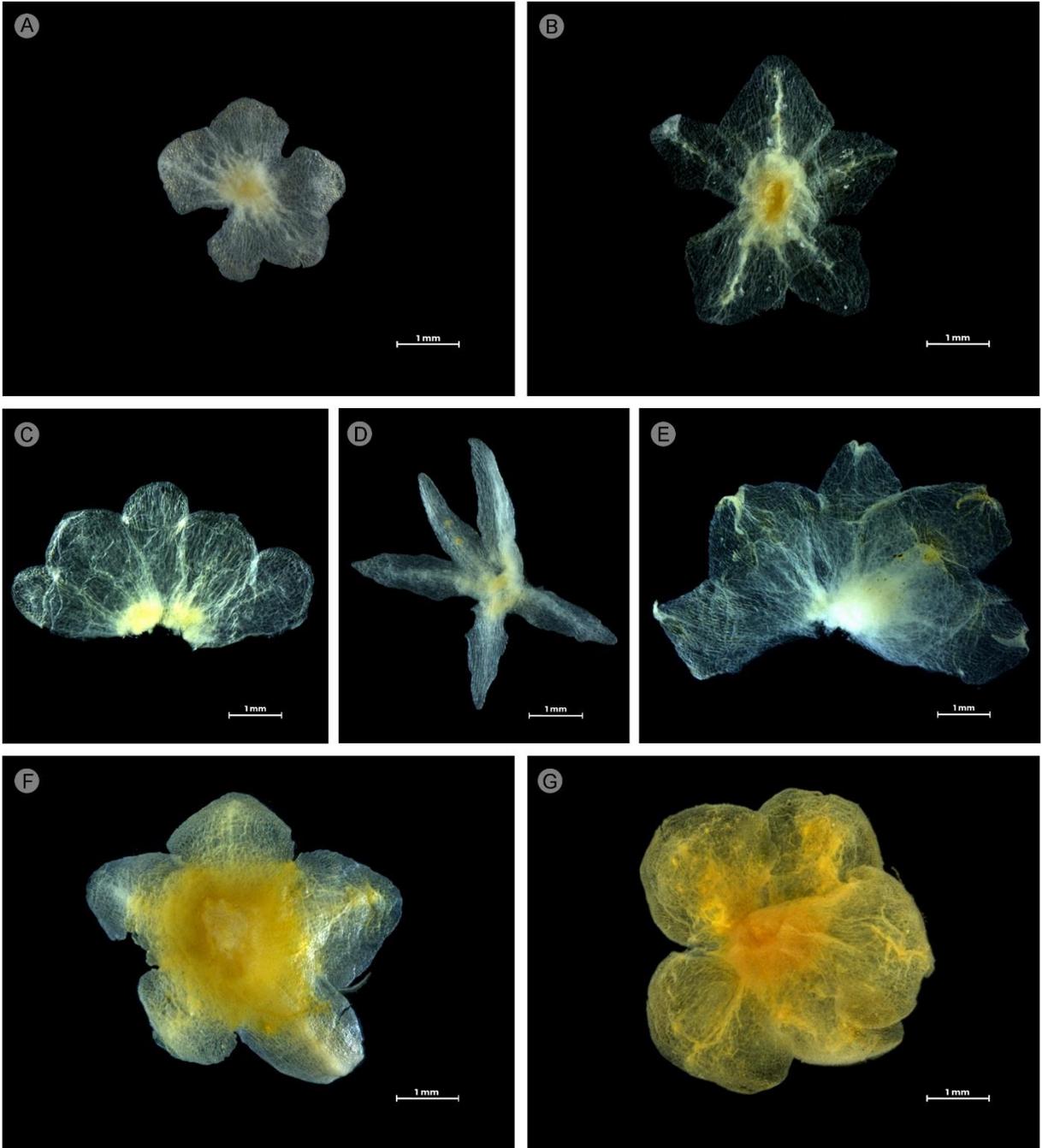
**Figura 6.** Características comparativas de la inflorescencia de siete especies de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.



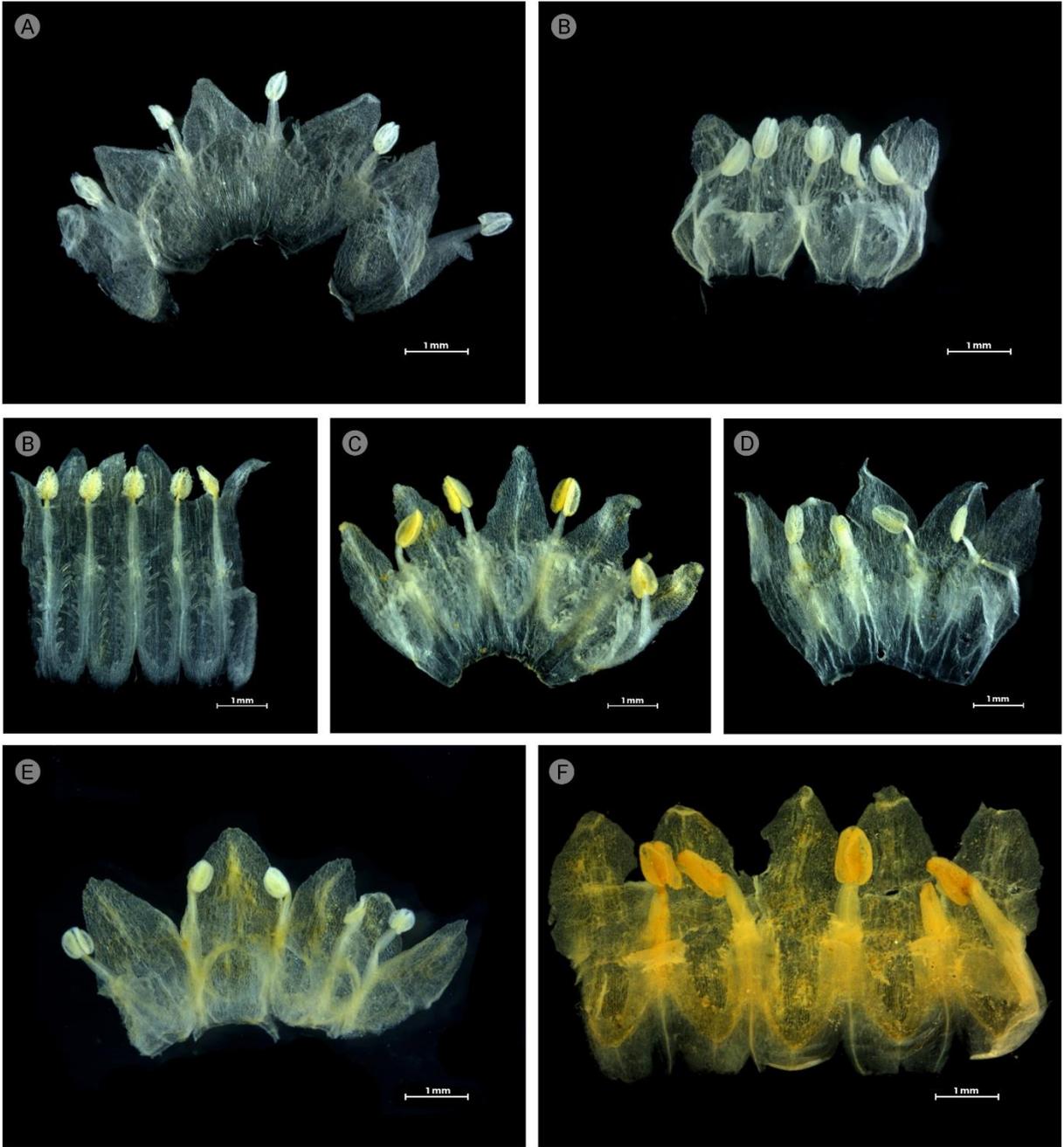
**Figura 7.** Morfología comparativa de flores de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.



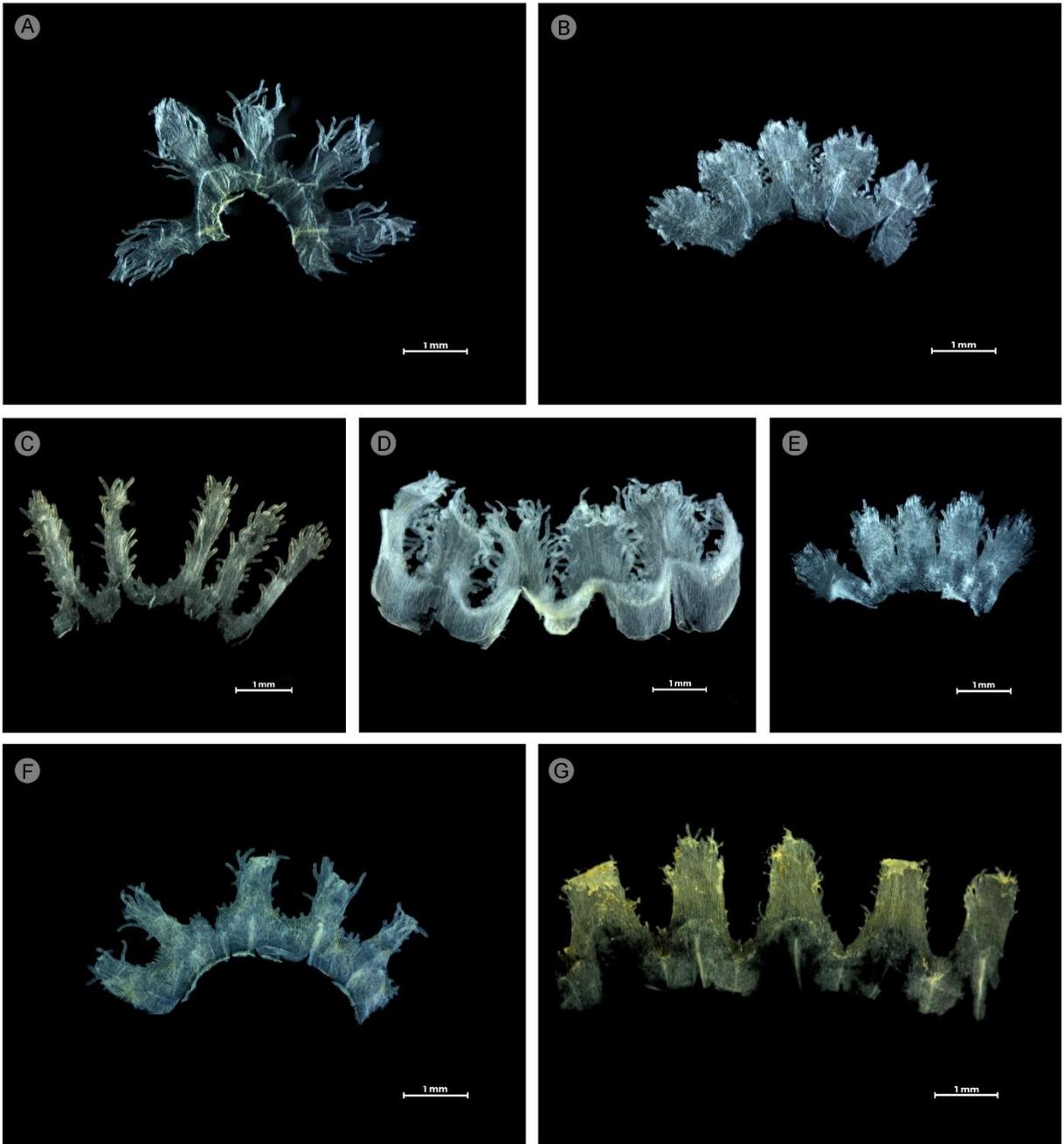
**Figura 8.** Morfología comparativa del cáliz y corola de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.



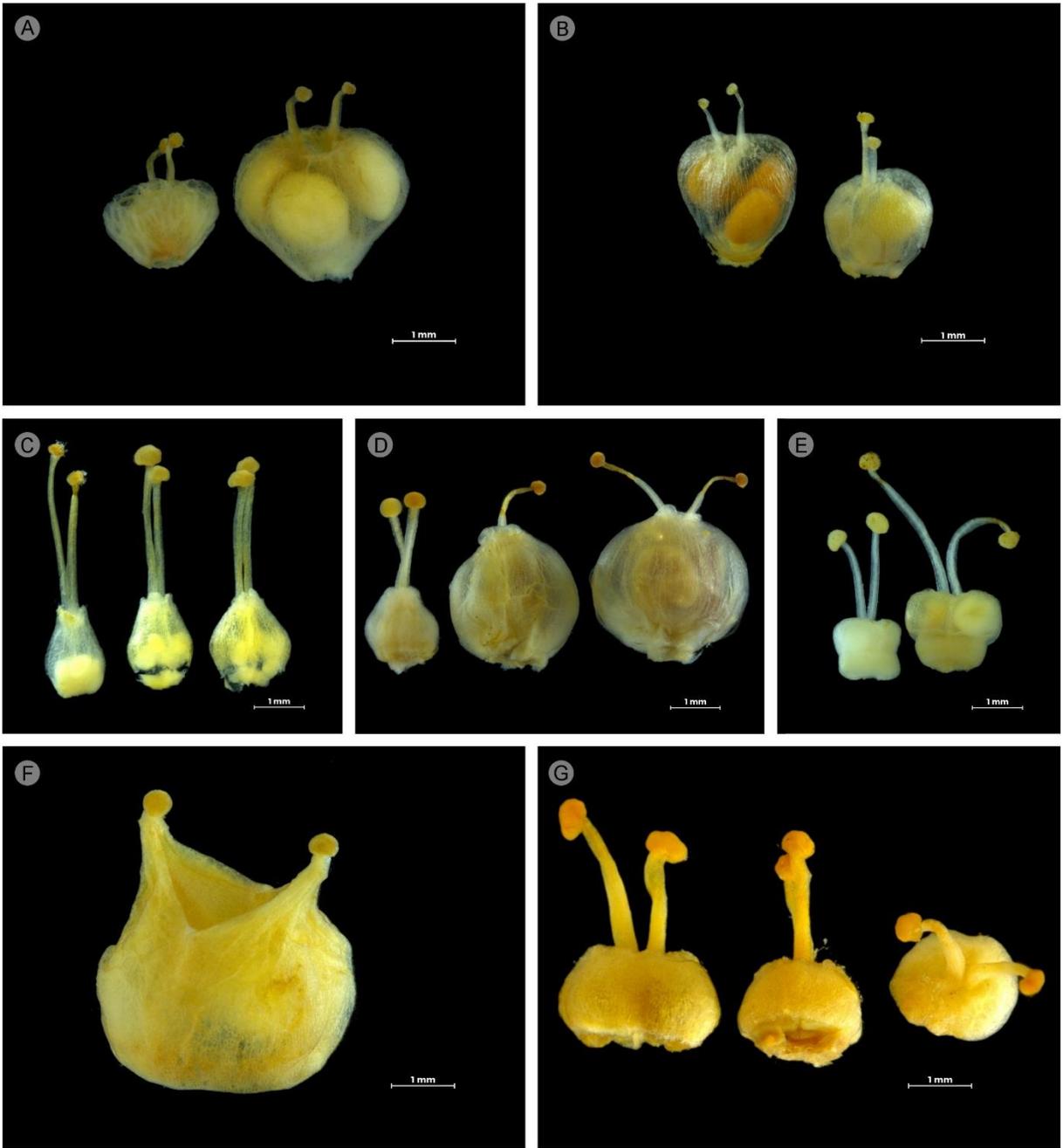
**Figura 9.** Morfología comparativa del corte del cáliz. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.



