

La relación genética entre Canarias y el “enclave continental Macaronésico” vista a través de la diversidad genética de las especies de *Androcymbium* (Colchicaceae).

Juli Caujapé-Castells¹, Águedo Marrero Rodríguez³, Miguel Angel González-Pérez^{1,2}

¹Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo – Unidad Asociada CSIC. Cabildo de Gran Canaria. Camino del palmeral 15, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

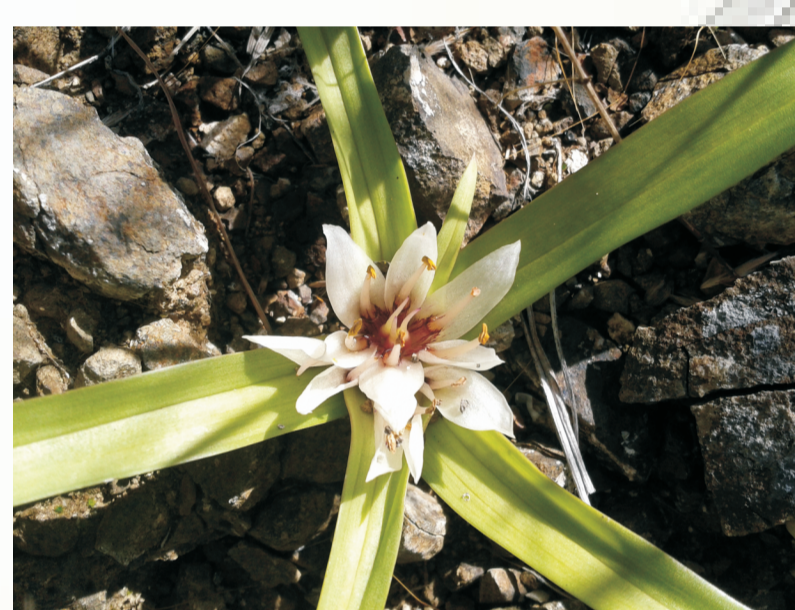
²Banco de Germoplasma. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo – Unidad Asociada CSIC. Cabildo de Gran Canaria. Camino del palmeral 15, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

³Herbario LPA. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo – Unidad Asociada CSIC. Cabildo de Gran Canaria. Camino del palmeral 15, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

INTRODUCCION

La relación entre las Islas Canarias y el llamado “enclave continental Macaronésico” ha sido ampliamente investigada en estudios que han indicado una elevada relación florística y taxonómica entre estas dos regiones. Sin embargo, la comparación de la variación genética entre endemismos insulares y sus congéneres continentales es extremadamente rara, a excepción de algunos casos. Además, la mayoría de las investigaciones se caracterizan por un pobre muestreo, tanto en el número de poblaciones, como en la representatividad de la distribución de los taxones estudiados, o el número de efectivos recolectados. Por lo que carecemos de un indicador adecuado para medir la alta diversidad genética detectada en la flora Canaria. En este sentido el proyecto ENCLAVES desde una perspectiva multidisciplinar pretende ampliar el conocimiento de ambas floras y cuantificar, por vez primera, el nivel y sentido del intercambio de biodiversidad vegetal entre ambas regiones, después de que investigaciones llevadas a cabo en el Jardín Botánico Viera y Clavijo y en otros grupos avalen la tesis de que muchos endemismos de las islas Canarias orientales se hallan más próximos genéticamente a sus congéneres del enclave macaronésico continental que a los de las islas Canarias occidentales. Entre los objetivos del proyecto figuran la estimación cuantitativa del intercambio de biodiversidad vegetal entre Canarias y Marruecos; la evaluación de la posible contribución de la flora canaria a la composición florística del continente africano.

