

Estudi de la diversitat genètica de
la població natural del *Limonium*
barceloi de ses Fontanelles utilitzant
marcadors d'ADN nuclear i d'ADN
cloroplàstic

Josep A. Rosselló
Jardí Botànic
Universitat de València
C/Quart 80
46008 València

Índex

	pàgina
1. Introducció	3
2. Objectius	3
3. Material i Mètodes	5
3.1 Material	5
3.2 Mètodes	5
3.2.1. Determinació del nombre de cromosomes	5
3.2.2. Hibridació fluorescent in situ (FISH)	6
3.2.3 Protocols d'extracció d'ADN genòmic	7
3.2.4 Els espaiadors ribosomals ITS	8
3.2.4.1 Condicions experimentals	8
4. Resultats	11
4.1 Nombre de cromosomes	11
4.2 Morfologia dels cromosomes	11
4.3 Distribució dels gens ribosomals 45S i 5S als cromosomes	12
4.4 Seqüències dels espaiadors ITS nuclears	14
4.4 Seqüències dels espaiadors trnT-trnL de l'ADN cloroplàstic	15
5. Conclusions	18

1. Introducció

La Conselleria de Medi Ambient de les Illes Balears, a través de la direcció general de Medi Forestal i Protecció d'Espècies, desenvolupa funcions de conservació de les espècies silvestres protegides. Actualment està desenvolupant una sèrie de plans de recuperació i conservació de espècies vegetals amenaçades, on es preveuen, entre les seves principals activitats, accions *ex-situ*. Concretament i dins el Pla de recuperació del *Limonium barceloi*

Fruit d'una assistència tècnica contractada per la Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears i desenvolupada pel Jardí Botànic de la Universitat de València s'ha procedit a efectuar una recerca encaminada a confirmar la identitat taxonòmica de la població de la saladina *L. barceloi* Gil & L. Llorens present als restes de salobrar de Ses Fontanelles. Aquesta espècie és considerada com a endemisme de Mallorca i sols ha estat coneguda històricament d'aquest indret.

2. Objectius

Els objectius de la present recerca és determinar la identitat de *L. barceloi* mitjançant aproximacions metodològiques resolutives que permetin confirmar o rebutjar inequívocament la hipòtesi de partida de que els exemplars presents actualment a Ses Fontanelles pertanyen a n'aquesta

espècie. Un dels caràcters més distintius de l'espècie és la seva dotació cromosòmica, tetraploide amb $2n=36$ cromosomes, fet que la distingeix de tota la resta de saladines analitzades fins ara de Mallorca, i que únicament s'ha observat a *L. grosii*. Una segona aproximació és la de les seqüències de l'ADN cloroplàstic, que han estat determinades per a totes les espècies del gènere a Balears i de les que es té una base de dades prou completa per a la seva comparació.

S'ha utilitzat, doncs una quàdruple aproximació metodològica:

(i) Determinació del nombre de cromosomes i observació morfològica dels mateixos

(ii) Ubicació en els cromosomes dels gens ribosomals 45S i 5S mitjançant tècniques d'hibridació fluorescent *in situ* (FISH)

(iii) Anàlisi de les seqüències de l'ADN cloroplàstic, en concret de la regió trnT-trnL.

(iv) Determinació de les seqüències ribosomals nuclears ITS.

3. Material i mètodes

3.1 Material

El material va ser recollit conjuntament amb la Dra. Eva Moragues i Deborah Morrison, la qual va permetre l'accés a les poblacions objecte d'estudi i situades dins de Palma Aquarium. Les saladines varen ser comparades amb material provinent de les col·leccions vives o llavors mantingudes al Jardí Botànic de València i que es corresponen amb material obtingut abans de la transformació de bona part de l'hàbitat i de la construcció del centre.

3.2 Mètodes

3.2.1 Determinació del nombre de cromosomes

Germinació de les llavors

Les llavors varen ser germinades en agar sòlid en plaques Petri a temperatura constant de 20 °C i amb 12 hores diàries de llum blanca. També s'utilitzaren plantes vives conreades en tests al Jardí Botànic de la Universitat de València.