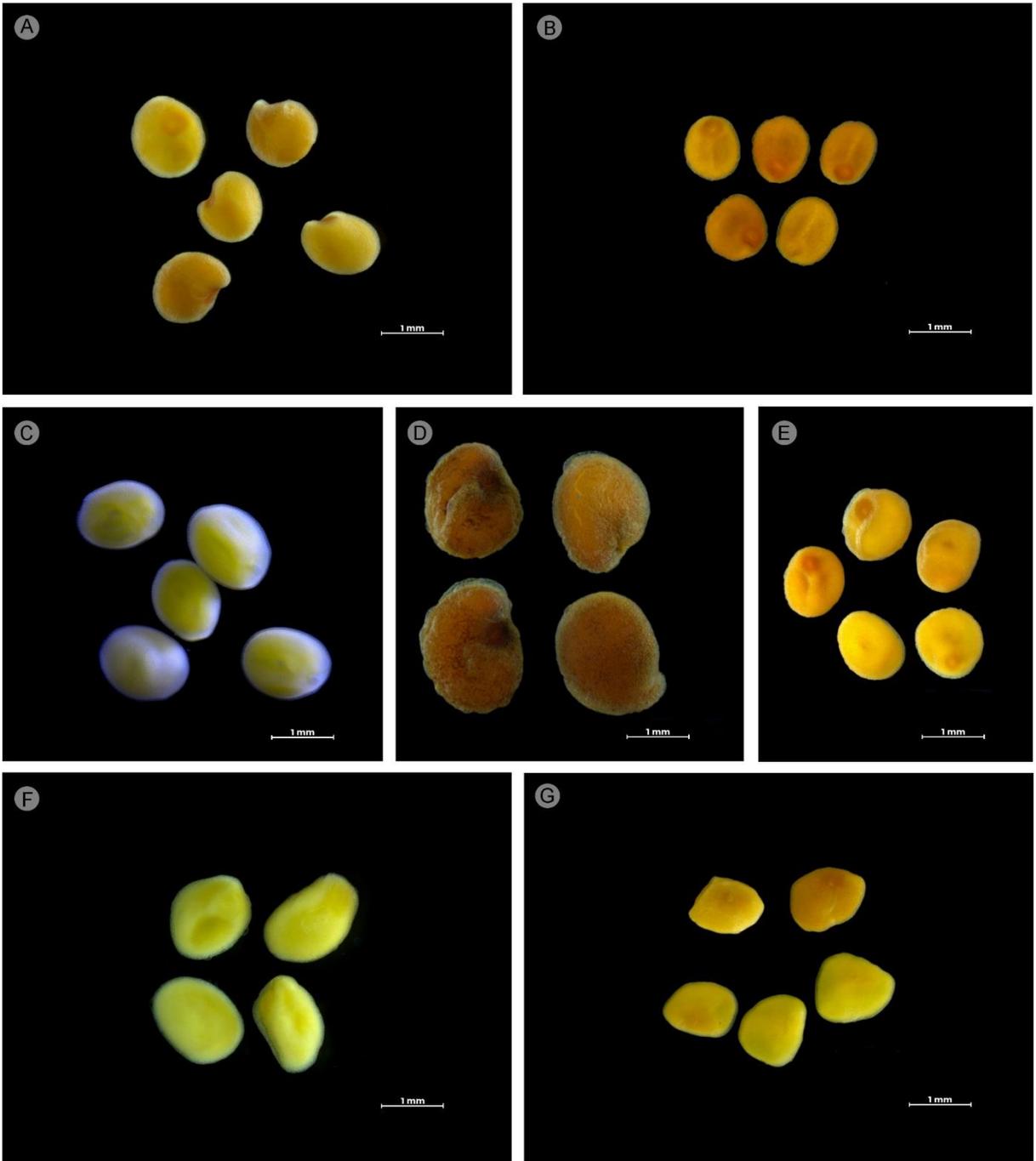
**Figura 10.** Morfología del corte de la corola de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.



**Figura 11.** Morfología de escamas infraestaminales de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.

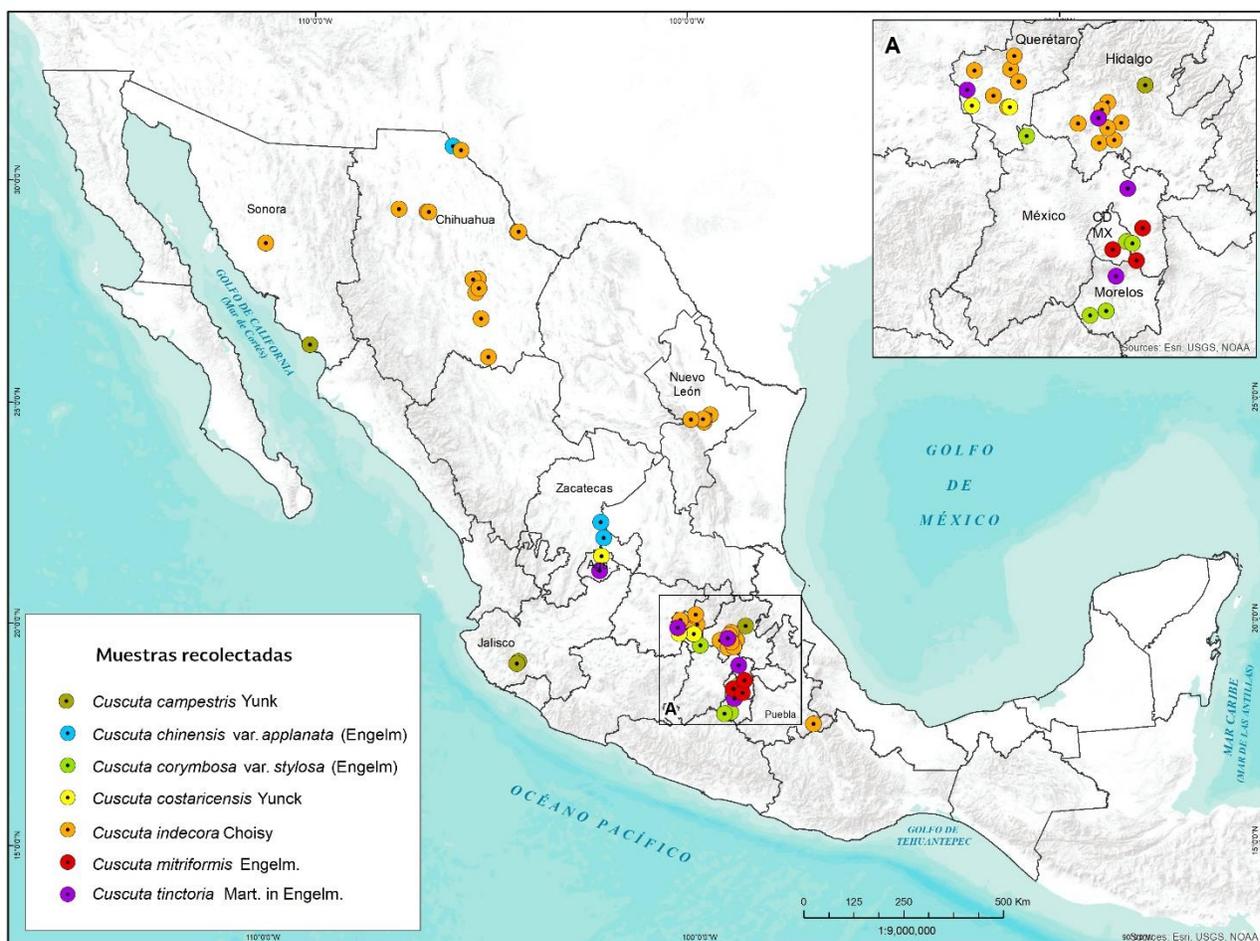


**Figura 12.** Morfología comparativa de cápsulas de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.



**Figura 13.** Morfología comparativa de semillas de *Cuscuta*. **A.** *C. campestris*. **B.** *C. chinensis* var. *applanata*. **C.** *C. corymbosa* var. *stylosa* **D.** *C. indecora*. **E.** *C. costaricensis*. **F.** *C. mitriformis* **G.** *C. tinctoria*.

La distribución de *C. campestris*, *C. chinensis* var. *applanata*, *C. corymbosa* var. *stylosa*, *C. indecora*, *C. costaricensis*, *C. mitriformis* y *C. tinctoria* en cultivos agrícolas y árboles forestales en los estados de Sonora, Chihuahua, Nuevo León, Zacatecas, Jalisco, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo, México, CDMX, Morelos y Puebla, se señala en Figura 14, en donde se realizó la recolecta de ejemplares en la Campaña Contra Malezas Reglamentadas de 2011 a 2018 y en los recorridos que se realizaron durante 2018 las especies recolectadas coinciden en su mayoría con la distribución indicada por Carranza (2008), Costea y Tardif (2006); Costea *et al.* (2006, 2011, 2011a, 2012, 2013).



**Figura 14.** Distribución geográfica de las especies de *Cuscuta* recolectadas en cultivos de importancia agrícola y árboles forestales en México.

De acuerdo a la información de los ejemplares recolectados, que se incluyen en este trabajo, se observó que *C. campestris* se encuentra en etapa de floración en abril, en el

cultivo de zanahoria, para la región de Metztitlan, Hidalgo; en Huatabampo, Sonora esta misma especie se recolectó en el cultivo de cártamo, en los meses de junio; los ejemplares recolectados en Autlán de Navarro, Jalisco en cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*), en el mes de mayo y octubre; la etapa de floración que se observó en las especies recolectadas, coincide con lo reportado en Carranza (2008) y Costea *et al.* (2012); no se encontraron reportes de *C. campestris*, parasitando los cultivos de zanahoria (*Daucus carota*) y cártamo (*Carthamus*), por lo que este sería el primer reporte de esta especie en el cultivo de cártamo en Sonora y en el cultivo de zanahoria para el estado de Hidalgo, México.

*C. chinensis* var. *applanata*, se recolectó en septiembre de 2012 y 2013, en etapa de floración en los municipios de Guadalupe y Ojo caliente, Zacatecas, en cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y chile (*Capsicum annum*), respectivamente. En Ciudad Juárez, Chihuahua, parasitando alfalfa en el mes de agosto; esta información, coincide con lo reportado por Costea *et al.* (2011), esta especie se encontró en los cultivos de frijol, chile y alfalfa, los cuales son de gran importancia para la alimentación en el país, así como para uso forrajero, por lo que se debe tener cuidado, ya que si no se controla puede causar grandes pérdidas en la producción.

La especie de *C. corymbosa* var. *stylosa* se encuentra en floración de julio a diciembre; se recolectaron ejemplares parasitando huauzontle, en Chalco, Estado de México y maíz en Tulyehualco, Xochimilco, en los meses de octubre y noviembre respectivamente, las fechas de floración y los estados corresponden a las indicadas por Carranza (2008); algunos ejemplares se recolectaron en el mes de febrero en bugambilia en Zacatepec y en pápalo (*Porophyllum*) en Amacuzac, Morelos, siendo el primer reporte de esta especie, tanto en fecha de floración, especies afectadas y el estado donde se encontró.

Los ejemplares de *C. costaricensis*, se encontraban en floración en los meses de septiembre y octubre, lo que empata con lo indicado por Costea *et al.* (2011a). Se recolectaron en San Juan del Río, Querétaro, en el cultivo de maíz (*Zea mays*); en Corregidora, Querétaro, en cultivo de alfalfa y en Rincón de Romos, Aguascalientes, en

árbol de membrillo (*Cydonia oblonga*), derivado de los reportes de Costea et al. 2011a y 2012 no incluyen la distribución de esta especie en los estados antes mencionados, se estaría generando un nuevo reporte de distribución y hospedantes para esta especie.

*Cuscuta indecora*, es una especie de amplia distribución en México, se recolectó en cultivo de alfalfa; la época de floración fue indistinta, quizás viéndose influida por el tipo de cultivo y tipo de riego que se tiene en los estados de Chihuahua, Nuevo León, Puebla, Querétaro, (Costea et al., 2006), Sonora e Hidalgo. Se encontró parasitando guaje (*Leucaena*), huizaches (*Vachellia*) y anacuas (*Ehretia*) en el estado de Nuevo León. Lo que indica que, si *Cuscuta* tiene las mejores condiciones de sobrevivencia, esta planta parásita se puede seguir desarrollando.

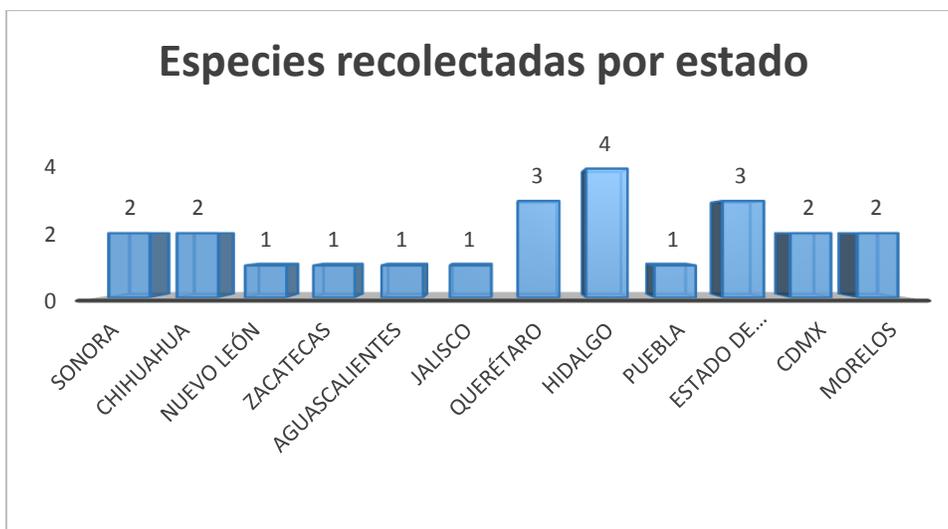
Los ejemplares de *C. mitriformis* que se recolectaron en el mes de noviembre en Juchitepec e Ixtapaluca, Estado de México, en los cultivos de veza (*Vicia*) y frijol (*Phaseolus*) concuerdan con lo reportado por Costea et al. (2013). Sin embargo, es el primer reporte de esta especie en Xochimilco, CDMX, en el cultivo de veza.

Finalmente, ejemplares de la especie de *C. tinctoria* se recolectaron en los meses de mayo, julio y septiembre, en Chicautla, Hidalgo; Tecámac, Estado de México; Querétaro, Querétaro; en árboles de pirúl (*Schinus*) y Tepoztlán, Morelos, en árboles forestales lo que coincide con la época de floración y la distribución que reportó Costea et al. (2013). Además, se realiza el primer reporte de esta especie en el estado de Aguascalientes, Aguascalientes en ficus (*Ficus*).

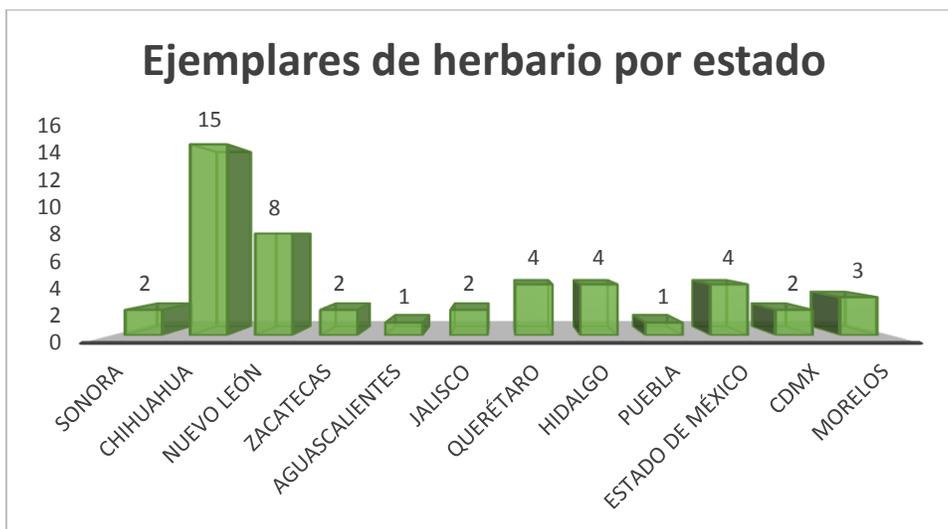
El estado que presenta un mayor número de especies parasitando cultivos es Hidalgo (Figura 13), con cuatro especies *C. campestris*, *C. corymbosa*, *C. indecora* y *C. tinctoria*, parasitando zanahoria, alfalfa y pirúl, los estados con menor número de especies recolectadas son Aguascalientes, Jalisco, Nuevo León, Puebla y Zacatecas.

De acuerdo a los 59 especímenes recolectados, la especie con el mayor número de ejemplares recolectados fue *C. indecora* (Figura 14). Así mismo, se pudo observar que

*C. indecora* se encuentra en seis estados de la república (Chihuahua, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Sonora), mostrando que esta especie puede tener una amplia distribución, principalmente en zonas donde se cultiva alfalfa; en el caso de *C. tinctoria* se presentó en los estados de Aguascalientes, Hidalgo, Estado de México, Morelos y Querétaro, principalmente en árboles.



**Figura 15.** Número de especies de *Cuscuta*, recolectadas por estado durante 2011 a 2018.



**Figura 16.** Número de ejemplares recolectados durante 2011 a 2018 de las siete especies de *Cuscuta*.

Las especies con menor presencia en los estados fueron *C. chinensis* var. *applanata*, *C. costaricensis* y *C. mitriformis*, en los estados de Zacatecas y Chihuahua, Querétaro y Aguascalientes, México y la CDMX, respectivamente, afectando diferentes cultivos.

