

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *LIMONIUM EMARGINATUM* EN EL ESTRECHO DE GIBRALTAR

Manuel E. Figueroa Clemente / Grupo de investigación GECONAT “Ecología, Citogenética y Recursos naturales”

Jesús M. Castillo Segura / Grupo de investigación GECONAT “Ecología, Citogenética y Recursos naturales”

Orlando Garzón Gómez / Grupo de investigación GECONAT “Ecología, Citogenética y Recursos naturales”

RESUMEN

El análisis genético a través de los marcadores de ADN (ISSRs), técnica de microsatélites, se ha utilizado determinar la variabilidad genética de las diferentes núcleos de *Limonium emarginatum* presentes en el Estrecho de Gibraltar, así como de la relación existente entre ellos. A partir de la información obtenida, se ha intentado explicar cuál ha podido ser la ruta seguida en la colonización de los diferentes hábitats de *Limonium emarginatum*.

El número de núcleos seguidos ha sido de 29, procedentes del litoral de Tarifa (15), Algeciras (4), Gibraltar (4) y Ceuta (6).

Se han utilizado 11 cebadores (University of British Columbia, primer set #9), elegidos por originar bandas repetibles. Se han analizado un total de 219 bandas (loci) para el conjunto de los cebadores utilizados, oscilando el número de fragmentos amplificados para cada uno entre 8 y 31.

Se ha medido el número medio de alelos por locus (A) de cada población, el Índice de polimorfismo (P_j) de Brown et al. (1980), la contribución interpoblacional e intrapoblacional a la variabilidad total observada (D_{ST} , G_{ST}), y el índice de similitud de Hedrick. Por último, se ha realizado un análisis de agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal 1973) para obtener un dendrograma que representara de un modo gráfico dichos valores.

Palabras clave: *Limonium emarginatum*, estrecho de Gibraltar, variabilidad genética, microsatélites.

INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos que se repiten consecutivamente 10 o más veces. Estas secuencias simples de ADN son muy variables y pueden ser estudiadas con una metodología rápida y relativamente simple. Los microsatélites también son conocidos como SSRs ("Simple Sequence Repeats").

Los microsatélites reúnen una serie de características que los hacen idóneos para ser utilizados para la identificación varietal porque son altamente polimórficos, muy abundantes y están distribuidos por todo el genoma, son de herencia codominante (se distinguen todos los homocigotos entre sí y estos de los heterocigotos), muy reproducibles, se necesita poco ADN para detectarlos y su automatización es fácil.

Se constituye como una de las técnicas más adecuadas para realizar un estudio de diversidad genética de poblaciones, y en nuestro caso de *Limonium emarginatum*. A través de este estudio podemos determinar la variabilidad genética de las poblaciones y las relaciones que existen entre ellas. Esto nos puede permitir establecer una posible guía de cual ha sido el itinerario de colonización de los hábitats del Estrecho.

MATERIAL Y MÉTODOS

¿Cómo se realiza un test de identificación varietal?

En primer lugar se extrae el ADN de una muestra de la variedad a estudiar. El ADN se obtuvo de tejido de hoja y cada extracción permite estudiar muchos microsatélites. Cada uno de ellos da un patrón de bandas (o picos si se usa un secuenciador automático), normalmente una o dos por microsatélite. La suma de la información producida por varios microsatélites distintos (entre 15 y 25 es un número suficiente) producen un patrón de bandas conjunto que es específico de esta variedad. Este patrón de bandas es como una huella dactilar, perfil molecular o genotipo de la variedad y puede ser usado para distinguirla de las demás.

Si tenemos el perfil molecular de una muestra desconocida y queremos saber si corresponde al de una variedad determinada, tendremos que compararlos. Si los dos perfiles difieren entre sí, las variedades son distintas. Si los dos perfiles son iguales las variedades son idénticas o, caso poco probable, tienen el mismo patrón de bandas siendo distintas. Para resolver este último dilema, se puede calcular la probabilidad de encontrar un perfil idéntico al de la variedad conocida con los microsatélites que hemos usado para caracterizarla (coeficiente "T"). El valor medio de este coeficiente (Aranzana y col. 2001) fue de 5×10^{-16} , lo que significa que la probabilidad media de que se pueda encontrar por azar un patrón de bandas idéntico al obtenido siendo la variedad distinta es de cinco en 10.000 billones, es decir una probabilidad tan baja como para descartar esta hipótesis con gran seguridad.