Preparacions cromosòmiques i anàlisi cariotípic

Els àpex de les arrels joves i blanquinoses es varen tractar amb una solució aquosa 0,002 M de 8-hydroxyquinoline durant 2 h a 4 °C i 2 h a

temperatura ambient, després es rentaren amb aigua destil·lada, es fixaren en una solució Carnoy (etanol absolut: àcid acètic glacial; 3:1 v/v) al menys 24 hores i finalment s'emmagatzemaren en etanol al 70% a 4 °C fins al seu processat posterior.

Per als recomptes dels cromosomes i la determinació del cariotip, les arrels varen ser hidrolitzades durant 5 minuts en 1 M HCl a 60 °C, es rentaren amb aigua destil·lada i es tenyiren en orceïna acètica entre 4-6 hores. El squash es va fer en una gota d'àcid acètic al 45% i les preparacions permanents es muntaren en bàlsam del Canadà. Les fotografies de les metafases es prengueren amb una càmera digital Olimp Camedia C-2000-Z i es mesuraren els cromosomes de, al menys, cinc plaques metafàsiques. Per a cada placa, les llargàries dels braços curt (S) i llargs (L) varen ser expressades en valors relatius (% de = 100 del conjunt de cromosomes haploide). Per a descriure la posició dels centròmers, es va seguir la nomenclatura de Levan, Fredga & Sandberg (1964).

3.2.2 Hibridació fluorescent in situ (FISH)

Les dues famílies multigèniques de rDNA varen ser localitzades amb dues diferents sondes d'ADN (el clon pTa71, que és un fragment de 9 kb *EcoRI* que té els gens i l'espaiador intergenic 18S -5.8S- 26S rDNA obtinguts de *Triticum aestivum*; i el clon pTa794, que conté un fragment de 410bp *BamHI* del gen 5S rDNA i l'espaiador intergenic obtinguts de *Triticum*

aestivum. Les sondes pTa71 i pTa794 varen ser marcades amb digoxigenin-11dUTP o biotin-11-dUTP. Les preparacions cromosòmiques es guardaren a 37°C tot el vespre i s'incubaren en RNase A (1µg/ml) en 2X SSC durant 1 hora a 37°C. Després, es rentaren tres vegades durant 5 min en 2X SSC, es fixaren en 4% paraformaldehyde en 1X SSC durant 10 min a temperatura ambient, es rentaren tres vegades 5 min en 2X SSC, i posteriorment es deshidrataren en etanol i secaren a l'aire. La hibridació in situ es va dur a terme tot el vespre a 37°C en una cambra humida. Les sondes marcades amb Digoxigenina es detectaren amb anticossos anti-digoxigenina conjugats a fluorescein isothiocyanate (Roche). Les sondes marcades amb biotina es detectaren amb streptavidina conjugats amb Texas Red (Vector Laboratories).

3.2.3 Protocol d'extracció de l'ADN genòmic

Es va procedir a la conservació del material vegetal recol·lectat i posteriorment dessecat emmagatzemant les mostres en ultracongeladors a -80°C. A fi d'obtenir ADN pur i d'alta qualitat les mostres s'extragueren i purificaren amb columnes de resines (Qiagen), el qual s'explica a continuació:

1. Pesar uns 50 mg de teixit sec
2. Triturar el material en un morter amb 400 µl de AP1 i 4 µl de RNase A
3. Transferir homogenitzat a un tub de microcentrifuga de 1.5 ml
4. Agitar breument en un vòrtex