Una de los géneros seleccionados en este proyecto es *Androcymbium*, que presentan tres taxones endémicos de las islas Canarias (*A. psammophilum* Svett., *A. hierrense* A. Santos subsp. *hierrense* y *A. hierrense* A. Santos subsp. *macrospermum* Reifent) y dos especies en el “enclave continental Macaronésico” (*A. gramineum* (Cav.) Macbride y *A. wyssianum* Beauverd & Turrett)



A. hierrense A. Santos



A. psammophilum Svett.



A. gramineum (Cav.) Macbride

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

254 individuos pertenecientes a 14 localidades de *Androcymbium psammophilum*, *A. hierrense* subsp. *hierrense*, *A. hierrense* subsp. *macrospermum* y *A. gramineum* fueron muestreadas en las islas Canarias y en el “enclave continental Macaronésico” y mantenidas en gel de sílice hasta la extracción del ADN (Tabla 1).

Microsatélites

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo modificado de 2xCTAB (Doyle & Doyle, 1987) y la subsiguiente purificación se realizó con un Kit comercial (Gene Elute PCR Clean Up Kit - SIGMA). Se aislaron y caracterizaron 15 microsatélites, de los cuales 10 generaron productos de amplificación polimórficos y fueron seleccionados para el posterior análisis. Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos en los que se cargaron 20ng de ADN, 0.40 μM *dye-labelled M13 primer*, 0.25 μM *tailed-reverse primer*, 0.034 μM *M13 tailed-forward primer*, así como 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa, 2 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, y 0.2 mM de cada dNTP. Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando el siguiente ciclo de temperaturas: desnaturalización a 94°C (2’), seguido de 17 ciclos de amplificación: desnaturalización a 92°C (30’), hibridación a la temperatura de anillamiento del *primer* (disminuyendo 1°C en cada ciclo) (30’’) y elongación a 72°C (30’); a continuación 25 ciclos de amplificación: 92°C (30’), 44°C (30’’) y 72°C (30’), y un periodo de extensión final a 72°C (5’).

Los productos de PCR fueron detectados utilizando un secuenciador ABI 3130XL, y el tamaño de los fragmentos fue determinado usando el programa GENEMAPER v 4.0 (Applied Biosystems, Inc.), que permitió identificar el perfil de picos de alelos de cada locus y asignar un genotipo a cada individuo considerando su naturaleza diploide.

Análisis de datos

La matriz genotípica fue introducida en el software Transformer-4 v. 2.0.2 (Caujapé-Castells et al., 2013) que permite exportar datos a diferentes programas de análisis de datos genéticos. Los índices de diversidad (*A*, *AE*, *Ho* y *He*) y diferenciación genética (*F_{st}*) así como el Análisis de Componentes Principales fueron realizados en el programa GENEALX 6.5 (Peakall and Smouse, 2006). Un dendrograma UPGMA a partir de 100 matrices basado en la distancia genética de Nei (1978), generadas con el programa MSAT (Dieringer and Schlötterer 2003), fue construido utilizando el software PHYLIP v3.6 (Felsenstein 2005).

Se realizó un análisis de agrupamiento Bayesiano mediante el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), asumiendo un modelo de mezcla y frecuencias alélicas independientes. El valor más probable de poblaciones inferidas para el conjunto de los datos (254 individuos, 10 loci, 14 poblaciones) fue de 3 (K=3).

Especie	Población	N	A	AE	H _o	H _e
<i>A. hierrense</i> A. Santos	Don Pedro	23.33	2.50	0	0.12	0.28
	Los Morenos	32.50	2.83	1	0.08	0.26
	Montaña Laguna	8.67	2.00	0	0.21	0.24
	Media	98.00	2.06	3	0.12	0.20
<i>A. psammophilum</i> Svett.	Corralejo	10.33	1.83	0	0.19	0.21
	Cotillo	7.17	2.67	1	0.32	0.33
	Lajares	24.83	1.83	0	0.23	0.18
	Media	58.83	2.19	1	0.24	0.30
<i>A. gramineum</i> (Cav.) Macbride	Agadir	9.17	4.00	5	0.42	0.54
	Boujdour	12.83	3.33	2	0.42	0.40
	Media	22.00	3.67	8	0.42	0.47

Tabla 1. Relación de poblaciones analizadas y diversidad genética detectada. N: tamaño de la muestra, A: número medio de alelos por locus, AE: número de alelos exclusivos, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los índices de diversidad genética muestran una menor variabilidad en las especies insulares que en su congénere continental, siendo en general esta diversidad baja en relación con otros endemismos insulares canarios.