Material vegetal

El material vegetal empleado en el presente trabajo ha consistido en 29 poblaciones de *Limonium*, de las que 27 fueron clasificadas como *L. emarginatum*, 1 como *L. virgatum* y 1 como un posible híbrido entre ambas especies (tabla 6.1). De cada una de las poblaciones se han analizado 3 plantas.

Nº	Código	
1	TS	Tarifa
2	TY	Tarifa
3	CS	Cala Secreta
4	PCH	Punta Chorlito
5	PCHO	Punta Camarinal
6	PCAMSE	Punta Camarinal
7	PCAME	Punta Camarinal
8	PCAMSP	Punta Camarinal
9	PCAM+	Punta Camarinal
10	V	¿híbrido?
11	LVIR	<i>L. virgatum</i>
12	EP	Gibraltar
13	CB	Gibraltar
14	EG	Gibraltar
15	PEEN	Gibraltar
16	CEME	Ceuta
17	JXIII	Ceuta
18	MH	Ceuta
19	ITE2	Ceuta
20	BE	Ceuta
21	CARRO	Ceuta
22	GUA	Guadalmesi
23	TOR	Tarifa
24	TOA	Tarifa
25	TEA	Tarifa
26	TER	Tarifa
27	PC	Punta Carnero
28	PP	Punta Paloma
29	LL	Los Lances

Tabla 6.1.- Poblaciones de *Limonium emarginatum* analizadas.

Métodos para el análisis de los marcadores de ADN (ISSRs)

El ADN se extrajo a partir de hojas desecadas en silicagel mediante el DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen), siguiendo el protocolo proporcionado por la empresa. Posteriormente se realizaron las reacciones de PCR con un volumen final 25 µl, añadiendo las siguientes cantidades de reactivos por cada muestra:

- Tampón con MgCl₂ (10X) 2,5 µl
- BSA (10 µg/µl) 2,0 µl
- dNTP (2,0 mM de cada uno) 2,0 µl
- Cebador (5 pmoles/µl) 2,5 µl
- *Taq* DNA polimerasa (5 U/µl) 0,2 µl
- ADN (10 ng/µl) 2,0 µl
- H₂O 13,8 µl

Se utilizaron 11 cebadores (University of British Columbia, primer set #9), elegidos por originar bandas repetibles (tabla 6.2).

<i>Nº del cebador</i>	<i>Secuencia (5' → 3')</i>
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
821	GTG TGT GTG TGT GTG TT
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
878	GGA TGG ATG GAT GGA T
886	VDV CTC TCT CTC TCT CT

Tabla 6.2.- Cebadores utilizados para la obtención de marcadores ISSRs.

Las condiciones de amplificación fueron: 7 minutos a 94 °C, 45 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C, 2 minutos a 72 °C, un ciclo final de 7 minutos a 72 °C y enfriamiento a 4 °C por un tiempo indefinido.

Una vez finalizada la PCR, se recogieron 15 µl de la reacción y se agregaron 5 µl de tampón de carga (10 % glicerol, 0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xilencianol). Esta mezcla se analizó en un gel de agarosa de 20 cm de largo al 2 % en 1X TAE. Transcurrida la electroforesis a 100 voltios durante 5 horas a temperatura ambiente, el gel se introdujo en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y los fragmentos de ADN se visualizaron con un transiluminador a luz UV 300 nm. Como referencia para la estimación de los tamaños de los productos amplificados se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder de GibcoBRL®.

Para cada cebador utilizado se obtuvo un conjunto de bandas y para cada individuo se registró la presencia (1) o ausencia (0) de las mismas.

En todos los casos, cada banda se ha analizado como un marcador diferente que presentara dos alelos, uno dominante responsable de la presencia de banda y otro recesivo que determinaría la ausencia de la misma.

Las medidas de variabilidad utilizadas han sido las siguientes:

- 1.- Número medio de alelos por locus (A) de cada población.
- 2.- Índice de polimorfismo (P_j) de Brown et al. (1980).

Cuantifica el polimorfismo de cada locus en cada una de las poblaciones. Se ha estimado mediante el parámetro P_j :

$$P_j = \sum_{i=1}^n P_i(1 - P_i) = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

donde P_i es la frecuencia del fenotipo i -ésimo en el locus j -ésimo y n es el número de fenotipos observados para dicho locus en cada población.

- 3.- Para estudiar la contribución interpoblacional e intrapoblacional a la variabilidad total observada se han calculado una serie de parámetros.