### 1.5. Conclusiones

- Con las fotografías que se tomaron de la inflorescencia, flor, cáliz, corola, escamas infraestaminales, cápsula y semillas, se generó una guía ilustrada como apoyo para la identificación de las siete especies de *Cuscuta* con las que se trabajó en esta investigación.
- Así mismo, se elaboró un mapa de distribución geográfica con los datos obtenidos de los 59 ejemplares que se encuentran en el herbario del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA.
- Con esta investigación se contribuyó con los siguientes nuevos reportes: *C. campestris* en zanahoria en el estado de Hidalgo, así como cártamo en Sonora; *C. corymbosa* var. *stylosa* en bugambilia y pápalo en el estado de Morelos; *C. costaricensis*, en maíz, alfalfa y membrillo en los estados de Querétaro y Aguascalientes; *C. mitriformis* en el cultivo de ebo en la CDMX y el Estado de México y finalmente *C. tinctoria* en arboles de ficus en Aguascalientes.
- Dentro de las identificaciones realizadas mediante morfología se puede concluir que los ejemplares recolectados pertenecían a las especies de *C. indecora* y *C. tinctoria* y los ejemplares que se encontraban en el herbario a: *C. campestris*, *C. chinensis* var. *applanata*, *C. corymbosa* var. *stylosa*, *C. indecora*, *C. costaricensis*, *C. mitriformis* y *C. tinctoria*.
- Por tanto, las características que ayudaron a realizar la identificación de las especies fueron: cáliz, corola, escamas infraestaminales y la capsula, ya que de acuerdo a las medidas y formas es más fácil distinguir las diferencias existentes entre las especies.

### 2.6. Literatura citada

Alsaadi A., M. Saif., M. Yasser, S Gaur., H. El-wakil., L. Maloukh and T.V.R. Lakshmi. 2016. Identification of *Cuscuta campestris* Yunker in UAE: study of bar code loci-*rbcl*, *matk* and *trnH-psbA* in the UAE and Egyptian cultivars and in the respective host plants basil and jutte. International Journal of Research in Science 2 (2): 9-12

- Benítez de Rojas, C., A. Cardozo L., L. Hernández Ch., M. Lapp, H. Rodríguez, T. Ruiz Z. y P. Torrecilla. 2006. Botánica Sistemática. Fundamentos para su estudio. Cátedra de Botánica Sistemática. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Pp: 242.
- Braukmann T., M. Kuzmina, and S. Stefanović. 2012. Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss. *Journal of experimental botany* 64 (4): 977-989.
- Carranza E. 2008. Flora del bajío y de regions adyacentes. Convolvulaceae II. Fascículo 155. Instituto de Ecología A. C. pp: 16-46
- Chase M. W. and M. F. Fay. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science* 325: 682-683.
- Costea M. and F. J. Tardif. 2006. Biology of Canadian weeds. *Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. ex Schult, *C. umbrosa* Beyr. ex Hook, *C. epithymum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe. *Canadian Journal of Plant Sciences* 86: 293–316.
- Costea M., G.L. Nesom, and S. Stefanović. 2006. Taxonomy of *Cuscuta indecora* complex. *Sida* 22:176–195.
- Costea M. and S. Stefanović. 2010. Evolutionary history and taxonomy of the *Cuscuta umbellate* complex (Convolvulaceae): Evidence of extensive hybridization from discordant nuclear and plastid phylogenies. *Taxon* 59(6): 1783-1800.
- Costea M., I. Spence and S. Stefanović. 2011. Systematics of *Cuscuta chinensis* species complex (subgenus *Grammica*, Convolvulaceae): evidence for long-distance dispersal and one new species. *Organisms Diversity & Evolution* 11: 373-386.
- Costea M., I. Garcia R., and S. Stefanović. 2011a. Systematics Horned' dodders: phylogenetic relationships and two new species within *Cuscuta chapalana* complex (Convolvulaceae). *Botany* 89: 715–730.
- Costea M., R. Felfer S., D.Austin F., T. Van Devender R., and J. J. Sanchez-Escalante. 2012. Convolvulaceae of Sonora, México. II: *Cuscuta*. *Journal of the botanical research institute of Texas* 6(2): 529-550.
- Costea M., I. García R., K. Dockstader, and S. Stefanović. 2013. More problems despite bigger flowers: Systematics of *Cuscuta tinctoria* clade (subgenus *Grammica*, Convolvulaceae) with description of six new species. *Systematic Botany* 38(4): 1160-1187.
- Cullen J. 2006. Practical plant identification. Cambridge University. pp: 357.
- Departamento de Bótanica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Cuscuta* sp., ejemplar de: Herario Nacional de México (MEXU), plantas vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional autónoma de México.

Disponible en: <https://datosabiertos.unam.mx/biodiversidad/> fecha de actualización 27/03/2013. Fecha de consulta: 05 de noviembre de 2019.

ESRI. Environmental Systems Research Institute. 2012. ArcGIS, versión 10.1 Redlands, USA. <https://www.esri.com/es-es/arcgis/about-arcgis/overview>

García-Beltrán J., E. R. Bécquer y J. L. Gómez Hechavarría. 2017. Capítulo 6. Guía para la identificación de familias de plantas con semillas. En Mancina, G. C. A., Cruz F. Daryl, D. 2017. Diversidad biológica de Cuba. Métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas. Editora Agencia de medio Ambiente (AMA), pp: 512 978-959-300-130-4 (versión digital).

Gómez J.M. 1994. Importance of direct and indirect effects in the interaction between a parasitic angiosperm (*Cuscuta epithymum*) and its host plant (*Hormathophylla spinosa*). *Oikos* 71: 97-106.

Hadley A. 2006. CombineZM and CZBatch - Free image stacking software for depth of field correction, Disponible en: <http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/> Fecha de consulta: 18 de marzo de 2019.

Hebert P., A. Cywinska, S. Ball, and J. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Science* 270: 313-321.

Heide-Jorgensen H. S. 2008. Parasitic flowering plants. Koninklijke Brill NV: Leiden, Netherlands. Pp: 438.

Jarman S. N. and N. Elliot G. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspidae, "living fossils" from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 624-633.

Kuijt J. 1969. The biology of parasitic flowering plants. University of California Press, Berkeley, California, USA. Pp: 248.

Mcneal J. R. , K. Arumugunathan , J. V. Kuehl , J. L. Boore, and C. W. Depamphilis. 2007. Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC Biology* 5: 55.

NYBG. New York Botanical Garden Steere Herbarium. Virtual Herbarium. Disponible en: <http://sweetgum.nybg.org/science/vh/> Fecha de consulta: 05 de noviembre de 2019.

Palacio-López K., and N. Rodríguez-López. 2007. Phenotypic Plasticity in *Lippia alba* (Verbenaceae) in response to water availability in two light environments. *Acta Biológica Colombiana* 12: 187-198.

Paz A., M. González, y Crawford A. 2011. Código de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana* 16: 161-17

- Ratnasingham S. and P. D. Hebert, N. 2007. BoLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7(3): 355-364.
- Riviere S., C. Clayson, K. Dockstader, M. A. Wright, R. and M. Costea. 2013. To attract or to repel? Diversity, evolution and role of the “most peculiar organ” in the *Cuscuta flower* (dodder, Convolvulaceae) the infrastaminal scales. *Plant Systematics and Evolution*. pp: 24.
- Stefanović S., M. Kuzmina, and M. Costea. 2007. Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (Convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 94 (4): 568-589.
- Welsh M., S. Stefanović, and Costea M. 2010. Pollen evolution and its taxonomic significance in *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae). *Plant Systematics and Evolution* 285: 83-101.
- Wright M. A. R. and M. Welsh. 2011. Diversity and evolution of the gynoecium in *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae) in relation to their reproductive biology: two styles are better than one. *Plant Systematics and Evolution* 296: 51-76.
- Wright M. A. R., M. Ianni D. and M. Costea. 2012. Diversity and evolution of pollen-ovule production in *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae) in relation to floral morphology. *Plant Systematics and Evolution* 298: 369-389.
- Yuncker T. G. 1932. The genus *Cuscuta*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 18: 113–331.
- Yuncker, T. G. (1965). *Cuscuta*. *North American Flora*, ser. 2, 4:1– 51.

## CAPITULO II. PERFIL GENÉTICO DE LAS REGIONES ITS Y TRNL-F DE SIETE ESPECIES DE CUSCUTA DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y FORESTAL PARA MÉXICO

### 2.1. Introducción

El género *Cuscuta* esta conformado aproximadamente por 200 especies, principalmente en el continente americano. De acuerdo a lo reportado por Carranza, 2008, alrededor de 60 especies de *Cuscuta* se encuentran en México, entre ellas 14 especies se pueden encontrar en cultivos de importancia agrícola y forestal en México; *C. americana* L., *C. campestris* Yunck., *C. corymbosa* Ruiz y Pavon, *C. costaricensis* Yunck., *C. indecora* Choisy, *C. squamata* Engelm, *C. tinctoria* Mart. ex Engelm., *C. azteca* Costea y Stefanovic, *C. boldinghii* Urb., *C. chinensis* Lam. var. *applanata*, *C. jalapensis* Schldtl., *C. mitriformis* Engelm, *C. umbellata* Kunth y *C. epithymum* (L.) L. (Comunicación personal). Estas especies pueden encontrarse en un gran número de hospederos herbáceos o leñosos, algunas especies tienen predilección por algunos cultivos llegando a causar serios daños (Carranza, 2008). Además, se ha observado que algunas especies pueden ser reservorios naturales o vectores de otros patógenos, como la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Hartung *et al.*, 2010). La identificación de genero *Cuscuta* la inicio Truman George Yuncker en 1932 con la descripción de las partes florales, con lo que genero claves taxonómicas, posterior a él, otros investigadores con han contribuido con más elementos para la identificación, en donde la inclusión de marcadores moleculares indican que la clasificación taxonómica propuesta por Yuncker en 1932 tiene que reevaluarse ya que se muestran deficiencias en la clasificación, principalmente por que los caracteres morfológicos utilizados en la clasificación se han visto afectados por la evolución (Costea *et al.*, 2015). Las limitantes en la identificación taxonómica son la plasticidad fenotípica y variabilidad genética de las características que se utilizan para la identificación de las especies (Chase y Fay, 2009), existencia de taxones crípticos, la poca utilidad de las claves taxonómicas en las etapa fenológica de la planta y la falta de especialistas en cada uno de los grupos de interés (Paz *et al.*, 2011), pueden afectar la identificación de especies. Por lo que el uso de marcadores moleculares para la identificación de especies es cada vez más utilizado para este propósito, en este sentido

el Consorcio del Código de Barras para la vida (CBOL, 2009) propuso varias regiones del DNA de cloroplastos para el uso en plantas, como son *matK*, *rbcL*, *rpoB* y *rpoC1*, *atpF-atpH*, *trnH-PSBA* y *psbK-psbI*. Algunas de estas regiones se han utilizado en el género *Cuscuta*; entre ellas el espaciador interno del transcrito (ITS) de la región ribosomal nuclear del DNA (nrDNA), así como, el genoma del plastido (ptDNA) y la región *trnL-F* para conocer la historia evolutiva de *C. chinensis* y *C. tinctoria* (Costea *et al.*, 2011; Costea *et al.*, 2013). Así mismo, la región *trnL-F*, ITS, el gen *rbcL* y la subunidad mayor del ribosoma nuclear (26 rDNA) para conocer la relación de *C. jepsonii* con el género *Grammica*, (Costea y Stefanovic, 2009). Las regiones codificante *rbcL* y la región espaciadora no codificante *trnH-psbA* se utilizaron para diferenciar especies de *C. campestris* de diferentes nichos ecológicos de Egipto (Alsaadi, 2016).

En México es necesario identificar de forma rápida y precisa las especies, que se encuentran afectan los cultivos de importancia agrícola y forestal, y debido a las limitantes de la identificación morfológica que se han señalado para las especies de *Cuscuta* de importancia para México, el objetivo de la presente investigación fue obtener el perfil genético de siete especies de *Cuscuta* caracterizadas morfológicamente con base en los marcadores moleculares ITS y *trnL-F*.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Selección de muestras y marcadores moleculares.**

Se seleccionaron 21 ejemplares de siete especies de *Cuscuta* del herbario del CNRF identificados taxonómicamente (Cuadro 4), recolectados en cultivos de importancia agrícola y forestal, de diferentes estados de la República Mexicana, se seleccionaron los marcadores ITS y *trnL-F* para la identificación de las especies mexicanas con base en las investigaciones de Costea y Stefanovic (2010) y Costea *et al.*, (2011), quienes buscaron generar la relación filogenética entre especies del género *Cuscuta*.

**Cuadro 4.** Especies de *Cuscuta* seleccionadas para realizar su identificación molecular.

| <b>Especies</b>  | <b>Estados</b>   | <b>Municipio</b>  | <b>Cultivo</b>       | <b>Latitud</b> | <b>Longitud</b> |
|--|------------------|-------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| <b><i>C. campestris</i><br/>Yunck.</b>   | Jalisco          | Autlán de Navarro | Alfalfa              | 19.8166        | -104.2578       |
|  | Jalisco          | Autlán de Navarro | Alfalfa              | 19.76287       | -104.30277      |
|  | Hidalgo          | Metztitlan        | Zanahoria            | 20.60418       | -98.79147       |
| <b><i>C. chinensis</i> Lam.<br/>var. <i>applanata</i><br/>(Engelm.) Costea y<br/>Stefanov.</b> | Zacatecas        | Guadalupe         | Frijol               | 22.99282       | -102.29036      |
|  | Zacatecas        | Ojo caliente      | Chile                | 22.63279       | -102.22033      |
|  | Chihuahua        | Juárez            | Alfalfa              | 31.45411       | -106.19349      |
| <b><i>C. corymbosa</i> Ruiz<br/>y Pav. var. <i>stylosa</i><br/>Engelm.</b>                     | Distrito federal | Xochimilco        | Maíz criollo         | 19.253056      | -98.991806      |
|  | Morelos          | Zacatepec         | Bugambilia           | 18.65586       | -99.19257       |
|  | Estado de México | Chalco            | Huazontle            | 19.23616       | -98.93892       |
| <b><i>C. costaricensis</i><br/>Yunck</b>   | Querétaro        | San Juan del Río  | Maíz                 | 20.4368        | -100.04273      |
|  | Querétaro        | Corregidora       | Alfalfa              | 20.45179       | -100.39243      |
|  | Aguascalientes   | Rincón de Romos   | Membrillo            | 22.22177       | -102.27663      |
| <b><i>C. indecora</i> Choisy</b>   | Hidalgo          | San Salvador      | Alfalfa              | 20.2842        | -99.0203        |
|  | Nuevo León       | General Terán     | Guaje                | 25.41515       | -99.55708       |
|  | Sonora           | Hermosillo        | Alfalfa              | 29.076355      | 110.941672      |
| <b><i>C. mitriformis</i><br/>Engelm. ex Hemsl.</b>   | CDMX             | Xochimilco        | Ebo                  | 19.18443       | -99.12026       |
|  | Estado de México | Juchitepec        | Frijol               | 19.08668       | -98.90679       |
|  | Estado de México | Ixtapaluca        | Ebo                  | 19.36572       | -98.84572       |
| <b><i>C. tinctoria</i> Mart.<br/>ex Engelm</b>   | Querétaro        | Querétaro         | Pirú                 | 20.58849       | -100.43378      |
|  | Aguascalientes   | Aguascalientes    | árbol en zona urbana | 21.8866        | -102.3172       |
|  | Estado de México | Tecámac           | Pirú                 | 19.710248      | -98.974305      |

### 2.2.2. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó por el método de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Doyle y Doyle 1987) modificado, como a continuación se describe:

Se calentó la solución amortiguadora de extracción (CTAB) a 65 °C; se agregaron 70 mg de tejido vegetal (material herborizado), en las MP Biomedicals™ Matriz de lisis A, en tubos de 2 mL, se agregaron 500 µL de PBS 1X, se macero a 12,000 g durante 45 s en

el homogeneizador MagNA Lyser de la marca Roche®, después se agregaron 20 mg de PVP (Polyvinyl Pyrrolidone) y se mezcló por inversión.