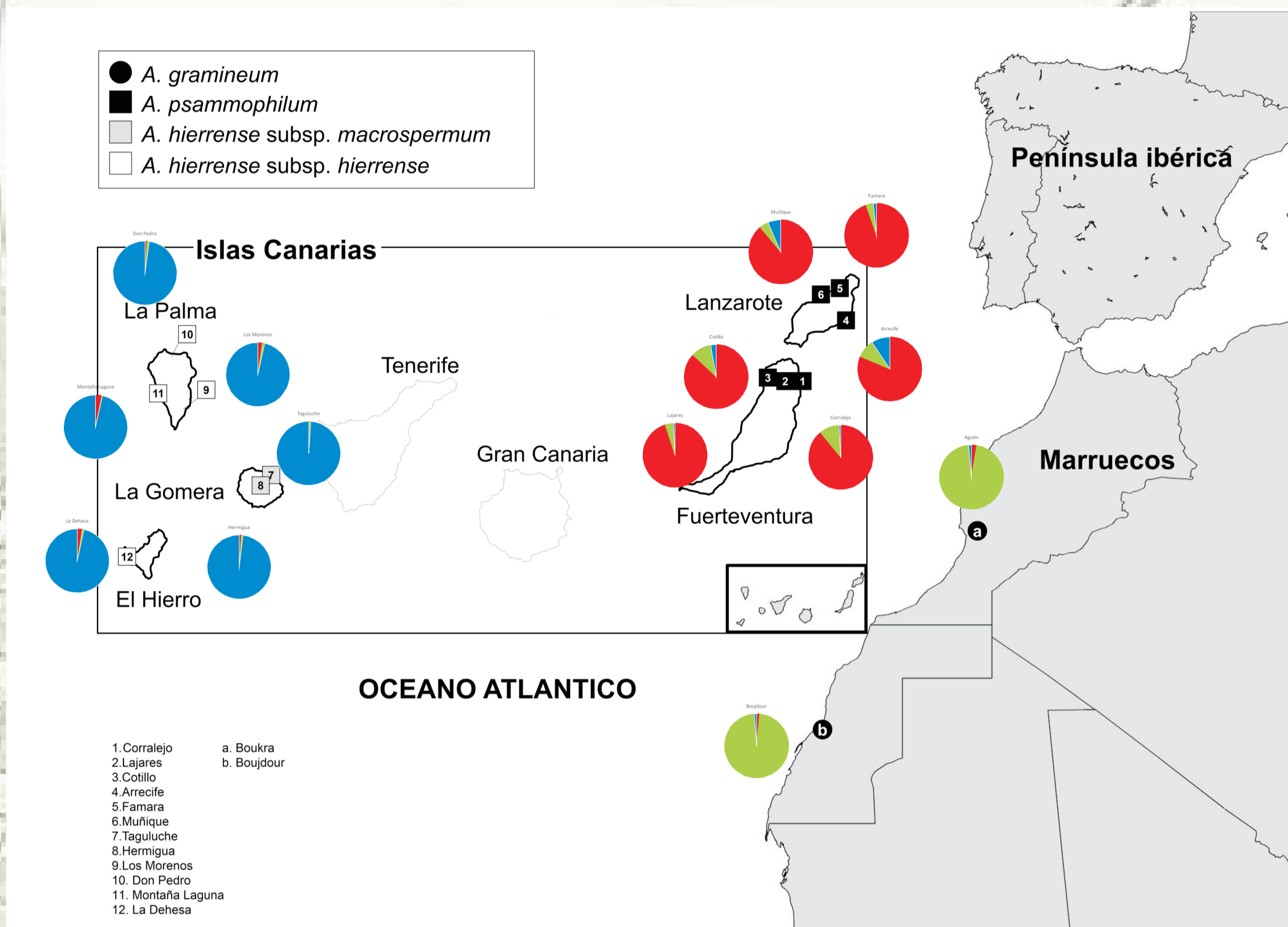


Figura 1. Localización y asignación genética a los grupos (K=3) inferidos por el análisis bayesiano, de las poblaciones de *Androcymbium* analizadas.

El análisis de agrupamiento bayesiano (Fig. 1), el análisis de componentes principales (Fig. 2) y el dendrograma UPGMA (Fig. 3) muestra una relación más estrecha entre el endemismo de las islas orientales (*A. psammophilum*) y su congénere continental (*A. gramineum*), que entre el primero y el endemismo de las islas occidentales (*A. hierrense*). Así mismo los datos genéticos muestran una diferencia significativa en la estructura de la variabilidad genética entre las poblaciones de las islas occidentales y orientales. En este sentido, la diferenciación genética (*F_{st}*) entre las poblaciones de las islas orientales es mucho menor que la que se detecta entre las poblaciones de las islas occidentales (Tabla 2). Las barreras geográficas que presentan las islas occidentales actúan incrementando la diferenciación genética, mientras que en las islas orientales la inexistencia de accidentes montañosos significativos se traduce en una escasa diferenciación genética en las poblaciones actuales.