Uno de ellos es el parámetro D_{ST} que mide la diferenciación que existe entre poblaciones (Nei 1973). Se define como:

$$D_{ST} = P_T - \overline{P_s}$$

P_T se calcula como $\overline{P_S}$ pero utilizando a todos los individuos de una especie como pertenecientes a una misma población, y $\overline{P_S}$ es la media aritmética de los P_S de los distintos loci en las poblaciones analizadas de la especie en cuestión.

Otro índice utilizado ha sido el coeficiente de diferenciación G_{ST} definido por Nei (1973). Es una magnitud relativa de la diferencia entre poblaciones con respecto al total de la variación observada. Se define como:

$$G_{ST} = D_{ST} / P_T$$

4.- Para determinar la semejanza existente entre las distintas poblaciones se ha utilizado el índice de similitud de Hedrick.

El índice de similitud de Hedrick atiende a las frecuencias de los genotipos o fenotipos de las poblaciones y fue escogido porque nos proporciona una idea de la diferenciación genotípica que existe en ellas. Este índice con respecto a un locus entre dos poblaciones X e Y se calcula como:

$$I_H = \frac{\sum_{j=1}^n P_{jY} P_{jX}}{1/2 \left(\sum_{j=1}^n P_{jX}^2 + \sum_{j=1}^n P_{jY}^2 \right)} \quad (\text{Hedrick, 1971})$$

donde P_{jX} y P_{jY} son las frecuencias del genotipo o fenotipo j-ésimo en las poblaciones X e Y respectivamente y n es el número de genotipos o fenotipos para dicho locus. Con el valor obtenido para cada locus, se realizó una media aritmética para estimar la similitud entre las poblaciones.

A partir de estas similitudes se ha realizado un análisis de agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal 1973) para obtener un dendrograma que representara de un modo gráfico dichos valores.

RESULTADOS

Se han analizado un total de 219 bandas (loci) para el conjunto de los cebadores utilizados. El número de fragmentos amplificados para cada uno varió entre 8 y 31 (fig. 6.1).

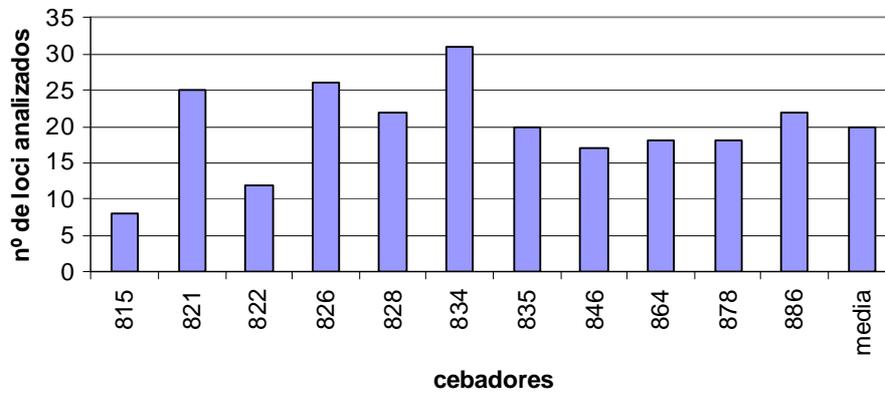


Figura 6.1.- Número de loci analizados por cebadores. Loci estudiados: 219. Cebadores utilizados: 31.

El grado de polimorfismo de los distintos loci dentro de las poblaciones, medido como P_j , se representa en la figura 6.2.