1. Se agregó 1 mL de la solución amortiguadora CTAB y 20  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Se mezcló por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
2. Se incubaron los tubos en un baño maría a 65 °C, Durante 60 min en María BH-100 mrC Scientific instruments®. Posteriormente, se retiraron y se dejaron enfriar durante 5 a 10 min.
3. Se agregaron 500  $\mu$ L de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó 10 minutos y se centrifugó a 10,000 g, 10 minutos, para formar la fase acuosa (líquido superior claro de color amarillo) y la fase orgánica (líquido inferior oscuro de color verde), se recuperó la fase superior y se depositó en un tubo de 1.5 mL.
4. Se agregaron 500  $\mu$ L de cloroformo: octanol (24:1). Se agitaron los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
5. Se centrifugó a 10,000 g a temperatura ambiente durante 10 min para formar la fase acuosa (líquido superior claro de color amarillo) y la fase orgánica (líquido inferior oscuro de color verde).
6. Se recuperaron aproximadamente 750  $\mu$ L de la fase superior acuosa y se depositaron en un tubo nuevo, al que se le agregó un volumen igual a lo recuperado de isopropanol (2-propanol) al 100% frío. Se mezcló por inversión y se dejó en reposo durante 2 horas y media, en un refrigerador a -20 °C para favorecer la precipitación del DNA.
7. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 g a temperatura ambiente durante 30 min, para precipitar y formar la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Se desechó el isopropanol por decantación.
8. Se realizó un lavado con 500  $\mu$ L de alcohol al 75%, después se centrifugaron por 5 min a 10,000 g, se desechó el alcohol por decantación y se repitió el lavado.
9. Se usó el equipo miVac DNA Concentrator, Genevac® para secar la pastilla. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

Se determinó la calidad de los ADN con la relación de Absorbancias de ácidos nucleicos totales de las muestras, en el equipo de espectrofotometría NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific® CDMX., México), con un factor de ajuste de 50, correspondiente a DNA. Considerando que una muestra de DNA debe de tener una relación de absorbancia de A260/A280 de 1.8 – 2.0 y A260/A230 de 2.0–2.2 para considerarse óptima para seguir con el procedimiento de PCR.

La integridad del DNA de las muestras se realizó por electroforesis, para esto se elaboró un gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de metilo, en donde se colocaron 3 µL de cada una de las muestras y 5 µL de colorante, se corrió por 40 min a 90 volts en buffer TAE (Tris, acetato y EDTA) al 1X.

### **2.2.3 Amplificación de los marcadores ITS y TRNL-F**

La amplificación de los marcadores ITS y TRNL-F se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Todas las muestras se trabajaron a 80 ng/µL, por lo que las muestras con mayor concentración se diluyeron en agua grado biología molecular (Invitrogen®). Los fragmentos se amplificaron con los oligonucleótidos C y F, que amplifican la región trnL (el intrón trnL (UAA) y la región espaciadora intergénica entre el exón, trnL (UAA) 3' y trnF (GAA), (Taberlet *et al.* 1991) y para la región ITS (región espaciadora interna del transcrito) del DNA ribosomal nuclear que contiene al IST1, 5.8S e ITS2, se usaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990) (Cuadro 5).

La mezcla de la PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µL, en el Cuadro 6 se muestra la concentración y el volumen que se utilizó de cada uno de los reactivos con los dos pares de oligonucleótidos.

**Cuadro 5.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones trnL-F e ITS en *Cuscuta*.

| Marcador molecular | Secuencia de los oligonucleótidos | Autores                       |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| ITS                | ITS1 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'    | White <i>et al.</i> , 1990    |
|                    | ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'  |                               |
| trnL-F             | C 5'- CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'     | Taberlet <i>et al.</i> , 1991 |
|                    | F 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG 3'      |                               |

**Cuadro 6.** Mezcla de reacción para la PCR de las regiones trnL-F e ITS.

| Reactivos                       | Concentración final | Volumen (1X) |
|---------------------------------|---------------------|--------------|
| Buffer 10X                      | 1X                  | 2.5 µL       |
| MgCl <sub>2</sub>               | 1.5mM               | 0.75         |
| dNTP                            | 0.2mM               | 0.5          |
| Oligonucleótido 1               | 0.4µM               | 1.0          |
| Oligonucleótido 2               | 0.4µM               | 1.0          |
| Taq DNA Polymerasa recombinante | 1.25 U              | 0.25         |
| DNA                             | 6.4 ng              | 2.0 µL       |
| Agua grado biología molecular   | --                  | 17 µL        |
| <b>Volumen total</b>            |                     | <b>25 µL</b> |

El programa de termociclaje que se utilizó para los ITS consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 s, hibridación 58°C por 45 s, extensión de 72°C por 45 s y una extensión final de 72°C por 7 min. Para trnL-F la desnaturalización inicial fue 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, anillamiento 50°C por 30 s, extensión de 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 7 min en un T100™ Thermal Cycler de Bio-Rad®. Se realizó la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE al 1X con 5 µL de producto de PCR y 5 µL de buffer de carga a 90 volts durante 40 min, Las muestras se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Biorad® y en un equipo Qiaxcel Advancen System DNA (Qiagen®) el cartucho High Resolution (Qiagen®) en donde se utilizó 1µL para la visualización de fragmentos.

Cabe mencionar que con este equipo se puede conocer la concentración que tiene el fragmento amplificado en comparación con el marcador molecular mediante un electroferograma.

#### **2.2.4. Análisis de secuencias**

Los productos que se amplificaron se secuenciaron con la técnica de Sanger en ambos sentidos, para esto se utilizó el sistema Big Dye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, en el equipo 3130 de Applied Biosystem®, del CNRF de Tecámac.

Se realizó el ensamble pareado por muestra y la edición de secuencias con el programa ChromasPro (ChromasPro Version 2.1.8, Technelysium Pty. Ltd., Australia), las nuevas secuencias generadas en este trabajo se depositaron en el GenBank. Para la verificación de la identidad de las secuencias que se obtuvieron de las regiones ITS y trnL-F se realizó un alineamiento con BLASTn en la base de datos del Genbank NCBI, se registraron los resultados de las especies con los porcentajes de similitud más altos en el Cuadro 7.

#### **3.2.5. Análisis filogenético.**

El análisis filogenético se realizó de forma independiente para cada uno de los marcadores, y de concatenada con las siete especies de *Cuscuta* de este trabajo, más secuencias relacionadas presentes en el Banco de Genes GenBank del NCBI. De las cuales se seleccionaron las especies de *Cuscuta* con mayor cobertura e identidad, utilizando los algoritmos BLAST (Altschul *et al.*, 1990) con los parámetros: -e value igual a  $1e^{-10}$  y el porcentaje de identidad igual o mayor que 95% (Cuadro 7). Se seleccionaron 40 secuencias de NCBI las cuales se analizaron junto con las 42 que se obtuvieron de esta investigación, en total 41 secuencias para cada región ITS y trnL-F, el análisis se realizó en el programa Mega 7<sup>MR</sup> (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2016), primero se realizó el alineamiento con el algoritmo Muscle MR (Multiple Sequence Comparison) (Edgar, 2004), después, se buscó el modelo de sustitución de nucleótidos, seguido de esto se realizó la reconstrucción de la filogenia mediante el método de Máxima probabilidad (ML) con *bootstrap* de 1000 réplicas para el soporte de los nodos (Felsenstein, 1985) y el método de búsqueda de árboles heurístico nearest

neighbor interchange NNI. El análisis concatenado de la región ITS y trnL-F, se realizó para mejorar la resolución los grupos y para comprobar la robustez y confiabilidad de estas.

#### **2.2.6. Variabilidad dentro y entre especies de *Cuscuta*.**

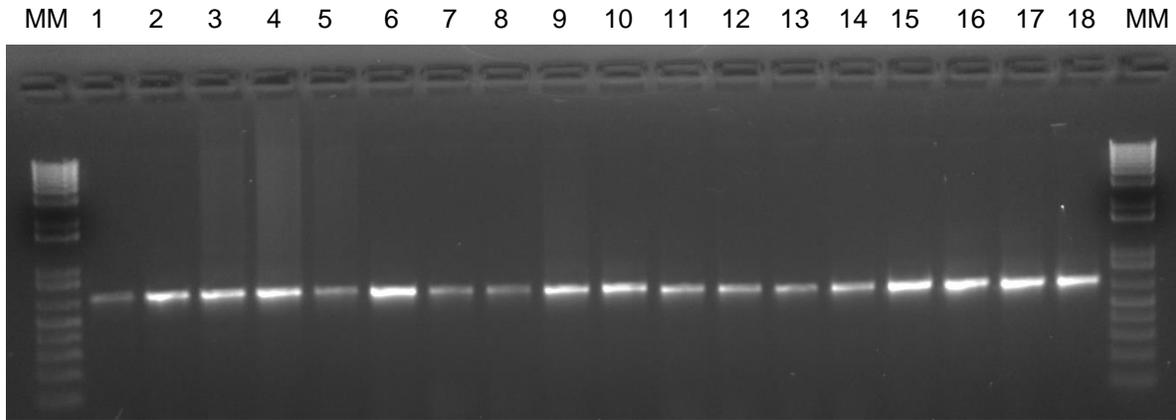
Además se realizó el análisis polimórfico que es el número de sitios nucleotídicos que difieren entre secuencias, para determinar los niveles de variabilidad dentro y entre especies con cada uno de los marcadores, se generó una tabla con: sitios conservados (sc), sitios variables (sv), sitios informativos en parsimonia (ip) y singletons (s) en MEGA7.

### **2.3. Resultados y discusión**

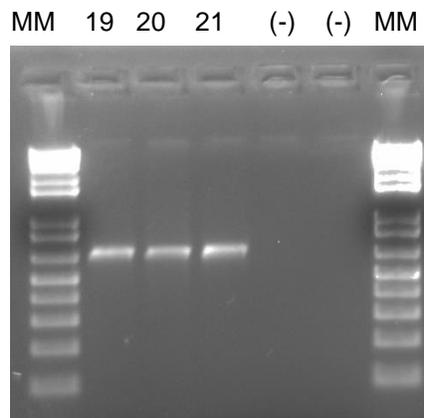
Los resultados de la cuantificación del DNA de los 21 ejemplares de *Cuscuta* seleccionados, demostraron ser de buena calidad por lo que se dio seguimiento a la amplificación de los fragmentos ITS y trnL-F.

#### **2.3.1. Amplificación de los marcadores ITS y TRNL-F**

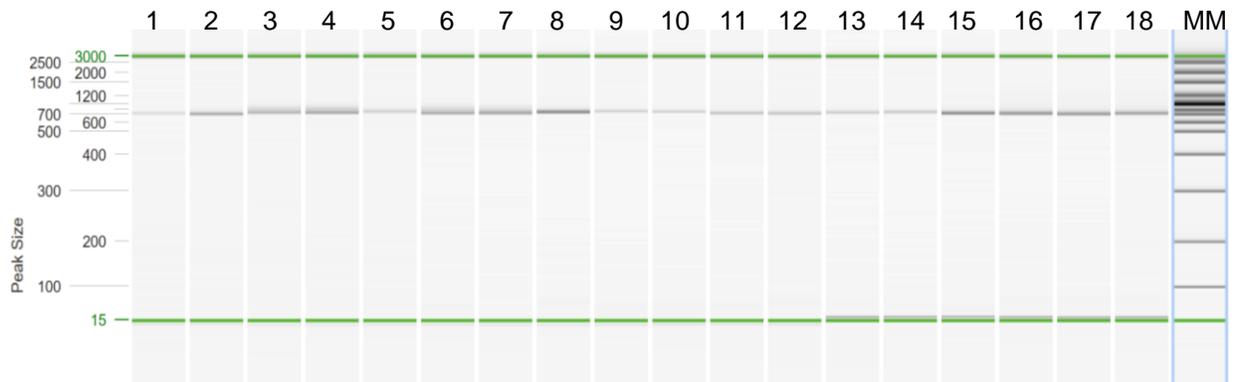
Los 21 ejemplares de las siete especies se amplificaron satisfactoriamente con los marcadores ITS y trnL-F. Sin embargo, la amplificación con ITS1/ITS4 fue menos eficiente que la de trnL-F se tuvo una variación de 60%, esto significó la repetición del proceso para 8 ejemplares, esta variación no se relacionó con la antigüedad de las muestras, ya que los ejemplares se habían recolectado desde 1, 3 o 5 años. Las razones de esta variación podrían estar relacionados con el deterioro y fraccionamiento que tuvo el DNA de estos ejemplares de herbario. En la amplificación de las 21 muestras con el marcador molecular ITS, se observa que el tamaño de esta región es de aproximadamente 700 pb (figuras 17 y 18), resultados similares se observan en el gel virtual del Qiaxcel (Figura 19 y 20). Ambos gels muestran bandas intensa y sin dímeros.



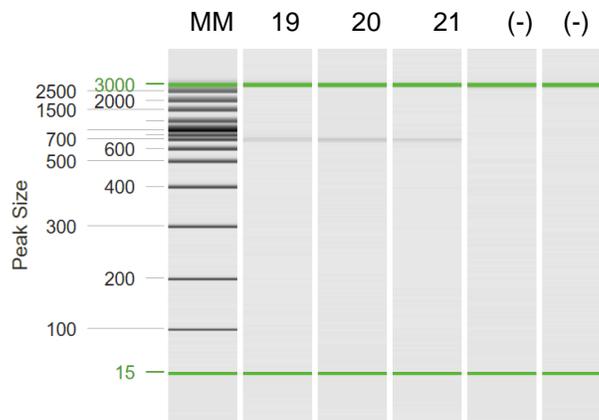
**Figura 17.** Productos de PCR del marcador molecular ITS. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. Carril 1 y 20, Marcador molecular 1 kb Invitrogen ®. 1-3, *C. campestris*, 4-6 *C. chinensis* var. *applanata*, 7-9 *C. corymbosa* var. *stylosa*, 10-12 *C. costaricensis*, 13-15 *C. indecora*, 16-18, *C. mitriformis*. Tamaño aproximado 700 pb.



**Figura 18.** Productos de PCR del marcador molecular ITS. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. Carril 1 y 7. Marcador molecular 1 kb Invitrogen ®. 19-21, *C. tinctoria*. Carril 5 y 6, control negativo. Tamaño aproximado 700 pb.

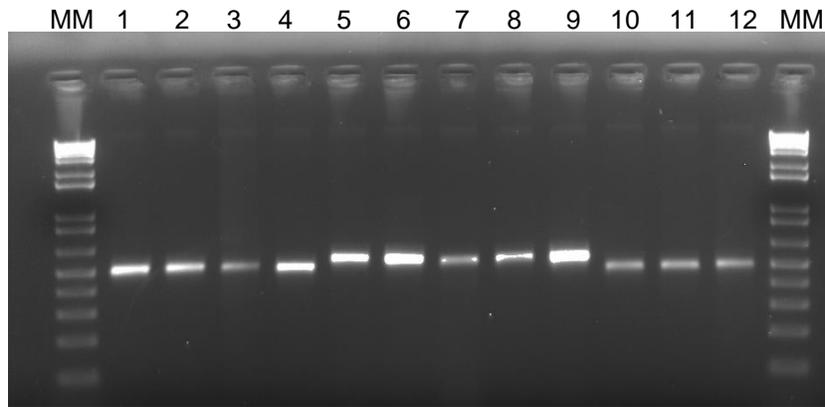


**Figura 19.** Productos de PCR del marcador molecular ITS. Cartucho High Resolution. Qiaxcel Advancen System DNA. MM. Carril 19, Marcador molecular100 – 2.5 kb Qiagen®, 1-3, *C. campestris*, 4-6 *C. chinensis* var. *applanata*, 7-9 *C. corymbosa* var. *stylosa*, 10-12 *C. costaricensis*, 13-15 *C. indecora*, 16-18 *C. mitriformis*. Tamaño aproximado de 700 pb.

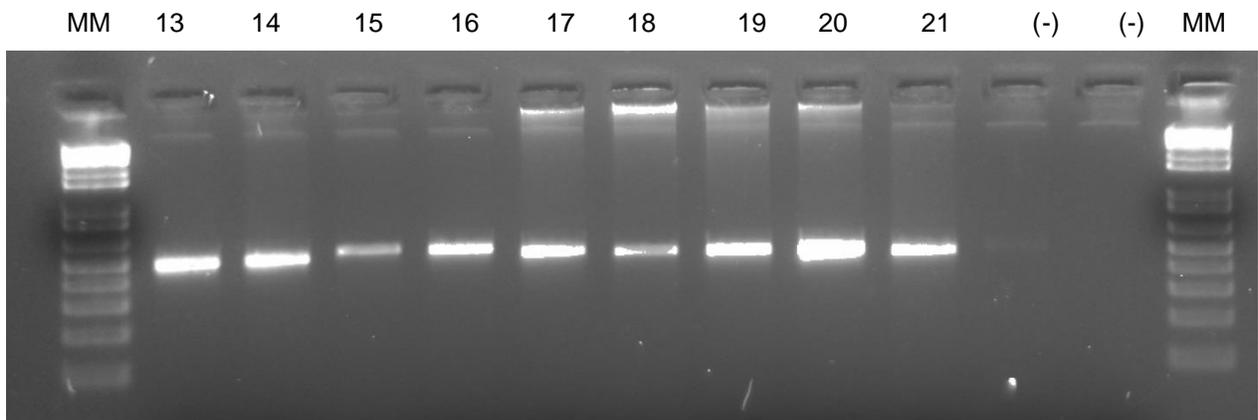


**Figura 20.** Producto de PCR del marcador molecular ITS. Cartucho High Resolution. Qiaxcel Advancen System DNA. MM. Carril 24 Marcador molecular100 – 2.5 kb Qiagen®, 19-21 *C. tinctoria*. Tamaño aproximado de 700 pb. Carril 5 y 6 control negativo.