5. Incubar a 65°C durant 10 minuts. Durant el procés se mescla per inversió 2 -3 vegades
6. Afegir 130 µl de AP2, mesclar el contingut i incubar durant 5 minuts en gel
7. Col·locar en el tub lila subministrat el contingut del tub i centrifugar durant 2 minuts a 13000 rpm
8. Transferir la fase inferior a un nou tub
9. Afegir 1.5 del volum recuperat de AP3 i mesclar
10. Afegir como a màxim 650 µl a la columna blanca subministrada, centrifugar durant un 1 minut a 8000 rpm i descartar la fase inferior
11. Repetir el pas 10 fins acabar tot el volum
12. Ubicar la columna sobre un tub de recol·lecció i afegir 500 µl de Buffer AW; centrifugar durant 1 minut a 8000 rpm. Descartar la fase inferior
13. Nou afegiment de 500 µl de AW i centrifugació 2 minuts a 13000 rpm
14. Eixugar a temperatura ambient durant 5 minuts
15. Transferència de la columna a un tub nou i adició de 50 µl de Buffer AE (prèviament encalientit a 65°C) directament a la membrana. Incubació durant 5 minuts i centrifugació 1 minut a 8000 rpm
16. Retirada de la columna i tancament del tub

Els ADN que varen ser purificats amb les columnes Qiagen es conservaren a -20°C fins a la seva utilització.

3.2.4 Els espaiadors ribosomals ITS

Els ribosomes son els orgànuls encarregats de la síntesis de proteïnes en el citoplasma cel·lular, en el que l'ARN missatger es traduït a una seqüència d'aminoàcids. Els ribosomes, presents en tots els organismes vius,

estan constituïts per proteïnes i àcids nuclèics (ARN). Aquest ARN és l'anomenat ARN ribosomal, el qual procedeix de la transcripció de la unitat ribosomal 45S. Els ADN ribosomals se troben codificats per unitats de entre 5-12 kilobases (kb), que se troben repetides en tàndem i presenten milers de còpies en cada nucli. Això fa que sigui factible estudiar aquesta regió del genoma quan es disposa d'escadusser material, com es el cas d'espècies rares o amenaçades.

En cada unitat de transcripció apareixen tres gens que codifiquen per a las tres subunitats d' ARN que formaran part dels ribosomes madurs: el gen 18S, el 5.8S i el 25S. Aquests tres gens es troben molt conservats en el si de les espècies, per el que son pràcticament de nul·la utilitat a l'hora d'avaluar els nivells de divergència genètica intraespecífica. En contrast, aquests gens, se troben separats per dos espaiadors intergenics, que son co-transcrits i posteriorment eliminats durant el procés de maduració dels ARN missatgers. Tals espaiadors, ITS-1 i ITS-2 (Internal Transcribed Spacer), solen presentar seqüències d'ADN que són específiques d'espècies o d'unitats evolutives.

3.2.4.1 Condicions experimentals

L'amplificació dels dos espaiadors ITS nuclears se realitzà amb primers universals (ITS1, ITS4) i se va procedir a optimitzar les reaccions

d'amplificació en un termociclador en gradient (Icycler, BioRad) junt a la utilització d'un Kit de optimització de PCR (Roche).

Les millors condicions d'amplificació (realitzades en volums de 50 µl i que tenien 75 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 5 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.0001% BSA, 1.5 mM MgCl₂, 5% DMSO, 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP i dTTP, 10 µM de cada cebador, aproximadament tres microlitres d'una dilució 1: 10 de l'ADN genòmic i 1 unitat de *Taq* polimerasa) s'obtingueren amb el següent programa:

- 1) Desnaturalització inicial a 94°C durant 5 minuts
- 2) 35 cicles de 30 segons a 94°C,
30 segons a 57°C
60 segons a 72°C
- 3) Extensió final a 72°C durant 8 minuts

Els productes de PCR obtinguts se fraccionaren en gels d'agarosa al 1.0% en tampó TBE i se purificaren amb Agarase (Roche Diagnostics), Kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics), o columnes Millipore Ultrafree-DA. Per a seqüenciar, els productes de PCR o clonats se incorporaren al BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) utilitzant els cebadors d'amplificació. En total s'ha conseguit seqüenciar 700 parells de bases (bp) , que inclouen l'espaiador ITS-1, el gen 5.8S, i l'espaiador ITS-2.