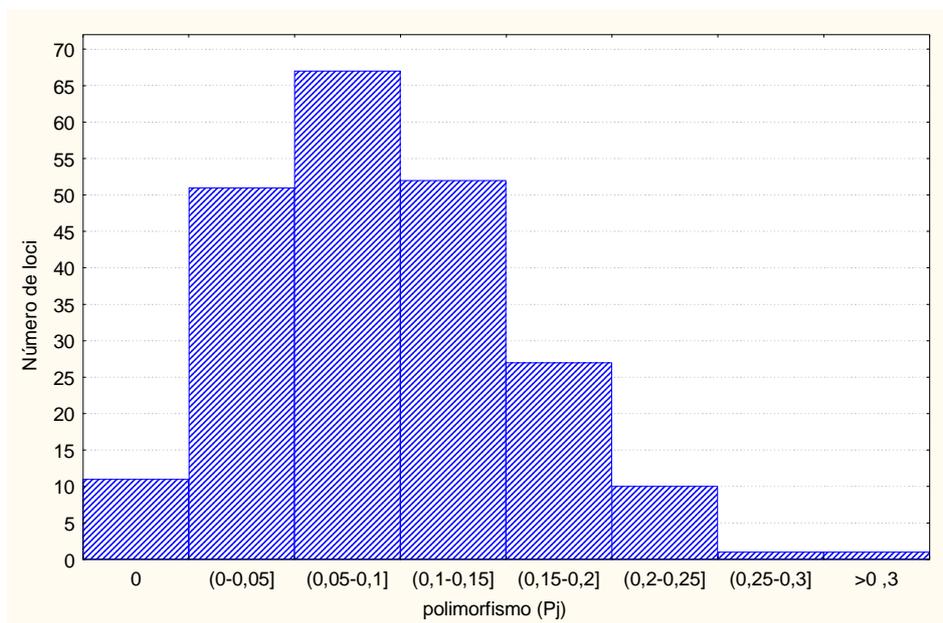


Figura 6.2.- Grado de polimorfismo de los distintos loci dentro de las poblaciones.

El grado de polimorfismo de los distintos loci en el conjunto total de las poblaciones, medido como P_j , se representa en la figura 6.3.

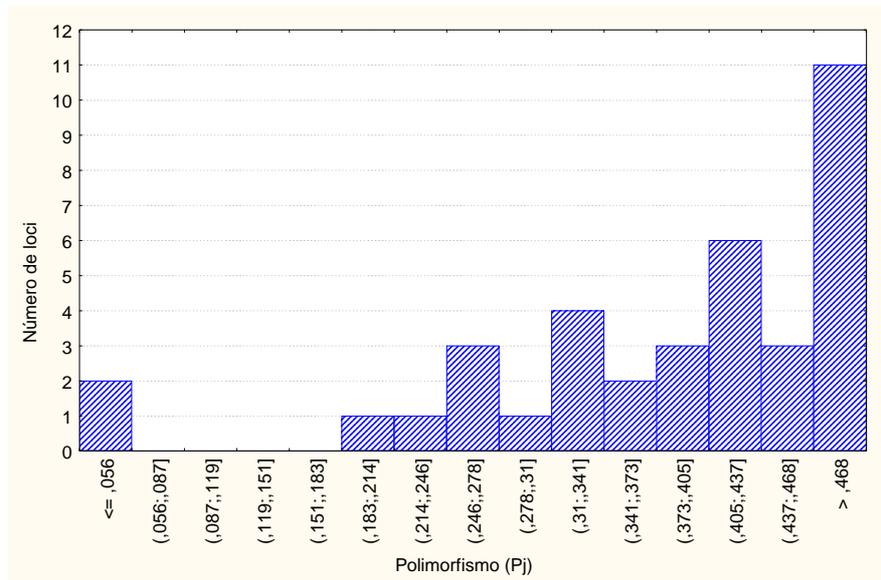


Figura 6.3.- Grado de polimorfismo de los distintos loci en el conjunto total de las poblaciones

Los valores de distribución de la variabilidad dentro y entre poblaciones han sido

$$P_T = 0,316$$

$$P_S = 0,093$$

$$D_{ST} = 0,223$$

$$G_{ST} = 0,706$$

El valor de G_{ST} indica que gran parte de la variación detectada (el 70%) se debe a diferencias genéticas entre las poblaciones, si bien este valor resulta elevado por la inclusión en el análisis de una muestra de una especie diferente.

Las relaciones genéticas entre las muestras se representa en el dendrograma obtenido a partir de los índices de similitud de Hedrick (fig. 6.4).

Del total de núcleos estudiados (29), la gran mayoría se encontró encuadrados en una roseta (24), representándose de modo diferenciado 5 núcleos. Dos de ellos (010, 011) se correspondieron con otra especie (*Limonium virgatum*) en Punta Camarinal, otros dos con *Limonium emarginatum* en Punta Paloma (028) y Los Lances (029), y por último un núcleo correspondiente a un patrón diferente localizado en Punta Camarinal (008).

Los núcleos de Ceuta se agruparon entre sí del siguiente modo: Playa Amaro (016) y Juan XXIII (017) se relacionan entre si y con el grupo formado por Desnarigado (018) y Punta Bermeja (019). Por otro lado se asociaron Benzú (020) y Punta Blanca (021). Estos dos últimos núcleos tuvieron una mayor relación con los situados en la Isla de las Palomas (Tarifa) y Guadalmesí (022, 023, 024). Los cuatro núcleos mencionados anteriormente tuvieron mayor relación con los núcleos situados en el Peñón de Gibraltar (013, 014, 015) (fig.6.5.).