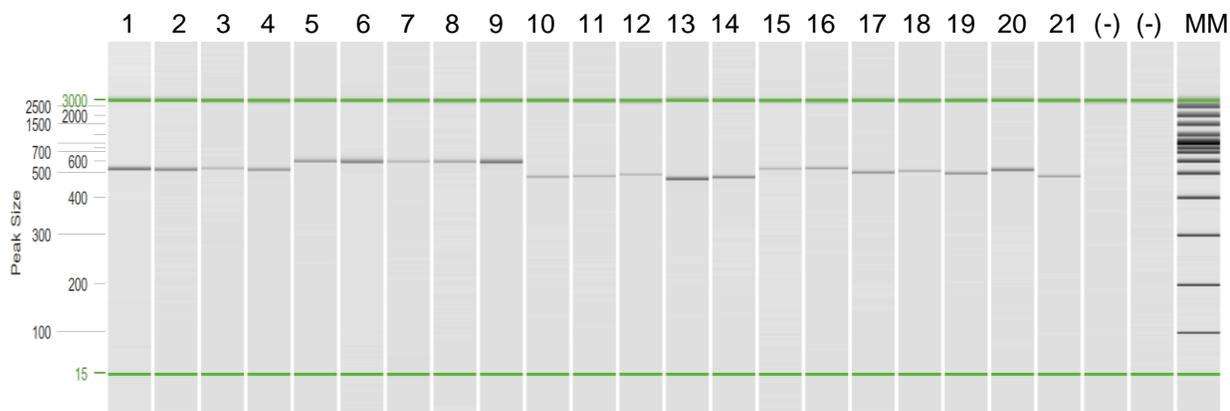
La amplificación de la región trnL-F se realizó sin complicaciones en 100% de las muestras, en la Figura 21 y 22 se muestra el gel de agarosa y del gel virtual del equipo Qiaxcel en la Figura 23, en el primero se observan fragmentos de aproximadamente 500 pb, mientras que en este último (Figura 24), se observó diferencias en el tamaño de que los fragmentos amplificados en un rango de 500-600 pb.



**Figura 21.** Productos de PCR del marcador molecular trnL-F. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. Carril 1 y 17. Marcador molecular 1 kb Invitrogen®. 1-3, *C. campestris*, 4-6 *C. chinensis* var. *applanata*, 7-9 *C. corymbosa* var. *stylosa*, 10-12 *C. costaricensis*. Tamaño aproximado de 500 pb.



**Figura 22.** Productos de PCR del marcador molecular trnL-F. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. Carril 1 y 12, Marcador molecular 1 kb Invitrogen®. 13-15 *C. indecora*, 16-18 *C. mitriformis*, 19-21 *C. tinctoria*. Tamaño aproximado de 500 pb. Carril 11 y 12 control negativo.



**Figura 23.** Productos de PCR del marcador molecular trnL-F. Cartucho High Resolution. Qiaxcel Advancen System DNA. MM. Carril 24 Marcador molecular 100 – 2.5 kb Qiagen®, 1-3, *C. campestris*, 4-6 *C. chinensis* var. *applanata*, 7-9 *C. corymbosa* var. *stylosa*, 10-12 *C. costaricensis*, 13-15 *C. indecora*, 16-18 *C. mitriformis*, 19-21 *C. tinctoria*. Tamaño aproximado de 500 pb. Carril 22 y 23 control negativo.

### 2.3.2. Resultados de identidad y valor de expectancia.

Del alineamiento de las secuencias de *Cuscuta* con la base de datos de NCBI Blastn se obtuvo el porcentaje de identidad y el valor de expectancia de cada especie (Cuadro 7), dichos valores se ocuparon para revisar que las secuencias fueran acordes a las especies con las que se trabajó y con las que se realizaría el análisis filogenético.

**Cuadro 7.** Lista de secuencias de las regiones ITS y TrnL-F de *Cuscuta*, que presentaron mayor porcentaje de identidad en la bases de datos de nucleótido de NCBI con las que se obtuvieron en este trabajo.

| Especie              | No. de identificación | -e value | ITS                     |                  |           | TrnL-F                  |                  |
|----------------------|-----------------------|----------|-------------------------|------------------|-----------|-------------------------|------------------|
|                      |                       |          | Porcentaje de identidad | No. de accesoión | -e value  | Porcentaje de identidad | No. de accesoión |
| <b>C. campestris</b> | 487                   | 0        | 100                     | KY968857.1       | 1.00E-159 | 100                     | KT312997.1       |
|                      | 1260                  | 0        | 100                     | KT383092.1       | 0         | 100                     | KX168392.1       |
|                      | 1261                  | 0        | 100                     | KT383099.1       | 0         | 100                     | KX168392.1       |
|                      | 1262                  | 0        | 100                     | KT383105.1       | 0         | 100                     | KX168392.1       |
|                      | 1264                  | 0        | 100                     | KT383117.1       | 0         | 100                     | KX168392.1       |
|                      | 43155*                | 0        | 100                     | KY968857.1       | 0         | 100                     | KX168392.1       |

|                         |                     |     |       |            |            |           |             |            |
|-------------------------|---------------------|-----|-------|------------|------------|-----------|-------------|------------|
|                         | 6328*               | 0   | 99.78 | KU761506.1 | 0          | 100       | KX168392.1  |            |
|                         | 50963*              | 0   | 100   | KY968857.1 | 0          | 100       | KX168392.1  |            |
| <b>C.chinensis</b>      | 837                 | 0   | 100   | JN234828.1 | 6.00E-163  | 100       | EF194368.1  |            |
|                         | 1211                | 0   | 100   | JN234828.1 | 0          | 100       | JN234824.1  |            |
|                         | 850                 | 0   | 100   | JN234830.1 | 0          | 100       | JN234822.1  |            |
|                         | 844                 | 0   | 100   | EF194605.1 | 0          | 100       | JN234821.1  |            |
|                         | 508                 | 0   | 100   | JN234830.1 | 6.00E-163  | 100       | EF194371.1  |            |
|                         | 46462*              | 0   | 100   | EF194605.1 | 0          | 98.5      | JN234824.1  |            |
|                         | 38462*              | 0   | 100   | JN234830.1 | 0          | 100       | JN234824.1  |            |
|                         | 38953*              | 0   | 100   | JN234830.1 | 0          | 100       | JN234824.1  |            |
|                         | <b>C. corymbosa</b> | 695 | 0     | 100        | EF194584.1 | 1.00E-160 | 100         | EF194343.1 |
|                         |                     | 694 | 0     | 100        | EF194587.1 | 2.00E-162 | 100         | EF194347.1 |
| 544*                    |                     | 0   | 100   | EF194587.1 | 8.00E-133  | 99.26     | EF194347.1  |            |
| 11093*                  |                     | 0   | 99.82 | EF194587.1 | 8.00E-133  | 99.26     | EF194347.1  |            |
| 43314*                  |                     | 0   | 99.82 | EF194587.1 | 4.00E-136  | 99.82     | EF194347.1  |            |
| <b>C. costaricensis</b> | 858                 | 0   | 100   | EF194580.1 | 2.00E-152  | 100       | EF194340.1  |            |
|                         | 40138*              | 0   | 100   | EF194580.1 | 0          | 99.74     | NC_042956.1 |            |
|                         | 56640*              | 0   | 100   | EF194580.1 | 0          | 99.74     | NC_042956.1 |            |
|                         | 38456*              | 0   | 100   | EF194580.1 | 0          | 99.74     | NC_042956.1 |            |
| <b>C. indecora</b>      | 895                 | 0   | 100   | EF194545.1 | 3.00E-136  | 100       | EF194294.1  |            |
|                         | 595                 | 0   | 100   | EF194545.1 | 3.00E-136  | 100       | EF194294.1  |            |
|                         | 723                 | 0   | 100   | EF194545.1 | 3.00E-146  | 100       | EF194298.1  |            |
|                         | 721                 | 0   | 100   | EF194545.1 | 3.00E-141  | 100       | EF194295.1  |            |
|                         | 14895*              | 0   | 100   | EF194545.1 | 1.00E-144  | 96.3      | AF348404.1  |            |
|                         | 45028*              | 0   | 99.74 | EF194545.1 | 0          | 100       | AF348404.1  |            |
|                         | 00001*              | 0   | 99.74 | EF194545.1 | 9.00E-162  | 99.07     | AF348404.1  |            |
| <b>C. mitriformis</b>   | 556                 | 0   | 100   | KC485387.1 | 8.00E-162  | 100       | EF194381.1  |            |
|                         | 815                 | 0   | 100   | KC485387.1 | 0          | 100       | KC485360.1  |            |
|                         | 29886*              | 0   | 99.5  | KC485387.1 | 0          | 97.14     | KC485355.1  |            |
|                         | 88555*              | 0   | 99.5  | KC485387.1 | 0          | 97.14     | KC485355.1  |            |
|                         | 55210*              | 0   | 99.5  | KC485387.1 | 0          | 97.14     | KC485355.1  |            |
| <b>C. tinctoria</b>     | 766                 | 0   | 100   | KC485398.1 | 1.00E-150  | 100       | EF194394.1  |            |

|       |   |       |            |           |       |            |
|-------|---|-------|------------|-----------|-------|------------|
| 5040* | 0 | 100   | KC485400.1 | 0         | 100   | KC485365.1 |
| 138*  | 0 | 99.75 | KC485400.1 | 4.00E-165 | 96.67 | KC485365.1 |
| 1*    | 0 | 100   | KC485398.1 | 0         | 100   | KC485365.1 |

\*Secuencias obtenidas en este trabajo

Al realizar el alineamiento en el Blastn de las secuencias de *Cuscuta chinensis* con número de identificación 844 de la base de datos del GenBank y 46462 del ejemplar de herbario que se obtuvieron con el marcador molecular ITS, así como, la secuencia 508 de la base de datos del GenBank del marcador molecular trnL-F, los resultados fueron *C. applanata*, debido a que Costea *et al.* (2011), informó que basados en que son morfológica y molecularmente similares *C. applanata* formaría parte de una variedad de *C. chinensis*, denominándola como *C. chinensis* var. *applanata*

Las secuencias con número de acesion 14895, 45028 y 00001 obtenidas de los ejemplares de herbario de *C. indecora* con el marcador trnL-F, se registraron en este trabajo como *C. indecora* var. *attenuata*, aunque en el Blastn que se realizó aparecen como *C. attenuata*, de acuerdo a Costea *et al.* (2006), esta especie se redujo a una variedad de *C. indecora*

Las secuencias de *C. mitriformis* con número de accesión 9886, 88555 y 55210 obtenidas de los ejemplares de herbario mostraron 97.14% de identidad para la especie de *C. cotijana* (especie que no se estaba analizando en este trabajo), con el marcador molecular trnL-F, pero fue descartada ya que *C. cotijana* debe de presentar proyecciones en forma de espolón en los lóbulos del cáliz, lo cual no fue observado en los especímenes analizados (Fig. 7 y 8). *C. cotijana* solo se ha reportado en el estado de Michoacán (Costea *et al.*, 2008; Costea *et al.*, 2013)

### 2.3.3. Sitios polimórficos

El análisis de polimorfismo de las dos regiones señala que tanto ITS como trnL-F tienen altos niveles de polimorfismo, tanto dentro como entre especies; en el Cuadro 8, se resumen estas características, el tamaño de los fragmentos, los sitios constantes (sc),

variables (sv), informativos para parsimonia (ip) y singletones (s) para cada región dentro y entre secuencias. En este cuadro se observa que la región ITS es mas variable que la región trnL-F, con 301 y 194 sv, 256 y 178 pi respectivamente. La especie que presentan mayor variación dentro de las especies es en la región ITS; *C. campestris* seguida de *C. tinctoria*, la primera con 44/700 sv de los cuales 40 son s y 4 ip, y la segunda con 17 sv, 7 s, los cuales no son informativos en un análisis filogenéticos, situación que contrasta con la región trnL-F de la misma especie, en donde se presenta 1 sv que es 1s y la segunda 5 sv que fueron s. En la región de trnL-F *C. chinensis* es la que presento mayor variación dentro de la especie con 18/500 sv, 3 ip y 15s, seguida de *C. mitriformis* con 14 sv, 14 s, la especie que no tuvo ningún sitio variable en los 4 especímenes trabajados fue *C. costaricensis*. El análisis de estos sitios nos indica que son suficientes para realizar la reconstrucción de la filogenética de estas dos regiones.

**Cuadro 8.** Polimorfismos dentro y entre cada especie de las regiones ITS y trnL-F sc=sitios conservados, sv =sitios variables, ip=informativos para parsimonia, s=polimorfismos únicos.

| Especie                                 | ITS 700pb         |     |     |     |    | trnL 500 pb |     |     |    |
|---|-------------------|-----|-----|-----|----|-------------|-----|-----|----|
|   | No. De secuencias | sc  | sv  | ip  | s  | sc          | sv  | ip  | s  |
| <i>C. campestris</i> Yunck.             | 8                 | 618 | 44  | 4   | 40 | 486         | 1   | 0   | 1  |
| <i>C. chinensis</i> Lam.                | 8                 | 634 | 10  | 1   | 8  | 479         | 18  | 3   | 15 |
| <i>C. corymbosa</i> Ruiz y Pav.         | 5                 | 584 | 10  | 0   | 9  | 480         | 13  | 1   | 12 |
| <i>C. costaricensis</i> Yunck.          | 4                 | 578 | 2   | 0   | 2  | 518         | 0   | 0   | 0  |
| <i>C. indecora</i> Choisy               | 7                 | 572 | 4   | 0   | 4  | 487         | 4   | 3   | 1  |
| <i>C. mitriformis</i> Engelm. ex Hemsl. | 5                 | 615 | 5   | 2   | 3  | 505         | 14  | 0   | 14 |
| <i>C. tinctoria</i> Mart. ex Engelm.    | 4                 | 568 | 17  | 0   | 7  | 467         | 5   | 0   | 5  |
| <b>Total</b>                            | 41                | 381 | 301 | 256 | 45 | 393         | 194 | 178 | 16 |

### 2.3.4. Análisis filogenético

La reconstrucción de la filogenia para cada una de las regiones se realizó con 41 secuencias de género *Cuscuta*, en cada caso se integro una secuencia mas de *Merremia peltata* (KP261989.1) como grupo de comparación para ITS y *Merremia peltata* (KP236677.1) para trnL-F. Los modelos de sustitución para ITS fue Tamura Nei y para trnL-F el modelo 3 parámetros de Tamura, con estos modelos se reconstruyo la filogenia

con base en ML, búsqueda de arboles heurística con NNI y eliminación parcial de sitios con espacios y 1000 repeticiones de Bootstrap. Las secuencias obtenidas en este trabajo y que se subieron al NCBI se encuentran en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Números de accesoión de las secuencias depositadas en el GenBank del NCBI.

| Especies  | No. de identificación | No. de accesoión Región ITS | No. de accesoión Región trnL-F |
|---|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <i>C. campestris</i> Yunck.   | 43155                 | MN493041                    | MN530952                       |
|   | 6328                  | MN493042                    | MN530953                       |
|   | 50963                 | MN493043                    | MN530954                       |
| <i>C. chinensis</i> Lam. var. <i>applanata</i> (Engelm.) Costea y Stefanov. | 46462                 | MN493159                    | MN530949                       |
|   | 38462                 | MN493160                    | MN530950                       |
|   | 38953                 | MN493161                    | MN530951                       |
| <i>C. corymbosa</i> Ruiz y Pav. var. <i>stylosa</i> Engelm.                 | 544                   | MN514245                    | MN530946                       |
|   | 11093                 | MN514246                    | MN530947                       |
|   | 43314                 | MN514247                    | MN530948                       |
| <i>C. costaricensis</i> Yunck   | 40138                 | MN493156                    | MN530943                       |
|   | 56640                 | MN493157                    | MN530944                       |
|   | 38456                 | MN493158                    | MN530945                       |
| <i>C. indecora</i> Choisy   | 14895                 | MN495982                    | MN530940                       |
|   | 45028                 | MN495983                    | MN530941                       |
|   | 00001                 | MN495984                    | MN530942                       |
| <i>C. mitriformis</i> Engelm. ex Hemsl.                                     | 9886                  | MN493150                    | MN530937                       |
|   | 88555                 | MN493151                    | MN530938                       |
|   | 55210                 | MN493152                    | MN530939                       |
| <i>C. tinctoria</i> Mart. ex Engelm   | 50040                 | MN493153                    | MN519216                       |
|   | 138                   | MN493154                    | MN519217                       |
|   | 1                     | MN493155                    | MN519218                       |

Los resultados de ambas regiones, forman siete cluters o grupos que corresponden a las especies analizadas, por lo que el uso de estos marcadores se puede utilizar para la diferenciación de las especies, independientemente si estas presentan variación interespecifica, aunque el soporte de las ramas es mejor para, ITS (Figura 24), que para trnL-F. En ITS el soporte de las ramas para *C. chinensis* es de 99%, *C. indecora* 100%, *C. tinctoria* 99%, *C. mitriformis* 85%, 98% en *C. campestris*, 99% con *C. costaricensis*, 98% con *C. corymbosa* var. *stylosa*; para esta última especie podemos decir que los ejemplares que se trabajaron morfológicamente y molecularmente presentan mayor

similitud con esta variedad, que con *C. corymbosa* var. *grandiflora*, ya que las flores observadas midieron aproximadamente 3.4 mm y las flores de *C. corymbosa* var. *grandiflora* miden 4.0 mm, el cáliz observado fue más corto que la mitad del tubo de la corola, así como las escamas llegan a la mitad de la corola, características destacadas para la diferenciación entre estas dos variedades. El soporte de las ramas para *C. indecora* fue de 100%, en este árbol se observa que los ejemplares están relacionados con las especies *C. indecora* var. *attenuata* y *C. indecora* var. *neuropetala*, por lo que para determinar a qué variedad pertenecen se podría trabajar con otros marcadores moleculares en plantas como son *matk*, *rbcl*, *26S*.