4. Resultats

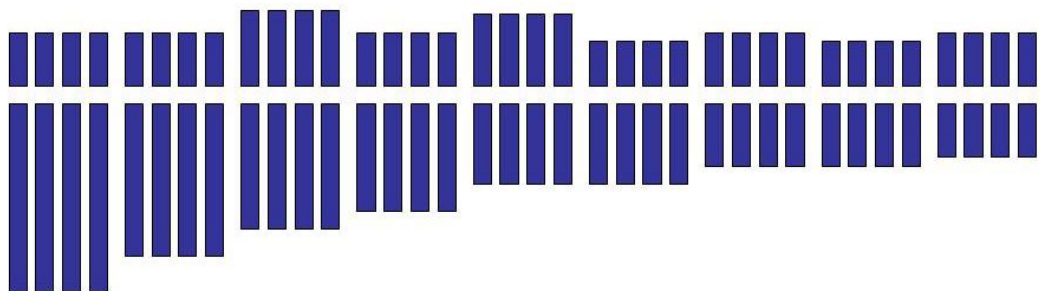
4.1 Nombre de cromosomes

Els nombres cromosòmics obtinguts de totes les plantes analitzades provinents dels individus de Ses Fontanelles varen ser uniformes i iguals a $2n=36$, nombre que correspon al nivell tetraploide i que havia estat previamente determinat als individus provinents de la població original de *L. barceloi*. Cap espècie de saladina de Balears presenta aquest singular nombre cromosòmic.

4.2 Morfologia dels cromosomes

Les anàlisi de la morfologia dels cromosomes i la ordenació del seu cariotip han posat de manifest l'existència d'un sols tipus de dotacions cromosòmiques, múltiples del nombre cromosòmic bàsic $x=9$. Aquesta característica dels seus cromosomes sols es presenta a Mallorca a *L. antoni-llorensi*, i *L. fontqueri*, els quals presenten un nivell triploide amb $2n=27$.

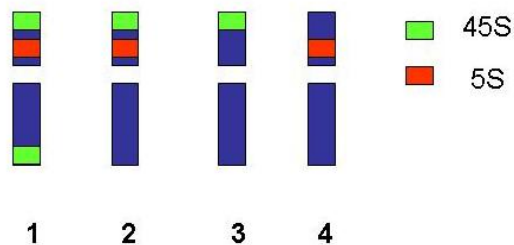
Figura 1. Idiograma de *L. barceloi*. S'observen $2n=36$ cromosomes, els quals es troben ordenats en nou grups de 4 cromosomes, reflexe del nombre bàsic $x=9$.



4.3 Distribució dels gens ribosomals 45S i 5S als cromosomes somàtics

La ubicació física als cromosomes dels gens ribosomals permet un anàlisi encara molt més acurat de quines són les semblances i divergències entre les espècies en base a la seva disposició dins el genoma.

Les anàlisis citogenètiques de totes les espècies de *Limonium* de balears han posat de manifest l'existència de quatre tipus de ubicació dels gens als cromosomes:



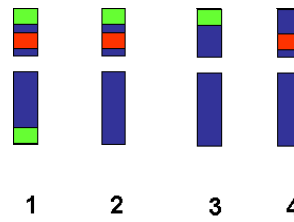
El tipus de cromosoma 1 porta dues ubicacions dels gens 45S (als extrems dels braços dels cromosomes) i una dels gens 5S.

El tipus de cromosoma 2 es semblant a l'anterior, però manca la senyal del 45S present al braç llarg del cromosoma.

El tipus de cromosoma 3 sols presenta una senyal 45S al braç curt.

Finalment, el tipus de cromosoma 4 sols presenta un lloc dels gens 5S.

Els resultats obtinguts pel que fa al nombre de cromosomes que presenten cada una d'aquestes configuracions a *L. barceloi* posa de manifest la presència de dos cromosomes del tipus 2, dos cromosomes del tipus 3 i 2 cromosomes del tipus 4. Aquesta configuració és única entre les espècies de Mallorca i sols s'ha observat a *L. grosii*, endemisme d'Eivissa i Formentera, que presenta una morfologia força diferent a *L. barceloi*.