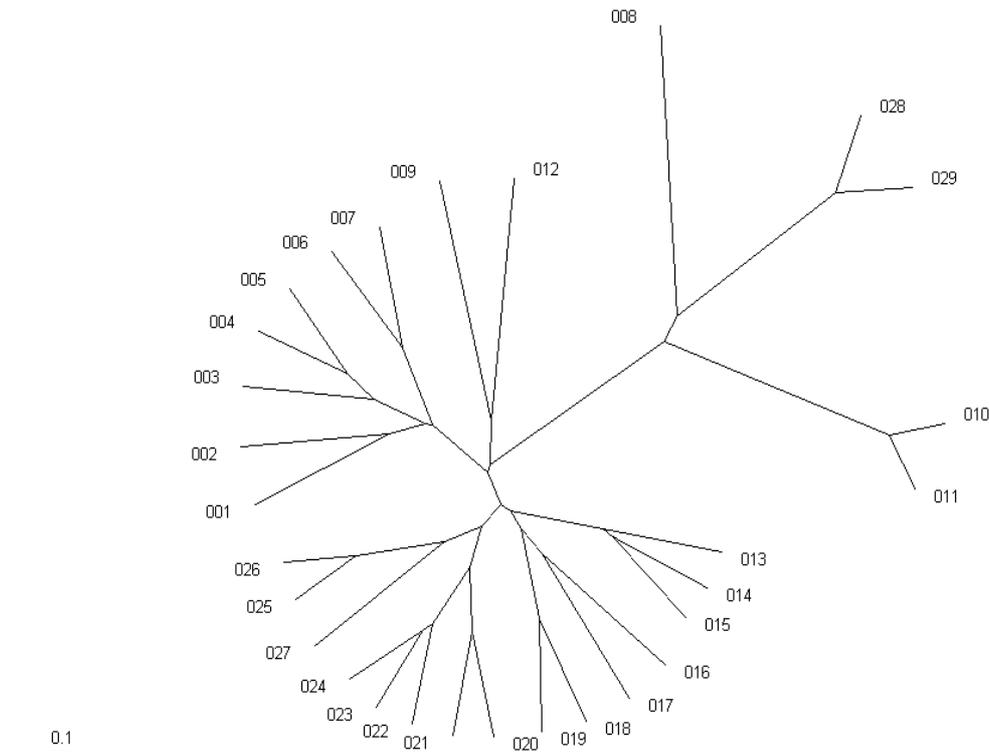


Figura 6.4.- Dispersión de las muestras estudiadas. Índice de Similitud de Hedrick. 01: Tarifa sur, 02: Tarifa noroeste, 03: Cala secreta, 04: Punta Chorlito este, 05: Punta Chorlito oeste, 06: Punta Camarinal sureste, 07: Punta Camarinal Este, 08: Punta Camarinal surestedif, 09: Punta Camarinal oeste, 10: Punta Camarinal vir, 11: Punta Camarinal Iv, 12: Punta Europa, 13: Catalan Bay, 14: Peñón Este, 15: Peñón sureste, 16: Playa Amaro, 17: Juan XXIII, 18: Desnarigado, 19: Punta Bermeja, 20: Benzú, 21: Punta Blanca, 22: Guadalmesí, 23: Tarifa oeste roca, 24: Tarifa oeste arena, 25: Tarifa este arena, 26: Tarifa este roca, 27: Punta Carnero, 28: Punta Paloma, 29: Los Lances. Número de locus estudiados: 219. Nº de muestras estudiadas: 29.