La reconstrucción de la filogenia de la región *trnL-F* muestra un soporte de ramas de 100 % en *C. indecora*, 98% en *C. tinctoria*, 98% en *C. campestris*, 97 % en *C. costaricensis*, 86% en *C. chinensis*, 86 % en *C. corymbosa* var. *stylosa* y 60% en *C. mitriformis* (Figura 25), el soporte de estas ramas mayores a 75 % de bootstrap señala que estas corresponden a un grupo verdadero (Hillis and Bull 1993) por lo que en el caso de *C. mitriformis* se tiene que tomar con reserva hasta que se tenga mayor información del gen en esta especie.

Se realizó un análisis concatenado de la región ITS y *trnL-F*, lo cual beneficia la mayor resolución en los datos proporcionados, así como un mayor soporte en las ramas de cada una de las especies para comprobar la robustez y fiabilidad de estas (Figura 26). Se puede observar que la especie de *C. mitriformis* muestra un soporte de la rama de 99%, mucho mayor que el que se presentaba en el árbol filogenético de *trnL-F*. Así mismo, las especies de *C. indecora* y *C. campestris* mantuvieron un soporte de 100% y 98%, mucho mayor en comparación con el árbol *trnL-F*.

En ambos árboles elaborados con las siete especies de *Cuscuta* se observó que cinco especies se agruparon en cinco grupos que constituían clados homogéneos, dentro de cada especie se observó la variación intraespecífica. En el clado número seis se observó que *C. mitriformis* y *C. tinctoria* se encuentran en el mismo clado, pero en ramas diferentes, esto corresponde con lo observado por Stefanovic *et al.* (2007), García y

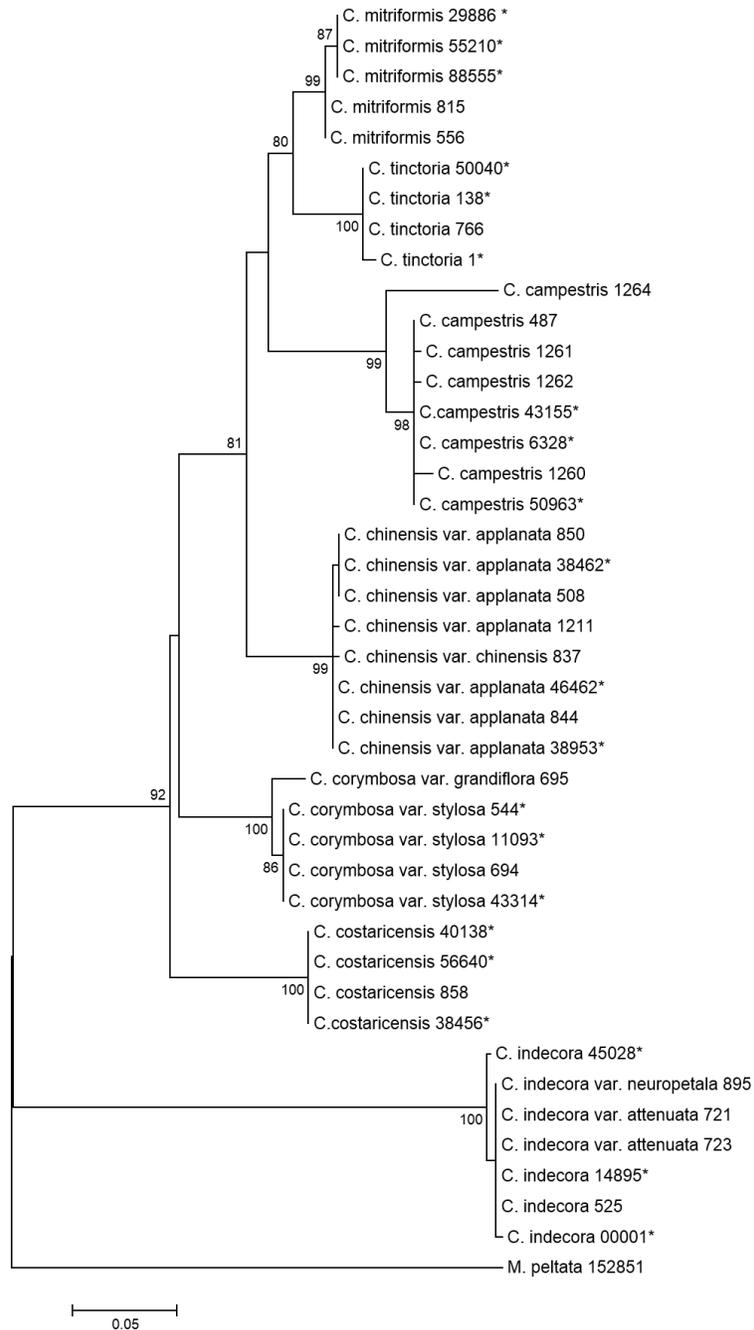
Martín (2007), Welsh *et al.* (2010) y García *et al.* (2014), quienes señalaron en sus respectivos árboles filogenéticos elaborados con los marcadores moleculares ITS y trnL-F, que estas dos especies pertenecen a un mismo clado, al clado G. Por lo que es de esperarse que nosotros encontráramos los mismos resultados. Cabe destacar que estos mismos autores señalaron que las especies con las que se trabajó en este estudio pertenecen al subgénero *Grammica*, e indicaron el nombre del clado al que pertenece cada una de estas especies. *C. campestris*, al clado B, *C. chinensis* al clado H, *C. corymbosa* al clado J, *C. costaricensis* al clado K y *C. indecora* al clado M. Aunque las características morfológicas de *C. mitriformis* y *C. tinctoria* no son similares, presentaron flores grandes y gruesas solamente, en el análisis filogenético se muestra una relación similar.

Para el caso de *C. campestris*, es una especie que tiene un soporte de 93% en el árbol ITS y 84% en trnL-F, pertenece al clado B, esta especie tiene una distribución mundial (Stefanovic *et al.*, 2007), sin embargo en México solo se ha encontrado en 4 estados cuales son, en el norte y centro de México.

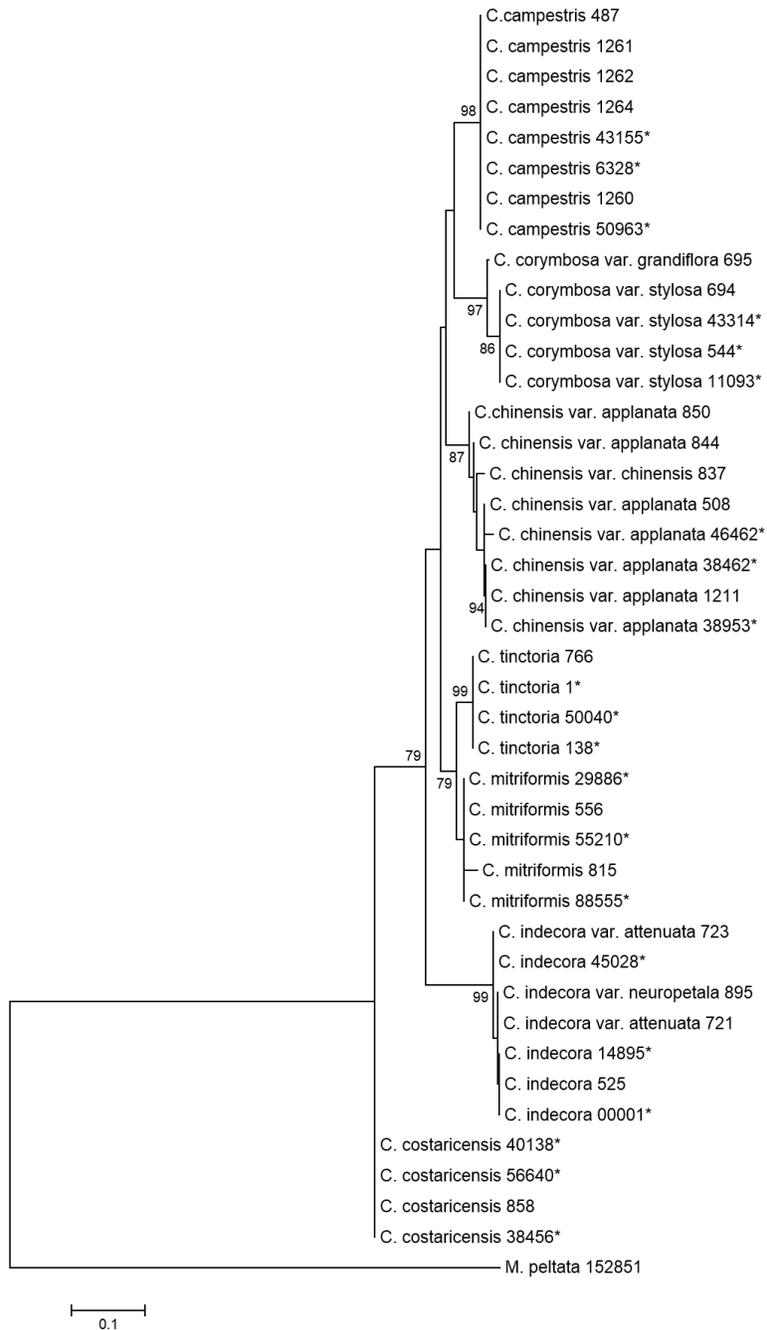
Las otras especies como *C. chinensis* que pertenecen a otros clados presentan una distribución especialmente en México, sur de EE.UU. y Centro América (Stefanovic *et al.*, 2007) en México se ha diversificado y se comprobó al realizar la comparación con los ejemplares que se encuentran en el herbario (Costea *et al.*, 2011). Aunque también se ha encontrado en el sur de Asia, Australia y África.

Los resultados del análisis individual y concatenado de los marcadores ITS y trnL-F señalan, que es posible la identificación taxonómica, de las siete especies de *Cuscuta* analizadas, sin embargo el nivel de soporte en la separación de *C. chinensis* y *C. indecora*, señala que la región ITS permite una mejor definición en la separación de estas especies que trnL-F. Por lo que con los perfiles genéticos que se generaron de estas dos regiones se podrán utilizar como secuencias de referencia para el diagnóstico rápido y oportuno de las especies de *Cuscuta* sin la necesidad de contar con las estructuras florales para su identificación morfológica. Finalmente, sería conveniente

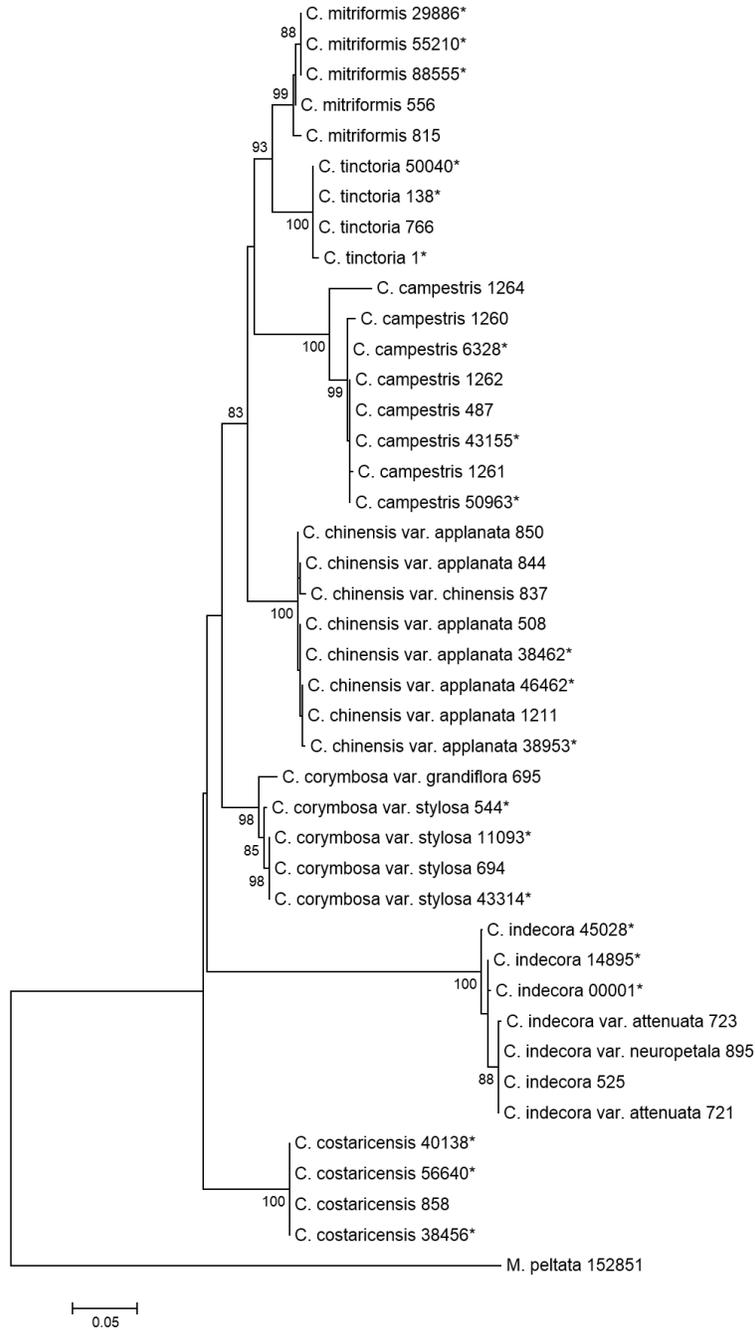
ampliar este tipo de estudio a otras especies del género para separación de un mayor número de especies. En este trabajo fue posible la separación de siete especies, con los marcadores utilizados por lo que estos se pueden incluir dentro de los protocolos de diagnóstico fitosanitario del CNRF, sin embargo, se considera que este tipo de trabajo se debería de ampliar a las demás especies del género, que corroboren que los perfiles genéticos de estos genes son suficientes para el diagnóstico claro y oportuno de las especies y en caso de ser necesario otros marcadores moleculares para poder diferenciar entre las especies como, como *C. chinensis* y *C. indecora*.



**Figura 24.** Reconstrucción filogenética con 42 secuencias de la región ITS de siete especies de *Cuscuta*, con ML con modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura Nei (Tamura, 1992). El método de búsqueda de árboles NNI. Los valores Bootstrap se muestran debajo de las ramas (Felsenstein, 1985). Los números al final de cada taxón indican el número de identificación de cada ejemplar. Los \* indican las secuencias obtenidas en este trabajo.



**Figura 25.** Reconstrucción filogenética con 42 secuencias de la región trnL-F de siete especies de *Cuscuta*, con la aproximación de ML, con modelo de sustitución de nucleótidos 3 parametros de Tamura (Tamura, 1992). Con la búsqueda de arboles con NNI. Los valores Bootstrap se muestran debajo de las ramas (Felsenstein, 1985). Los números al final de cada taxón indican el número de identificación de cada ejemplar. Los \* indican las secuencias obtenidas en este trabajo.



**Figura 26.** Reconstrucción filogenética de 42 secuencias de las región ITS y trnL-F con ML de siete especies de *Cuscuta*, con EL modelo de sustitución de nucleótidos 2 parametros de Kimura (Tamura, 1992). La búsqueda del árbol heurístico NNI. Los valores Bootstrap se muestran debajo de las ramas (Felsenstein, 1985). Los números al final de cada taxón indican el número de identificación de cada ejemplar. Los \* indican las secuencias obtenidas en este trabajo.