	2n				
Diploids					
<i>L. cossonianum</i>	16	-	2	1	1
<i>L. minutum</i>	18	-	2	2	-
Triploids					
<i>L. ejulabilis</i>	24	-	3	2	1
<i>L. wiedmannii</i>	24	-	3	2	1
<i>L. biflorum</i>	25	-	3	2	1
<i>L. formenterae</i>	25	-	2	2	3
<i>L. migjornense</i>	25		3	2	1
<i>L. alcudianum</i>	26	1	2	3	-
<i>L. bonafei</i>	26	1	1	3	-
<i>L. camposanum</i>	26	1	2	3	-
<i>L. carvalhoi</i>	26	-	3	1	2
<i>L. companyonis</i>	26	-	1	4	2
<i>L. gibertii</i>	26	-	3	3	1
<i>L. inexpectans</i>	26		3	3	2
<i>L. leonardi-llorensii</i>	26	1	2	3	1
<i>L. magallufianum</i>	26	1	2	3	1
<i>L. antoni-llorensi</i>	27	1	1	2	2
<i>L. gymnesicum</i>	27	1	2	3	-
<i>L. marisolii</i>	27		1	2	1
<i>L. pseudodictyocladon</i>	27	-	-	2	2
<i>L. virgatum</i>	27	-	1	2	2
<i>L. fontquerii</i>	27	1	2	1	
Tetraploids					
<i>L. boirae</i>	35	2	2	2	1
<i>L. barceloi</i>	36	-	2	2	2
<i>L. grosii</i>	36	-	2	2	2

Taula 1. Distribució dels diferents tipus de cromosomes marcadors a *L. barceloi* i a altres espècies del gènere a Balears.