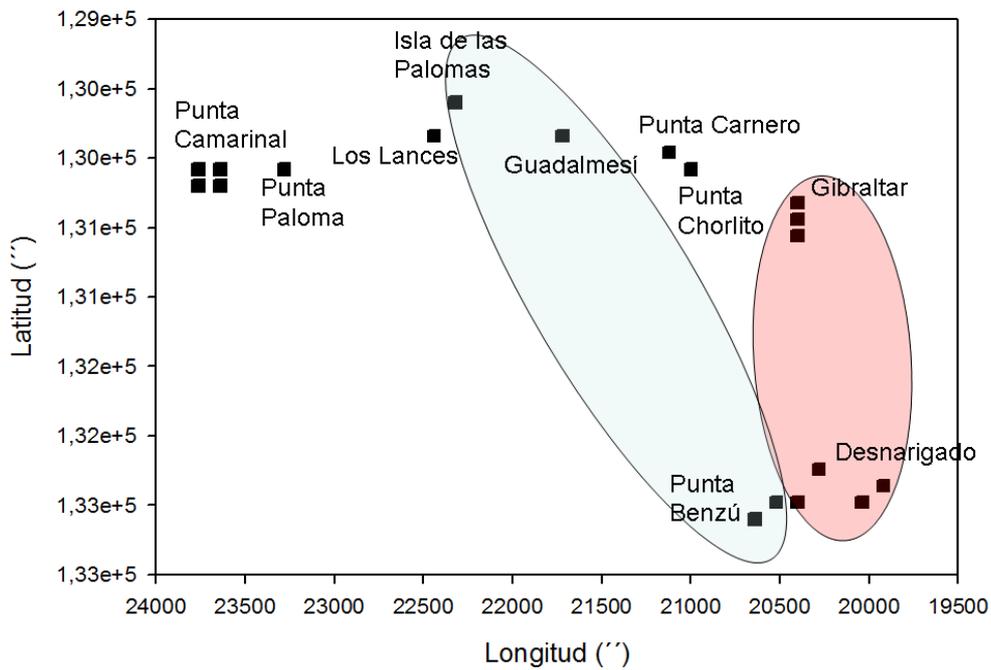


Figura 6.5.- Relación genética entre los núcleos poblacionales de la costa peninsular y Ceutí. Número de locus estudiados: 219. Núcleos estudiados: 29.

Por tanto, se encontró a nivel genético dos unidades diferenciadas, distribuidas al oeste y al este de Ceuta. Los núcleos de Punta Benzú y Punta Blanca manifestaron más afinidad genética con los núcleos situados al oeste de la Isla de las Palomas (Tarifa) y Guadalmesí. Los núcleos de Punta Bermeja, Playa Amaro, Desnarigado y Juan XXIII manifestaron más afinidad genética con los núcleos situados en el peñón de Gibraltar (fig. 6.6).

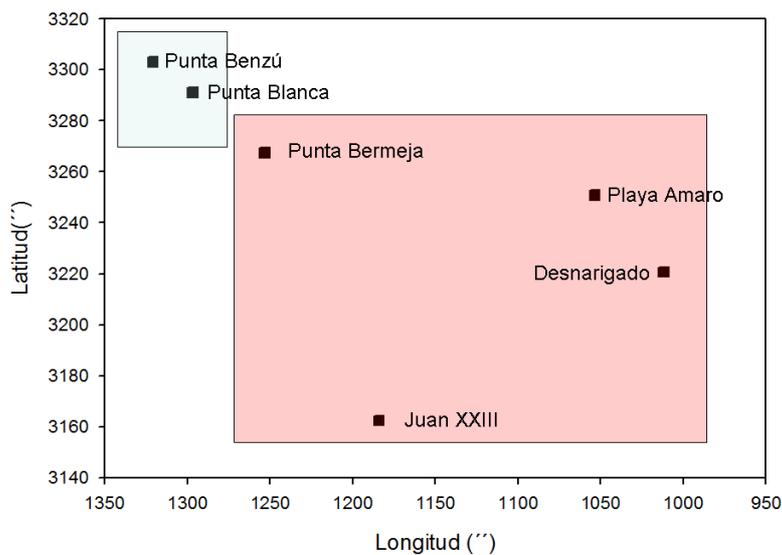


Figura 6.6.- Semejanza genética de los núcleos poblacionales de *L. emarginatum* en el litoral Ceutí. Número de locus estudiados: 219. Núcleos estudiados: 6.

La isla de las Palomas presenta núcleos con diversidad genética delimitados según orientación. Los dispuestos al oeste de la isla se corresponden con los encontrados en Punta Camarinal y los dispuestos en el este se corresponden con los encontrados en el oeste de la costa Ceutí. Se localizaron dos núcleos con diferencias genéticas respecto a las demás. Estas se localizaban sobre un sustrato arenoso localizado en la zona de Punta Paloma y Los lances.