## 2.4. Conclusiones

- El análisis bioinformático de especies del género *Cuscuta* presentes en NCBI, permitieron la identificación de los marcadores moleculares ITS y trnL-F como candidatos en la identificación de siete especies de *Cuscuta*, de importancia económica para México
- Las regiones de ITS y trnL-F permitieron la diferenciación de 7 especies de *Cuscuta*, acortando los tiempos de respuesta en comparación con el diagnóstico clásico.
- El análisis polimórfico de las regiones de ITS y trnL-F señalan variabilidad dentro y entre las especies.

El análisis filogenético señalan que la región ITS, permite una mejor diferenciación de las especies, que trnL-F sobre todo en *C. mitriformis* y *C. tinctoria* que son especies emparentadas

## 2.5. Literatura citada

- Alsaadi A., M. Saif., M. Yasser, S Gaur., El-wakil., L. Maloukh and T.V.R. Lakshmi. 2016. Identification of *Cuscuta campestris* Yunker in UAE: study of bar code loci- rbcL, matk and trnH-psbA in the UAE and Egyptian cultivars and in the respective host plants basil and jutte. *International Journal of Research in Science* 2 (2): 9-12.
- Altschul S. F., W.Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Carranza, E. 2008. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Convolvulaceae II. Fascículo 155. Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán.
- CBOL, Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 12794-12797.
- Chase M. W. and M. F. Fay. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science* 325: 682-683.
- Costea M., G. L. Nesom, and S. Stefanovic. 2006. Taxonomy of *Cuscuta gronovii* and *Cuscuta umbrosa* (Convolvulaceae). *SIDA, Contributions to Botany* Vol. 22, No. 1 (11 August 2006), pp. 197-207
- Costea M., I. García R. and M. Welsh. 2008. A new species of *Cuscuta* (Convolvulaceae) from Michoacán, México. *Brittonia* 60(3): 235-239.
- Costea M. and S. Stefanović. 2009. *Cuscuta jepsonii* (Convolvulaceae): An invasive weed or an extinct endemic *American Journal of Botany* 96: 1744–1750.

- Costea M. and S. Stefanović. 2010. Evolutionary history and taxonomy of the *Cuscuta* umbellate complex (Convolvulaceae): Evidence of extensive hybridization from discordant nuclear and plastid phylogenies. *Taxon* 59(6): 1783-1800.
- Costea M., I. Spence and S. Stefanović. 2011. Systematics of *Cuscuta chinensis* species complex (subgenus *Grammica*, Convolvulaceae): evidence for long-distance dispersal and one new species. *Organisms Diversity & Evolution* 11: 373-386.
- Costea M., I. García R., K. Dockstader and S. Stefanović. 2013. More problems despite bigger flowers: Systematics of *Cuscuta tinctoria* clade (subgenus *Grammica*, Convolvulaceae) with description of six new species. *Systematic Botany* 38(4): 1160-1187.
- Costea M., M. A. García, and S. Stefanović. 2015. A phylogenetically based infrageneric classification of the parasitic plant genus *Cuscuta* (Dodder, Convolvulaceae). *Systematic Botany* 40(1): 269-285.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- García M. A. and M. P. Martín. 2007. Phylogeny of *Cuscuta* (Convolvulaceae) based on nrDNA ITS and chloroplast trnL intron sequences. *Systematic Botany* 32 (4): 899-916.
- García M. A., M. Costea, M. Kuzmina, and S. Stefanović. 2014. Phylogeny, carácter evolution, and biogeographu of *Cuscuta* (Dodders: Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. *American Journal of Bonaty* 101(4): 670-690.
- Hillis D.M. Bull J.J. 1993. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, Vol. 42 (2), pp. 182-192
- Hartung J. S., C. Paul., D. Achor and R. H. Brlansky. 2010. Colonization o Dodder, *Cuscuta indecora* by Candidatus *Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. *Phytopathology* 100 (8); 756-752.
- Kumar S., G. Stehcer and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-4 doi: 10.1093/molbev/msw054
- Paz A., M. González, y Crawford A. 2011. Código de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana* 16: 161-17

- Stefanović S., M. Kuzmina and M. Costea. 2007. Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 94 (4): 568-589.
- Taberlet P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.
- Welsh M., S. Stefanović, and Costea M. 2010. Pollen evolution and its taxonomic significance in *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae). *Plant Systematics and Evolution* 285: 83-101.
- White T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, in: A. Innis, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky 1990. *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, USA, pp: 315-322.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Se pudieron identificar 7 especies del genero *Cuscuta* mediante caracteres morfológicos, y se elaboró una guía ilustrada con las características morfológicas más importantes para realizar su identificación.
- Se identificaron los marcadores moleculares ITS y trnL-F para realizar los perfiles genéticos de las siete especies de *Cuscuta*.
- Con este trabajo, nos damos cuenta que el uso del marcador molecular ITS puede realizar la separación de especies lo que implica menos gasto y tiempo, en caso de presentar alguna ambigüedad se puede hacer uso del marcador trnL-F.
- Con los datos de la investigación se demuestra que el uso de características morfológicas y marcadores moleculares específicos permiten realizar la diferenciación de especies de *Cuscuta* de importancia agrícola para México, acortando los tiempos de identificación en comparación con el diagnóstico clásico.

## RECOMENDACIONES

- Seguir complementando esta guía fotográfica con las especies de *Cuscuta* presentes en México, que se encuentren en los diferentes herbarios.
- Complementar la guía fotográfica una base de datos que incluya la secuencia obtenida de estas especies.
- Continuar con este trabajo en otras especies del genero *Cuscuta*.

## ANEXO 1

### Claves dicotómicas para determinar las especies del género *Cuscuta*.

1. Cápsulas indehiscentes.

2. Lóbulos de la corola con ápices inflexos. A menudo afecta malezas, alfalfa y otros cultivos.

3. Perianto membranoso; cáliz amarillo, brillante-reticulado cuando está seco, con ápices obtusos a redondeados. Cápsulas globosas a deprimidas, 1.3–2.8 × 1.9–3.8 mm; no engrosada o levantada alrededor de la gran abertura interestilar \_\_\_\_\_ ***C. campestris***

3. Perianto carnoso; cáliz pardusco no brillante reticulado cuando está seco, con lóbulos agudos. Cápsulas globosas a subglobosas, engrosadas y elevadas alrededor de la abertura intersticial media \_\_\_\_\_ ***C. indecora***

2. Corola de lóbulos rectos.

4. Estambres equivalentes, más largos que los lóbulos de la corola. Cápsulas globosas-deprimidas a globosas-obovoides con 3–4 semillas \_\_\_\_\_ ***C. vandevenderi***

4. Estambres más cortos que los lóbulos de la corola. Cápsulas elípticas-ovoides con 1 semilla \_\_\_\_\_ ***C. salina* var. *salina***

1. Cápsulas circuncisiles cerca de la base (la línea de dehiscencia es fácilmente detectable incluso en la base de los ovarios jóvenes; en esta etapa, la pared de la capsula se rasgará a lo largo de la línea de dehiscencia cuando se aplique una ligera presión).

5. Lóbulos de la corola con una proyección subapical en forma de cuerno.

6. Brácteas ampliamente triangulares, 3–3.5 mm de largo. Flores de 4.2–5.5 mm de largo; los lóbulos del cáliz se acuminan, sin una protuberancia subapical en forma de cúpula o cuerno \_\_\_\_\_ ***C. costaricensis***

6. Brácteas ovadas a lanceoladas, 0.75–2.0 mm de largo. Flores de 2.5–4.5 mm de largo; lóbulos del cáliz obtusos, truncados a agudos con una protuberancia subapical, similar a una cúpula o cuerno.

7. Lóbulos del cáliz orbicular a oblongo-obovado, el ápice casi truncado no es excedido por el apéndice de cúpula subapical. Semillas 0.94–1.45 × 0.8–1.38 mm \_\_\_\_\_ ***C. erosa***

7. Cáliz lóbulos ovados, oblongos a ligeramente espatulados, ápice obtuso a agudo, excedidos por el apéndice apical. Semillas 0.75–1.1 × 0.7–0.9 mm \_\_\_\_\_ ***C. boldinghii***

5. Lóbulos de la corola sin proyecciones subapicales.

8. Lóbulos del cáliz redondos a más anchos que largos, con ápice obtuso o redondeado.

9. Flores de 2.5–4.2 mm de largo. Cápsulas globosas ovoides a ovoides. Semillas 1 por cápsula \_\_\_\_\_ ***C. americana***

9. Flores de 4.5–6.5 (–7) mm de largo. Cápsulas globosas a globosas-deprimidas. Semillas generalmente más de 1 por cápsula.

10. Los lóbulos del cáliz no se superponen o apenas se superponen \_\_\_\_\_ *C. corymbosa* var. *grandiflora*

10. Lóbulos cáliz ampliamente superpuestos.

11. Flores de 5–6.5 mm de largo; lóbulos de la corola en su mayoría erectos ca. 1/4 del tubo de la corola; Estambres incluidos, filamentos de 0.1–0.3 mm de largo; escalas infraestaminales ca. 2/3 mientras el tubo de la corola \_\_\_\_\_ *C. macrocephala*

11. Flores de 4–5.2 mm de largo; los lóbulos de la corola inicialmente erectos, luego reflexionados, ± igualando el tubo; estambres con filamentos de 0.8–1.2 mm de largo; Escamas infrastaminales que igualan el tubo de la corola \_\_\_\_\_ ***C. tinctoria***

8. Lóbulos del cáliz triangular-ovados a lanceolados, más largos que anchos, obtusos, agudos para acuminados ápex

12. Cáliz 1/4–3/4 del tubo de la corola.

13. Inflorescencias densas, paniculiformes-glomeruladas; Pedicelos hasta 1.0 mm de largo. Lóbulos del cáliz que se superponen basalmente \_\_\_\_\_ *C. odontolepis*

13. Inflorescencias sueltas, umbeliformes o racemiformes; Pedicelos de 2–15 mm de largo. Los lóbulos del cáliz no se superponen basalmente.

14. Flores de 5.0–7.5 mm de largo; lóbulos de la corola de aproximadamente la 1/2 del tubo \_\_\_\_\_ *C. polyanthemus*

14. Flores de 2.5–4.5 (–5) mm de largo; Lóbulos de la corola igualando el tubo.

15. Flores 5-merosas; lóbulos del cáliz carinados y / o con protuberancias multicelulares en las venas medias; lóbulos de la corola erectos \_\_\_\_\_ *C. tuberculata*

15. Flores 4-merosas; lóbulos del cáliz no carinados, sin protuberancias multicelulares en las venas medias; lóbulos de la corola extendidos a reflexos \_\_\_\_\_ *C. leptantha*

12. Cáliz igual o más largo que el tubo de la corola.

16. Inflorescencias umbellate.

17. Papilas presentes en los pedicelos, cáliz y lóbulos de la corola; escalas infrastaminales de alrededor de 3/4 del tubo de la corola \_\_\_\_\_ *C. desmouliniana*

17. Papilas ausentes en los pedicelos y el cáliz (a veces presentes en la cara adaxial de los lóbulos de la corola); Escalas infrastaminales iguales o ligeramente más largas que el tubo de la corola.

18. Flores de 4.0–5.5 (–6.0) mm de largo; lóbulos del cáliz acuminados \_\_\_\_\_ *C. legitima*

18. Flores de 2.0–3.0 mm de largo; lóbulos del cáliz obtusos a agudos \_\_\_\_\_ *C. umbellata* var. *umbellata*

16. Inflorescencias glomeruladas o paniculiformes densas.

19. Flores gruesas, marrón-rojizas cuando están secas; escamas infrastaminales oblongas, truncadas distalmente y denticuladas superficialmente, bífidas o con flecos irregulares con algunas fimbrias \_\_\_\_\_ *C. dentatasquamata*

19. Flores membranosas, de color amarillo cremoso al secarse; Escalas infrastaminales redondeadas distalmente y con flecos uniformes.

20. Los lóbulos del cáliz no están cargados o son tan débiles (carina no visible sin microscopio), con lóbulos agudos; estilos 0.4–0.7 mm de largo \_\_\_\_\_ *C. azteca*

20. Lóbulos del cáliz carinados, con lóbulos obtusos a redondeados; estilos 0.8–1.8 mm de largo \_\_\_\_\_ ***C. chinensis var. applanata***

Tomado de Yuncker, 1932; 1965; Costea et al., 2012

1. Cápsulas indehiscentes; Australia \_\_\_\_\_ 2
2. Pedicelos 4.0–12 mm; flores de 2.5–5.0 mm de largo; estilos 0.8–1.6 mm; cápsulas globosas a ovadas. \_\_\_\_\_ *C. tasmanica*
2. Pedicelos 0.5–2.5 mm; flores 1.5–2.5 mm; estilos 0.1–0.3 mm; cápsulas deprimidas-globosas \_\_\_\_\_ *C. victoriana*
1. Cápsulas circuncisas; América del Norte y Central \_\_\_\_\_ 3
3. Estilos cilíndricos tanto en las etapas de la antesis como de la cápsula \_\_\_\_\_ 4
4. Lóbulos del cáliz con protuberancias multicelulares \_\_\_\_\_ 5
5. Inflorescencia glomerulada; pedicelos ausentes; lóbulos del cáliz redondos de 1 a 5 veces más ancho que largo con ápice redondeado \_\_\_\_\_ *C. iguanella*
5. Inflorescencia corimbiforme; pedicelos 1.0–3.0 mm; lóbulos del cáliz ovados con ápice agudo \_\_\_\_\_ *C. insolita*
4. Lóbulos de cáliz sin protuberancias multicelulares \_\_\_\_\_ 6
6. Cada flor con una bráctea en la base (no debe confundirse con la (s) bráctea (s) presentes en la base de los racimos) \_\_\_\_\_ 7
7. Los lóbulos exteriores del cáliz carinados; escama infrastaminal fimbria cilíndrica; cápsulas 4–5.5 + 3–3.5 mm \_\_\_\_\_ *C. montana* (en parte)
7. Los lóbulos del cáliz no se carinan; fimbrias infraestaminales en forma claviforme; cápsulas 2.5–4.0 mm \_\_\_\_\_ 8
8. Cáliz igualando el tubo de la corola; estilos 0.5–1 mm; cápsulas no estrechadas apicalmente \_\_\_\_\_ *C. tolteca*
8. Cáliz 1 / 2–3 / 4 tan largo como el tubo de la corola; estilos 1.5–3 mm; cápsulas estrechadas apicalmente \_\_\_\_\_ *C. timida*

6. Flores sin brácteas en la base (pero 1–2 brácteas presentes en la base de los racimos)\_\_\_\_\_ 9
9. Escamas infraestaminales más cortas que el tubo de la corola, obovadas a espatuladas \_\_\_\_\_ *C. lindsayi*
9. Escamas infraestaminales iguales o más largas que el tubo de la corola, ovadas a oblongas \_\_\_\_\_ 10
10. Flores de 7.0–9.0 mm; estilos de 0.4 a 1 mm de espesor; cápsulas 5.0–6.0 + 3.0–4.0 mm \_\_\_\_\_ *C. volcanica* (en parte)
10. Flores 2.8–7.0 mm; estilos de 0.15–0.3 mm de espesor; cápsulas 2–3.5 + 1.8–2.5 mm \_\_\_\_\_ 11
11. Los lóbulos del cáliz se redondean a 1.75 veces más ancho que largo; lóbulos de la corola del ápice redondeados \_\_\_\_\_ ***C. tinctoria***
11. Lóbulos del cáliz ovado-lanceolado a ovado-triangular; lóbulos de la corola ápice obtuso a subagudo \_\_\_\_\_ *C. purpusii*
3. Estilos agrandados en la base, cónicos en la antesis; en algunas especies se vuelven subuladas en la etapa de la cápsula \_\_\_\_\_ 12
12. Lóbulos del cáliz con protuberancias multicelulares \_\_\_\_\_ *C. cotijana*
12. Lóbulos del cáliz sin protuberancias multicelulares \_\_\_\_\_ 13
13. Al menos algunos de los lóbulos del cáliz son más anchos que largos \_\_\_\_\_ 14
14. Estilos que se vuelven subulados en la fruta; cápsulas con una gran abertura interstilar rodeada por corola marchita en la base; semillas secas con un patrón radial de arrugas \_\_\_\_\_ *C. rugosiceps*
14. Los estilos siguen siendo cónicos en la fruta; cápsulas con una pequeña abertura interstilar, coronadas por la corola; semillas secas alveoladas \_\_\_\_\_ *C. montana* (en parte)
13. Ninguno de los lóbulos del cáliz es más ancho que largo \_\_\_\_\_ 15
15. Estilos subulados en la fruta; cápsulas con grandes aberturas interstilar \_\_\_\_\_ 16
16. Cáliz igualando el tubo de la corola; corola campanulada \_\_\_\_\_ ***C. mitriformis***
16. Cáliz de aproximadamente la 1/2 del tubo de la corola; corola cilíndrica \_\_\_\_\_ *C. jalapensis*
15. Estilos cónicos en fruta; Cápsulas con aberturas intersticiales discretas \_\_\_\_\_ 17
17. Flores de 6.0–7.0 mm de largo; lóbulos del cáliz no carinados; cápsulas rodeadas de corola marchita en la base \_\_\_\_\_ *C. woodsonii*

17. Flores de 7.0–9.0 mm de largo; lóbulos del cáliz carinados; cápsulas rodeadas y coronadas por corola marchita\_\_\_\_\_ *C. volcanica*  
(en parte)

Tomado de Yuncker, 1932; 1965, Costea et al., 2013.