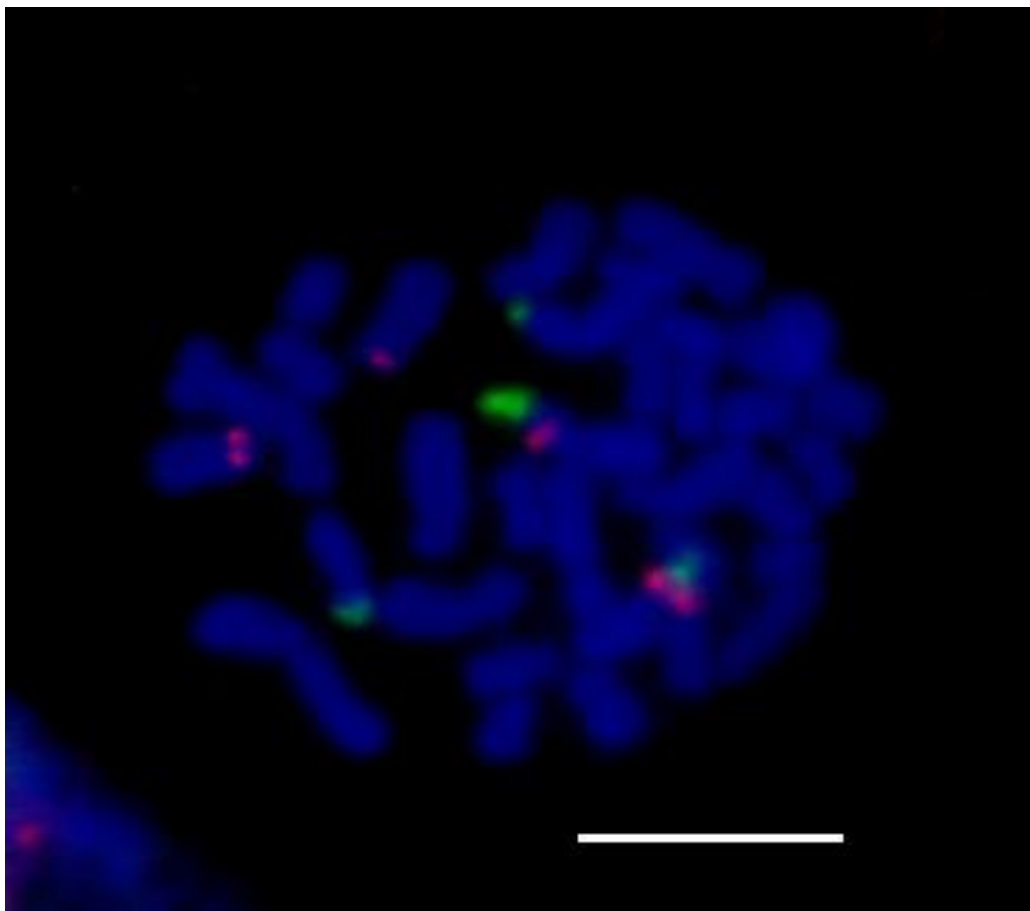


Figura 2. Metafase somàtica de *L. barceloi*. S'observen sis cromosomes amb fluorescència verda (gens 45S) i vermella (gens 5S), que corresponen als cromosomes marcadors 2, 3 i 4 descrits al text i a la taula 1.

4.4 Seqüències dels espaiadors ITS nuclears del ADN ribosomal 45S

En un inform previ es va posar de manifest que la seqüenciació directa de bona part de les espècies de *Limonium* de Balears indicava l'existència de al menys dos tipus de seqüències que procedien de les espècies que tenien *L. cossonianum* ($x=8$) i *L. minutum* ($x=9$) als seus genomes.

Els resultats obtinguts amb les noves mostres de *L. barceloi* són idèntics als trobats prèviament i posen de manifest la presència dels

genomes de *L. cossonianum* i *L. minutum* en l'origen de *L. barceloi*, com queda reflexat a la taula següent.

<u>Nivell de Ploidia</u>	<u>Espècie</u>	<u>Tipus seqüència</u>	
		<i>Cossonianum</i>	<i>Minutum</i>
Diploids			
	<i>L. cossonianum</i>	X	-
	<i>L. minutum</i>	-	X
Triploids			
	<i>L. ejulabilis</i>	X	-
	<i>L. wiedmannii</i>	X	-
	<i>L. biflorum</i>	X	X
	<i>L. formenterae</i>	X	X
	<i>L. migjornense</i>	X	X
	<i>L. alcudianum</i>	-	X
	<i>L. bonafei</i>	-	X
	<i>L. camposanum</i>	-	X
	<i>L. carvalhoi</i>	X	X
	<i>L. gibertii</i>	X	X
	<i>L. inexpectans</i>	X	X
	<i>L. leonardi-llorensi</i>	X	X
	<i>L. magallufianum</i>	X	X
	<i>L. antoni-llorensi</i>	X	X
	<i>L. gymnesicum</i>	-	X
	<i>L. marisoliai</i>	X	X
	<i>L. pseudodictyocladon</i>	-	X
	<i>L. fontquerii</i>	-	X
Tetraploids			
	<i>L. boirae</i>	X	X
	<i>L. barceloi</i>	X	X
	<i>L. grosii</i>	X	X

4.4 Seqüències dels espaiadors trnT-trnL de l'ADN cloroplàstic

La comparació de les seqüències de l'ADN cloroplàstic obtingudes en els individus de *L. barceloi* mostrejats en 2009 són idèntiques entre si i no posen de manifest cap variabilitat. Aquestes seqüències són iguals a les mostres analitzades de *L. barceloi* de la població original, i es mostren a continuació.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              5           15           25           35           45
Original    GTTTTACATC CATATT---- ---AAATAAA TTTTTT--AAA A-----TA
2009        GTTTTACATC CATATT---- ---AAATAAA TTTTTT-AAA A-----TA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              55          65          75          85          95
Original    TATCTTAGA- -----T TTGAACTATT
2009        TATCTTAGA- -----T TTGAACTATT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              105         115         125         135         145
Original    AATAAACGAA TAGGTCAAAT GAAATCGATT TCAAATCCAT AGTGAAAAAA
2009        AATAAACGAA TAGTTCAAAT GAAATCGATT TCAAATCCAT AGTGAAAAAA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              155         165         175         185         195
Original    AAA-----TT ATTTTTTATAC ATTATATATA TGAAATATAT CTATACTTTC
2009        AAA-----TT ATTTTTTATAC ATTATATATA TGAAATATAT CTATACTTTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              205         215         225         235         245
Original    AAATTCGAAT TTTTTTTTTT- AATTATTAGT ATTCAATACT AGATTAGATT
2009        AAATTCGAAT TTTTTTTTTT- AATTATTAGT ATTCAATACT AGATTAGATT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              255         265         275         285         295
Original    TGTATTAGAT TTTCAATTTT TTGAGTTTGT ATAATCTTTT GAATATAGAT
2009        TGTATTAGAT TTTCAATTTT TTGAGTTTGT ATAATCTTTT GAATATAGAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              305         315         325         335         345
Original    TTTCTAAAAT CTATATATAT ATATATAT-- --TCAATTAT TAGTTC TAGC
2009        TTTCTAAAAT CTATATATAT ATATATAT-- --TCAATTAT TAGTTC TAGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              355         365         375         385         395
Original    CCAACAATAT ATATTTAATA GACAAAAAAT AGATTATGAA ATTCATTA
2009        CCAACAATAT ATATTTAATA GACAAAAAAT AGATTATGAA ATTCATTA

```