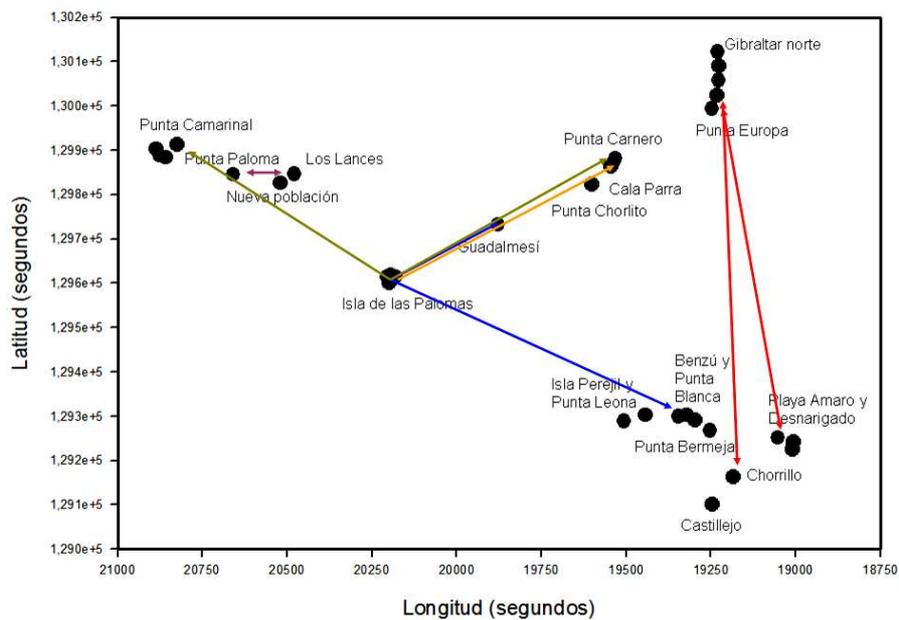


Figura 6.7.- Correlaciones genéticas en los núcleos poblacionales de *L. emarginatum*

El test de Mantel ($r(AB) = -0,311$ p-valor (bilateral) $< 0,0001$ $\alpha = 0,05$) que se centra en matrices de similitud/distancias derivadas de la diversidad genética y las distancias, nos indica una relación negativa (puede oscilar entre -1 y +1), donde a mayor distancia entre los núcleos se da una mayor diferencia genética.

El índice de similitud de heidrick indica la semejanza de los núcleos. En la figura 6.8. se muestra la disimilitud de los núcleos y las distancias entre ellos. Se manifiesta una tendencia a una mayor diversidad genética con respecto a la distancia.

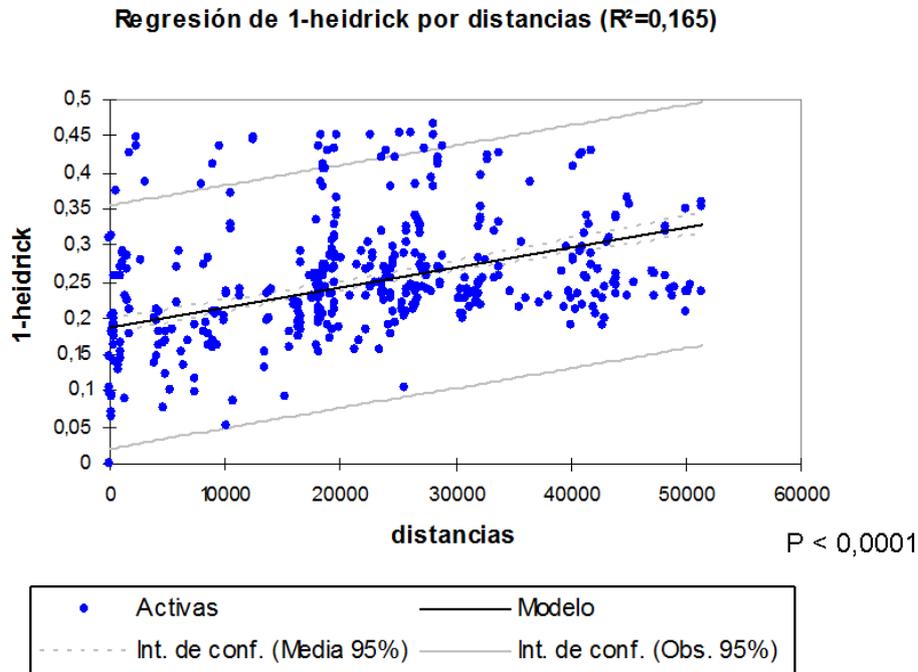


Figura 6.8

DISCUSIÓN

El estudio genético de los núcleos de Ceuta manifiesta que existen dos zonas diferenciadas en cuanto a diversidad genética. Estas zonas se entienden dentro del contexto del estrecho de Gibraltar donde se extiende *Limonium emarginatum*. La relación existente con los núcleos al otro lado del Estrecho nos determina una colonización que ha sabido saltar la barrera natural que constituye el mar que separa ambos continentes. La posible discusión de donde se originó este endemismo no tiene fácil solución. Si atendemos a la variabilidad encontrada en cada una de las zonas estudiadas en el Estrecho, la Isla de las Palomas (Tarifa) presentó tres patrones diferentes y por tanto el núcleo que estableció mayor relación y mostró mayor diversidad genética.