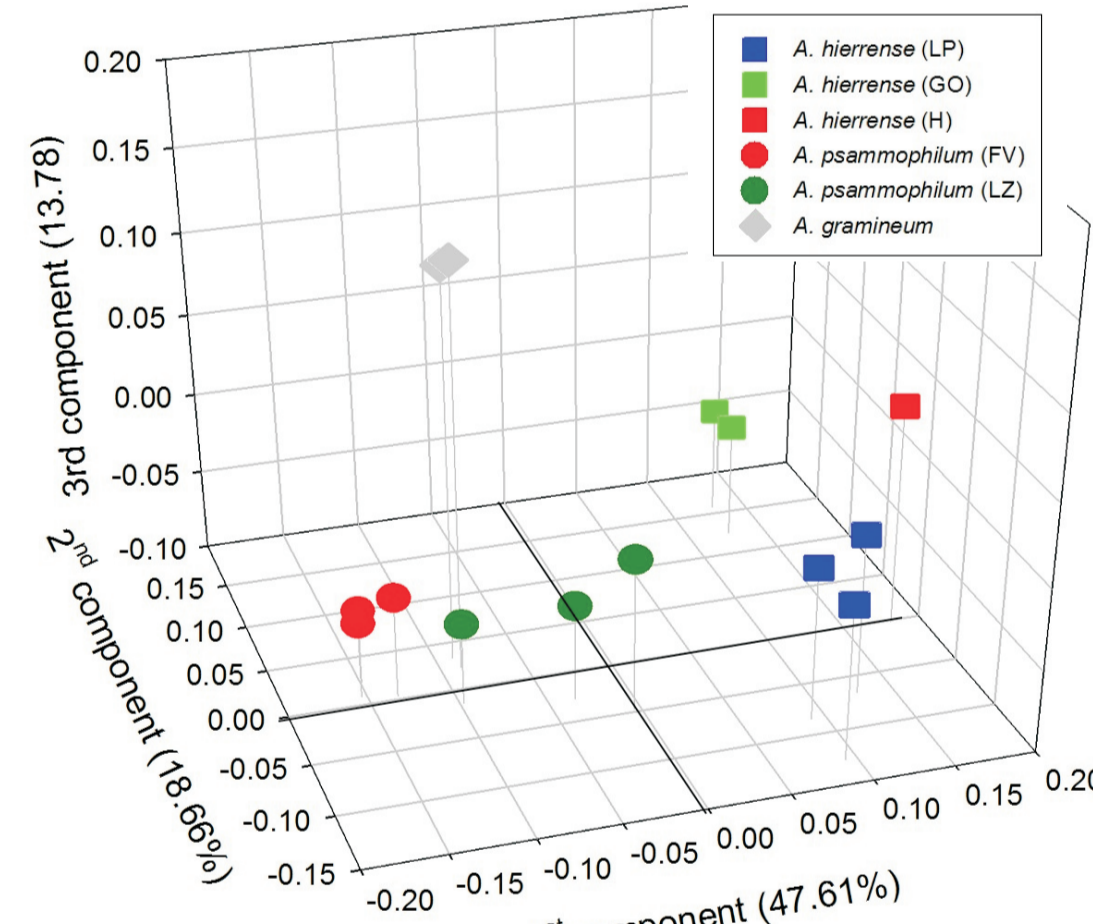


Figura 2. Análisis de componentes principales basado en las frecuencias alélicas obtenidas con 10 loci microsatélites nucleares en 14 poblaciones naturales de *Androcymbium*.