```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          405          415          425          435          445
Original  TAATGAATTT CGATTTTAGT TATAGGAATC TACCTTAAGA AAAAAATAGA
2009      TAATGAATTT CGATTTTAGT TATAGGAATC TACCTTAAGA AAAAAATAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          455          465          475          485          495
Original  AAGAAATGGTA T----- TAATATAAAA ATAGAATATT CATATAGATA
2009      AAGAAATGGTA T----- TAATATAAAA ATAGAATATT CATATAGATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          505          515          525          535          545
Original  TTATGCTTTG ATTCTGAAGAC TAGAACGAAA AAAAAA-GAA AAGAATCGAC
2009      TTATGCTTTG ATTCTGAAGAC TAGAACGAAA AAAAAA-GAA AAGAATCGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          555          565          575          585          595
Original  CTTTTAAGTA TTCAAAATTA CATAGGAAAA AAAAAGAAAA GGGATCGTAT
2009      CTTTTAAGTA TTCAAAATTA CATAGGAAAA AAAAAGAAAA GGGATCGTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          605          615          625          635          645
Original  ATATGGTGGT ATATATTTAT ATTGAATTGA AGAGAAAAAA ATATATAGAA
2009      ATATGGTGGT ATATATTTAT ATTGAATTGA AGAGAAAAAA ATATATAGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          655          665          675          685          695
Original  TTAGTTGTGA TTGGCCATA TCAAAAATGA ACTCCTAGTA GAGATGAAAG
2009      TTAGTTGTGA TTGGCCATA TCAAAAATGA ACTCCTAGTA GAGATGAAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          705          715          725          735          745
Original  AAAC TAGACA AATAAATAAG CTCCTTTCGG TATATGAATT GGTATCGAAT
2009      AAAC TAGACA AATAAATAAG CTCCTTTCGG TATATGAATT GGTATCGAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|...
          755          765          775          785          795
Original  CAATTCAACG ATTTGAGGAT AATCAAAAAA GAAATAACTA AGGAAGA
2009      CAATTCAACG ATTTGAGGAT AATCAAAAAA GAAATAACTA AGGAAGA

```

5. Conclusions

Les observacions morfològiques realitzades in situ, i les quatre evidències independents genètiques i moleculars realitzades amb el present estudi posen de manifest i sense cap dubte que la població de Ses Fontanelles ubicada dins els restes de salobrar i dins dels terrenys custodiats per Palma Aquarium son uniformes genèticament i concorden en tots els seus extrems amb el material de *L. barceloi* que es disposa per comparació i que s'havia recol·lectat a Ses Fontanelles abans de la darrera transformació del seu hàbitat.

Aquesta uniformitat i concordància del material no suposa, doncs, cap obstacle per a la realització d'aquelles actuacions in situ que es consideren més convenientes per al seu Pla de Recuperació. Encara que no s'han detectat mai hibridacions a Ses Fontanelles amb *L. virgatum*, i donat que aquesta espècie intervé en hibridacions interespecífiques amb nombroses espècies de *Limonium* a totes les Balears, seria convenient el control de la mateixa, si encara hi és present, o la seva reubicació lluny dels indrets de màxima cobertura de *L. barceloi*.