Las relaciones observadas fueron las siguientes:

- Isla de las Palomas con Punta Carnero, Punta Chorlito, Guadalmesí, Punta Camarinal y Ceuta.
- Ceuta con la Isla de las Palomas y el peñón de Gibraltar.
- Punta Camarinal con Punta Chorlito.
- Punta Paloma con Los Lances.

Las vías de migración posibles pueden ser varias: a través del viento, a través del mar o a través de las aves en migración. Los fuertes vientos del Estrecho pueden tener un papel importante en la dispersión de las semillas. Este factor podría explicar las relaciones que encontramos en algunos núcleos. La zona Este del litoral Ceutí podría haberse desarrollado a partir de un núcleo inicial y extendida por la acción de los vientos. Las relaciones de la isla de las Palomas con otros núcleos de la costa europea podría deberse también a este factor. Con respecto al salto del estrecho de Gibraltar, sin menoscabo de otras posibilidades se presenta como viable la dispersión debida a la migración de aves. El estrecho de Gibraltar es uno de los tres pasos de aves de Europa hacia África por donde cientos de miles de aves realizan su travesía dos veces al año. La diferentes rosa de los vientos a ambos lados del Estrecho nos puede llevar a considerar como menos probable a este factor. Una tercera posibilidad sería la debida a las corrientes marinas. Es la más improbable de todas, pero dada la capacidad de dormancia de las semillas en ambientes salinos y la posterior capacidad de germinación con unas condiciones más favorables, este factor debiera tenerse en cuenta.

BIBLIOGRAFÍA

- CURTU, Alexandru-Lucian, Reiner FINKELDEY and Oliver GAILING. (2004) "Comparative Sequencing of a Microsatellite Locus Reveals Size Homoplasmy Within and Between European Oak Species (*Quercus* spp.)" *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 339–346.
- BLAIR M. W.; PANAUD O.; MCCOUCH S. R.; (1999) "Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.)". *Theoretical and Applied Genetics* ISSN 0040-5752 CODEN THAGA6. 1999, vol. 98, n°5, pp. 780-792 (40 ref.)
- ESTOUP A, JARNE P, and CORNUET JM (2002) "Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis". *Mol. Ecol.* 11:1591-1604.
- FIGUEIRA, Glyn-Mara, Ange-Marie RISTERUCCI, Maria Imaculada ZUCCHI, Marcelo MATTOS CAVALLARI and Jean-Louis NOYER. (2009): *Development and characterisation of microsatellite markers for Cordia verbenacea (Boraginaceae), an important medicinal species from the Brazilian coast.* ISSN 1566-0621.
- GONG L., G. STIFT, R. KOFLER, M. PACHNER and T. LELLEY (2008): *Microsatellites for the genus Cucurbita and an SSR-based genetic linkage map of Cucurbita pepo L.*
- MANTEL, N. A. (1967). "The detection of disease clustering and a generalized regression approach". *Cancer Res.*, 27: 209-220
- PALOP ESTEBAN M. Luisa. (2003). *Estudio de la variabilidad genética con marcadores moleculares microsatélites en especie del género Limonium Mill. (plumbaginaceae).* Universidad Valencia.
- PALOP M, PALACIOS C, and GONZALES-CANDELAS F (2000): "Development and across-species transferability of microsatellites markers in the genus *Limonium* (Plumbaginaceae)". *Conserv Genet* 1: 177-179.
- PALOP-ESTEBAN M, SEGARRA-MORAGUES JG, GONZÁLEZ-CANDELAS F (2007): "Historical and biological determinants of genetic diversity in the highly endemic triploid sea lavender *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae)". *Mol. Ecol.* 16:3814–3827. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03449.x
- STEINKELLNER H, FLUCH S, TURETSCHKE E, LEXER C, STREIFF R, KREMER A, BURG K, and GLÖSSL J (1997a) "Identification and characterization of (GA/CT)_n-microsatellite loci from *Quercus petraea*". *Plant Mol Biol* 33: 1093-1096.
- STEINKELLNER H, LEXER C, TURETSCHKE E, and GLÖSSL J (1997b) "Conservation of (GA) microsatellite loci between *Quercus* species". *Mol Ecol* 6: 1189-1194.
- VORNAM B, DECARLI N, and GAILING O. (2004) "Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers". *Conserv Genet* 5: 561-570.