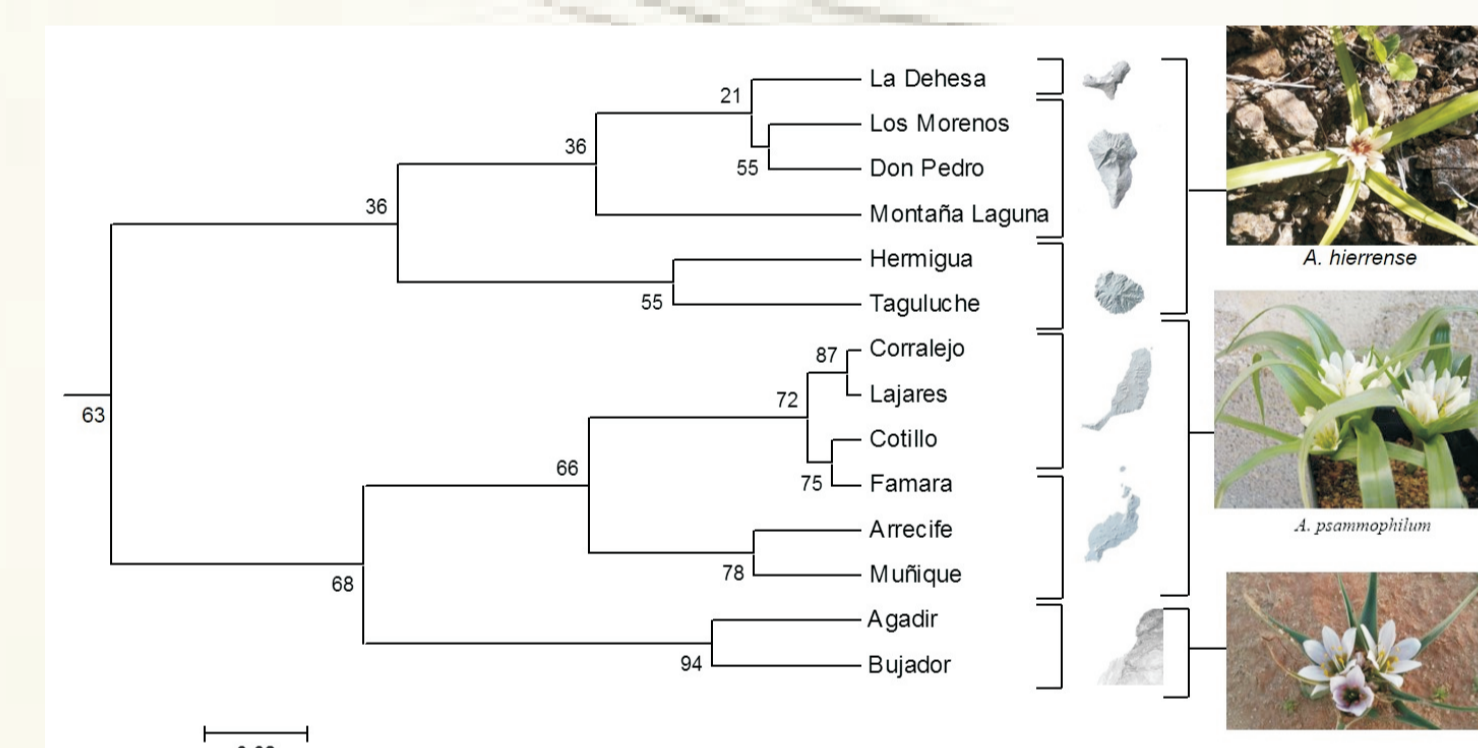


Figura 3. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética (Nei, 1978), incluyendo valores de bootstap, de las poblaciones de *Androcymbium* analizadas.

	<i>A. hierrense</i>				<i>A. psammophilum</i>				<i>A. gramineum</i>	
	La Palma	La Gomera	El Hierro	Fuerteventura	Lanzarote	continental enclave				
Don Pedro	0.000									
Los Morenos	0.064	0.000								
Montaña Laguna	0.147	0.182	0.000							
Hermigua	0.202	0.215	0.330	0.000						
Taguluche	0.248	0.304	0.351	0.109	0.000					
La Dehesa	0.099	0.172	0.333	0.184	0.301	0.000				
Corralejo	0.329	0.324	0.422	0.391	0.451	0.472	0.000			
Cotillo	0.277	0.248	0.340	0.321	0.379	0.471	0.046	0.000		
Lajares	0.360	0.295	0.384	0.351	0.411	0.488	0.024	0.036	0.000	
Arrecife	0.167	0.134	0.176	0.219	0.265	0.302	0.118	0.065	0.121	0.000
Famara	0.244	0.204	0.286	0.297	0.350	0.354	0.051	0.020	0.048	0.039
Muñique	0.126	0.091	0.192	0.220	0.288	0.254	0.166	0.110	0.173	0.047
Agadir	0.305	0.293	0.347	0.357	0.390	0.413	0.197	0.152	0.190	0.182
Boujdour	0.324	0.285	0.366	0.335	0.384	0.396	0.195	0.138	0.177	0.164

Tabla 2. Coeficiente de diferenciación genética (*F_{st}*) entre pares de poblaciones de *Androcymbium* analizadas. Se muestra el valor medio de *F_{st}* entre las poblaciones dentro de cada isla.

CONCLUSIONES

Androcymbium psammophilum parece estar genéticamente más relacionada con sus congéneres continentales (*A. gramineum*) que con los taxones de las islas occidentales (*A. hierrense*)

Las barreras geográficas que presentan las islas occidentales actúan incrementando la diferenciación genética, mientras que en las islas orientales la inexistencia de accidentes montañosos significativos se traduce en una escasa diferenciación genética en las poblaciones actuales

Los análisis genéticos muestran una clara diferenciación entre las dos subespecies de *Androcymbium hierrense*

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Programa de Cooperación Transnacional Madeiras-Azores-Canarias (PCT-MAC 2007/2013) dentro del proyecto ENCLAVES (MAC/3/C141)

REFERENCIAS

- Caujapé-Castells J, Sabbagh I, Castellano JEJ, Ramos R, Henriquez V, Quintana JM, Medina DA, Toledo J, Ramirez F and Rodriguez JF (2013) Transformer-4 version 2.0.1, a free multi-platform software to quickly reformat genotype matrices of any marker type, and archive them in the Demiurge information system. Mol Ecol Notes 13: 484–493.
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Mol Ecol Notes 3:167–169
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19: 11–15.
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (phylogeny inference package) versión 3.6. Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288–295.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure from multilocus genotype data. Genetics 155:945–959