### **Descripción de siete especies de *Cuscuta* que se encontraron parasitando cultivos de importancia agrícola y forestal.**

- ***Cuscuta campestris*** Yunck., Mem. Torrey Bot. Club 18: 138. 1932.

**Tallos** delgados o de grosor medio; amarillo o naranjas. **Inflorescencias** a manera de cimas aglomeradas, compactas, pedicelos más cortos que las flores; brácteas 1 en la base de los grupos, 0–1 en la base de los pedicelos, 0.9–1.5 mm de largo, membranosas, ovadas, ovadas-trianguulares a lanceoladas, márgenes enteros, ápices agudos; **flor** con **cáliz** casi tan largo como el tubo de la corola, los lóbulos ovados, por lo general tan anchos como largos, mayormente sobrepuestos en la base, sobre todo cuando jóvenes; corola campanulada, de 1.5 a 2.0 mm de largo desde la base hasta los senos, blanquecina o amarilla cuanta está seca, con frecuencia glandular, lóbulos anchamente triangulares a sublanceolados, casi del mismo largo que el tubo, agudos y con frecuencia inflexos en el ápice; estambres exentos, más cortos que los lóbulos de la corola, filamentos generalmente algo subulados, casi del tamaño de las anteras, a veces más largos, anteras ovoides; **escamas infraestaminales** de 1.5 – 2.0 mm de largo, mayores al tubo de la corola, oblongo-ovadas, muy fimbriadas, fimbrias de 0.3-0.4 (-0.5) mm, unidas abajo de la mitad; ovario globoso, estilos delgados o algo subulados, más pequeños que la capsula; cápsula con depresión globosa a deprimida, indehiscente, rodeada por 1/3 de la base de la capsula por la corola al marchitarse; cuatro semillas ovadas por cápsula, de aproximadamente 1.5 mm de largo, hilo corto, oblongo, terminal, transverso (Costea et al., 2011a; Costea y Tardif 2006).

**Distribución:** Especie subcosmopolita. En México se ha encontrado en los estados de Chihuahua, Durango, Guanajuato, Jalisco, Michoacan, Morelos, San Luis Potosi, Sonora, parasitando plantas herbáceas, alfalfa, *Trifolium* y malezas. (Costea y Tardif 2006). Florece y fructifica entre mayo y agosto (Carranza, 2008).

- ***Cuscuta chinensis*** Lam. var. *applanata* (Engelm.) Costea y Stefanov., Org., Divers. Evol. 11:383. 2011.

**Tallos** delgados, amarillos a cremosos. Inflorescencias glomeruladas a paniculiformes densas. Pedicelos de 0.4–3.0 mm de largo. **Una bráctea en la base de los grupos**, 0–1 en la base de los pedicelos. **Flores** pentámeras, 2.5–3.5 mm de largo, membranosas, de color blanco cremoso cuando están frescas, de color amarillo cremoso al secarse. Papilas ausentes. Laticíferos evidentes en las brácteas, cáliz, corola, anteras y ovarios, aislados o en hileras, ovoides a alargadas. Cáliz 1.5–2.0 mm de largo, amarillo pajizo, reticulado y brillante, cupulado, tubo de la corola de 0.6–0.8 mm de largo; lóbulos de 0.8 a 1 mm de largo, que se superponen basalmente, generalmente ovado-triangulares y con protuberancias multicelulares irregulares a lo largo de las venas, márgenes completos, ápice obtuso a redondeado. Corola de 2.0–3.3 mm de largo, tubo de 1.0–1.5 mm de largo, campanulada pero que se vuelve globosa en la fruta; lóbulos de 0.9 a 1.3 mm de largo, extendidos, ovado-lanceolado, márgenes enteros, ápice obtuso a redondeado. Estambres ± exertos, más cortos que los lóbulos; filamentos de 0.4–0.8 mm de largo; anteras 0.4–0.6 × 0.4–0.5 mm, ampliamente ovadas. Escamas infraestaminales de 1.2–1.8 mm de largo, iguales o más largas que el tubo de la corola, obovadas, con flecos largos, fimbrias de 0.2–0.4 mm. Estilos 0.8–1.8 mm, iguales o más largos que el ovario, uniformemente filiformes. **Cápsulas** dehiscentes, 1.2–2.5 × 0.8–1.6 mm, deprimidas, globosas y ligeramente angulares, translúcidas, rodeadas por la corola marchita. Semillas 3–4 por cápsula, 0.85–1.2 × 0.8–1.1 mm, angulosas, ampliamente elípticas (Costea, 2011).

Distribución en México, Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí, Zacatecas. Floración de agosto a septiembre. Sus hospedantes herbáceos son *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Anisacanthus*, *Bahía*, *Bahiopsis*, *Baileya*, *Boerhavia*, *Chamaecrista*, *Chamaesaracha*, *Croton*, *Dalea*, *Ipomoea*, *Partenium*, *Sanvitalia*, *Solanum*, *Tiquilia*, *Tragia*, *Viguiera* (Costea, 2011).

- ***Cuscuta corymbosa*** Ruiz y Pavón, Fl. Peruv. 1: 69. 1798.

**Tallos** de grosor medio de color naranja; inflorescencias corimbiformes, más o menos laxas, pedicelos de casi el mismo largo que las flores (2.0–6.0 mm); **flor** pentámera 4.5–

6.5 (–7) mm de largo, de color blanca cuando están frescas y de color marrón cuando están secas, sin papilas, cáliz de 2 – 2.5 mm, membranoso, casi alcanzando la mitad del tubo de la corola, lóbulos cortos, anchos, obtusos, ligeramente o no sobrepuestos; corola cilíndrica, de alrededor de 4 mm de largo desde la base hasta los senos, con lóbulos de un cuarto a un medio de la longitud del tubo, ovado-oblongos, obtusos, erectos o extendidos; **escamas infraestaminales** delgadas, angostas, de aproximadamente de  $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$  tan largas como el tubo de la corola, dentadas o apenas fimbriadas, unidas debajo de la mitad de su longitud; estambres casi de la mitad del largo de los lóbulos, anteras ovado-cordadas; ovario globoso u ovoideo, pequeño, estilos delgados, más largos que el ovario; **cápsula** pequeña, globosa, translúcida, circuncísil, cubierta y rodeada por la corola marchita; semillas de 1 a 4, oblicuas, de alrededor de 1.5 mm de largo, hilo corto. De tres variedades existentes, en México se puede encontrar la variedad *C. corymbosa* var. *grandiflora* y *C. corymbosa* var. *stylosa*, las cuales se distinguen principalmente por el tamaño de la flor y el tamaño del cáliz (Carranza, 2008).

*C. corymbosa* var. *grandiflora*, **flores** de 4.0 mm de longitud, forma globular, cáliz más largo que la mitad del tubo de la corola, **escamas infraestaminales** de tres cuartos aproximadamente de longitud del tubo de la corola. Florece de septiembre a noviembre y se le ha encontrado en fruto de noviembre a enero. Su distribución en México: Baja California, Baja California Sur, Sonora, Tamaulipas, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Edo. México, CDMX, Morelos, Guerrero, Chiapas (Costea, 2012).

*C. corymbosa* var. *stylosa*, flores de 3.0 mm de longitud, **corola** cilíndrica, **cáliz** más corto que la mitad del tubo de la corola, escamas que llegan hasta la mitad de la corola. Florece de julio a diciembre. Distribución en México restringida al norte y centro del territorio mexicano. Baja California Sur, Sinaloa, Tamaulipas, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Guerrero, Edo. México, CDMX (Carranza, 2008).

- ***Cuscuta indecora*** Choisy Mém. Soc. Phys. Genève 9:278. 184

**Tallos** delgados a medianos, amarillos a naranjas. Inflorescencias sueltas a densas, paniculiformes o corimbiformes. Pedicelos de 0.5–6.0 mm de largo. Brácteas 1 en las bases de los grupos y 0–1 en la base de los pedicelos, 0.6–1.5 mm de largo, ovadas a lanceoladas, márgenes completos, ápices agudos. **Flores** pentámeras, de 2.0–5.0 mm de largo, membranosas a gruesas, de color blanco translúcido cuando están frescas, de color amarillo cremoso a marrón oscuro cuando se secan. Laticíferos visibles en el perianto a lo largo de las venas medias y en los ovarios. **Cáliz** 1.2–2 mm de largo, cupulado, aproximadamente a la mitad del tubo de la corola aunque puede llegar a ser más largo que este, lóbulos de 0.5–1.2 mm de largo, superpuestos en la base, lanceolados a triangular, ápice agudo. Corola 2.5–4.5 mm de largo, campanulada ó campanulada cilíndrica, subglobosa o suburoleolada, lóbulos de 0.7–1.5 mm de largo, triangular-ovado, márgenes enteros, ápice agudo, inflexos. Estambres apenas extraídos o encerrados, más cortos que los lóbulos de la corola. **Escamas infrastaminales** de 1.5–2.8 mm de largo o tan largas como el tubo de la corola, que alcanzan las bases de los filamentos, puenteadas a 0.5–0.7 mm, obovadas a espatuladas, redondeadas, uniformemente densas, con flecos largos, fimbrias de 0.2–0.4 mm de largo. Estilos de 1–2.5 mm de largo, del tamaño del ovario o un poco más largos, uniformemente filiforme. **Cápsulas indehiscentes**, globosas a subglobosas, semitranslúcida. Semillas 2–4 por cápsula de 1.7 mm de largo (Costea *et al.* 2006; Yuncker, 1932).

Floración agosto-noviembre. Aparentemente se extiende como una maleza de alfalfa; también se puede encontrar parasitando herbáceas como *Baccharis*, *Chenopodium*, *Helianthus*, *Heterotheca*, *Ipomoea*, *Pluchea*, *Polygonum*, *Rhynchosia* y *Tephrosia*. En México se encuentra en Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Edo. México, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Zacatecas, Yucatán (Costea *et al.* 2006).

- ***Cuscuta costaricensis*** Yunck., Mem. Torrey Bot. Club 18: 227. 1932.

**Tallos** delgados o de grosor medio, amarillos o naranjas; pedicelo de 0 – 1.5 mm; presenta una bráctea debajo de los grupos de flores, inflorescencias dispuestas en racimos glomerulados, **flores** de 3.0–4.0 mm aproximadamente, pentámeras,

subsésiles de color blanco cuando están frescas y cremosas cuando se secan; **cáliz** de 3.2 – 3.5 mm de largo, más o menos campanulado igual que el tubo de la corola, lóbulos anchamente ovados, agudos o acuminados, ligeramente imbricados; corola cilíndrica a campanulada, de 3 a 4 mm de largo desde la base hasta los senos, lóbulos anchamente ovados o suborbiculares, erectos o extendidos, más cortos que el tubo de la corola, agudos o acuminados o por lo general cuspidados ya que presentan una cúspide dorsal subterminal de 0.1 – 0.3 mm de longitud; estambres más cortos que los lóbulos de la corola, los filamentos delgados, anteras ovoideas a elipsoideas; **escamas infraestaminales** oblongas de 2.0 – 2.8 mm de largo, alcanzando los estambres, fimbriadas de 0.2 – 0.4 mm; ovario globoso, estilos delgados, capilares, a veces apenas subulados en la base en el fruto, ligeramente desiguales, mucho más largos que el ovario; **cápsula** comprimido-globosa, circuncísil, rodeada completamente por la corola al marchitarse; semillas 2 o 3, ovoideas a globosas, más o menos trígonas, de 1.4 a 1.7 mm de largo, de color café (Carranza, 2008; Costea et al., 2011a).

Se le ha encontrado con flor de septiembre a noviembre y los frutos se presentan desde noviembre hasta probablemente enero. Parasita plantas herbáceas sobre todo de las familias Compositae y Leguminosae (*Anoda*, *Cologania*, *Desmodium*, *Jaltomata procumbens*, *Tagetes micrantha*, *Heterosperma*, *Melampodium*, *Millieria*, *Salvia*, *Simsia* y *Xanthocephalum*). Se ha reportado en los estados de Chihuahua, Durango, Edo. México, Guanajuato, Jalisco, Michoacán (Costea et al., 2011a).

- ***Cuscuta mitriformis*** Engelm. in Hemsl., Diag. Pl. Nov. p. 54. 1880.

**Tallos** gruesos de color naranja; inflorescencias dispuestas en racimos compactos, pedicelos más cortos que las flores, 0.5 a 2.0 mm de largo; presenta una bráctea en la base de los pedicelos, de forma ovado-triangular, con ápice agudo a obtuso. **Flores** pentámeras, de 3.2 – 5.5 mm de longitud, cáliz campanulado, casi tan largo como el tubo de la corola, lóbulos ovados, obtusos, más o menos desiguales e irregulares, sobrepuestos en la base, los más grandes con frecuencia fuertemente carinados; corola blanca cuando está fresca, de color marrón cremoso cuando está seca, campanulada, cilíndrica casi de 3 mm de largo; estambres más cortos que los lóbulos de la corola,

filamentos subulados, anteras oblongas, de igual tamaño, o más cortas que los filamentos; **escamas infraestaminales** de 1.5 – 3.5 mm de largo, igualando el tubo de la corola, oblongas, en su mayoría algo truncadas, bífidas, o raramente ovadas; fimbrias de 0.1 – 0.4 mm de largo, cilíndricas; ovario cónico, estilos subulados, más cortos que el ovario, en fruto ampliamente divergentes, a manera de cuernos, estigmas lobulados; **cápsula** dehiscentes, globosas, más o menos prolongada en la base de los estilos, la corola al marchitarse permanece a su alrededor. 4 semillas por cápsula, de aproximadamente 2 mm de largo, anguladas, ampliamente elípticas u ovadas (Carranza, 2008).

Se distribuye en el norte y centro del territorio de México, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, México, Puebla, Tlaxcala y Veracruz.

Floración y fructificación en septiembre y octubre.

Esta especie se ha observado parasitando plantas de *Bernardia*, *Eupatorium*, *Desmodium*, *Vicia* y otras (Carranza, 2008).

- ***Cuscuta tinctoria*** Mart. in Engelm. Trans. Acad. St. Louis 1:480. 1859.

**Tallos** medianos, raramente gruesos de color amarillo a naranja; inflorescencias en forma de glomérulos densos, pedicelos de 0.5 – 2.6 mm de largo; **flores grandes** pentámeras, de 3 – 5.2 mm de largo, carnosas, blancas que se van tornado marrón rojizas cuando se secan. Laticíferos visibles en el cáliz, **cáliz** casi tan largo como el tubo de la corola 2 – 3 mm de longitud, lóbulos obtusos, sobrepuestos en la base, redondos a más anchos que largos u ocasionalmente elípticos, no carinadas o con protuberancias multicelulares en las venas medias, márgenes completos, apéndices redondeados; **corola** campanulada de 2.8-5mm de largo, tubo de 1.4 – 3.0 mm de largo, lóbulos ovados o algo oblongos de 1.4 a 2.5 mm de largo, obtusos, sobrepuestos, erectos o extendidos, margen entero o serrulado; estambres más cortos que los lóbulos de la corola, anteras versátiles, oval-oblongas, filamentos casi del mismo tamaño que las anteras; **escamas infraestaminales** que igualan el tubo de la corola, unidas hasta casi la mitad de su longitud, uniformemente fimbriado, con fimbrias de 0.2 – 0.5 mm de

longitud; ovario globoso, estilos delgados, generalmente más largos que el ovario, pero uniformes; **cápsula** comprimido-globosa, circuncísil, rodeada por la corola al marchitarse; **semillas** 3 o 4 por cápsula, de casi 1.5 mm de largo, en ángulo o ligeramente dorso ventralmente comprimidas, elípticas-oblongas a las células circundantes (Yuncker, 1932; Costea, 2013).

Esta especie se distribuye desde el norte de México hasta Guatemala. Sinaloa, Coahuila, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Sonora.

**Parasita especies leñosas.** Se le encuentra floreciendo primordialmente entre agosto y enero, aunque en ocasiones se extiende a casi todo el año y lo mismo se registra también con frutos a lo largo de las cuatro estaciones (Costea, 2013).