

**Estudi genètic de la població  
menorquina de *Rhamnus ludovici-  
salvatoris***

Josep A. Rosselló

Jardí Botànic  
Universitat de València  
C/Quart 80  
46008 València

# Índex

	pàgina
1. Introducció i objectius	3
2. Material examinat	4
3. Mètodes	5
Protocols d'extracció d'ADN genòmic	5
Elecció dels marcadors moleculars	6
4. Genotipatge amb marcadors ISSR	9
5. Conclusions	14

## 1. Introducció i objectius

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 analitzar la singularitat de la diversitat genètica present a la única població coneguda a Menorca de *Rhamnus ludovici-salvatoris*, comparant-la amb diverses poblacions de Mallorca i Cabrera. Els objectius que la recerca volia assolir es centraven en establir

i) els nivells de diferenciació genètica de la població de Menorca,

ii) identificar aquells nuclis poblacionals de Mallorca i/o Cabrera que podrien ser utilitzats com a donadors en el cas de voler fer un reforçament poblacional a Tirant

## 2. Material examinat

Un total de 124 individus varen ser recol·lectats sota la direcció tècnica del personal de la Conselleria de Medi Ambient, qui va planificar el mostreig (selecció de poblacions i individus) i va efectuar la recollida de les mostres i la conservació fins a la transmesa al Jardí Botànic de València. Les poblacions mostrejades i el nombre de mostres recollides s'especifiquen a continuació en la següent taula i figura.

Illa	Població	Individus
Mallorca	Artà	1-16
	Binifaldó	1-15
	Estallencs	1-13
	Coll de sa Bataia	1-19
	Formentor	1-15
	Ternelles	1-15
Cabrera	Port	1-15
Menorca	Tirant	1-16

Taula 1. Enumeració de les poblacions i tamany de mostres utilitzats

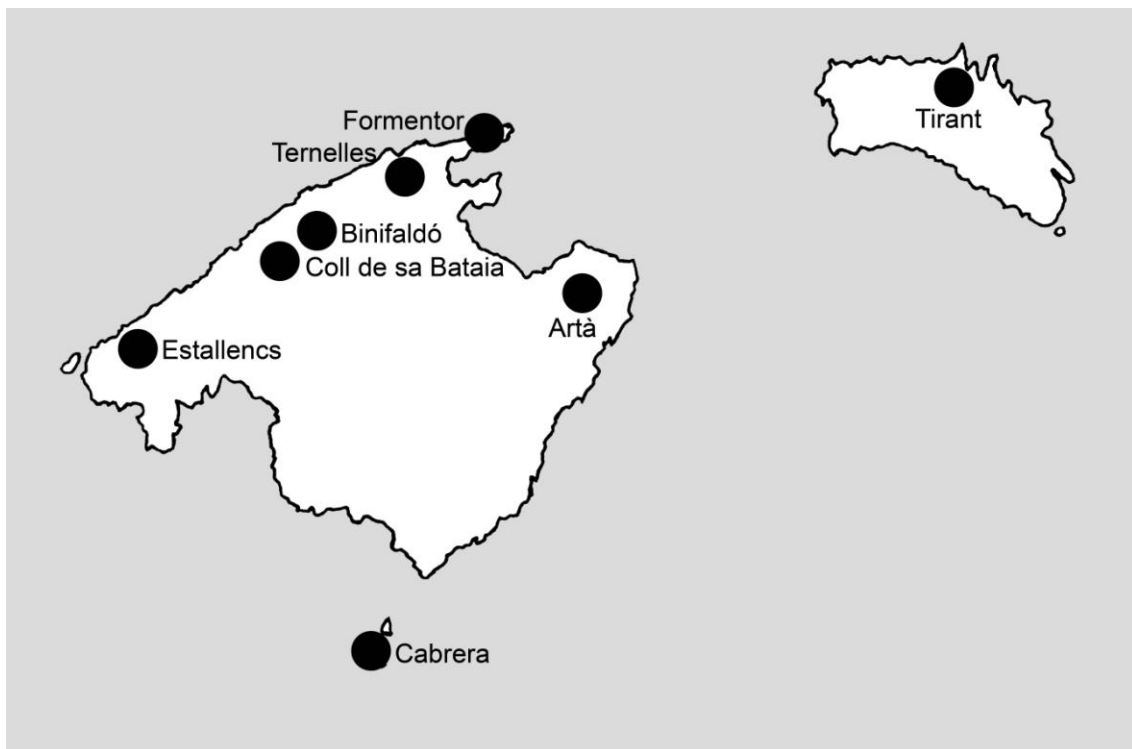


Figura 1. Localització de les poblacions mostrejades per a l'estudi genètic

### 3. Mètodes.

La recerca inicial va tenir que abordar necessàriament tres fases

(i) extracció d'ADN de les mostres vegetals recollides al camp i dessecades en bosses de plàstic plenes de gel de sílice,

(ii) determinació dels marcadors moleculars òptims que millor determinessin el grau de variabilitat genètica entre les poblacions mallorquines i menorquines, optimitzant la seva obtenció, i

(iii) genotipatge dels individus mostrejats

#### Protocol d'extracció d'ADN genòmic

Les espècies del gènere *Rhamnus* presenten uns nivells molt elevats de polisacàrids i compostos polifenòlics propis del metabolisme secundari i que potencialment poden inhibir les reaccions d'amplificació in vitro de l'ADN a través de les reaccions de la PCR. Per tot això, un punt crític en el desenvolupament òptim de la investigació consisteix en la obtenció de protocols rutinaris d'extracció de l'ADN genòmic que produeixin resultats consistents.

Es va procedir a la conservació del material vegetal recol·lectat i posteriorment dessecat emmagatzemant les mostres en ultracongeladors a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A fi d'obtenir ADN pur i d'alta qualitat les mostres s'extraguieren 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  $\mu\text{l}$  de AP1 i 4  $\mu\text{l}$  de RNasa 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.

### **Elecció dels marcadors moleculars**

Donat que una vegada foren examinades les morfologies dels espècimens menorquins es va poder apreciar que aquests presentaven caràcters entremitjos entre *R. alaternus* i *R. ludovici-salvatoris* es va plantejar realitzar els anàlisis amb un marcador nuclear ribosomal (ITS) a fi de verificar la hipòtesi de que els exemplars de Tirant no presentaven flux genètic amb el llampudol.

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 nucleics (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.

### **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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.0001% BSA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% DMSO, 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP

i dTTP, 10  $\mu$ M 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 incloïen l'espaiador ITS-1, el gen 5.8S, i l'espaiador ITS-2.



## 4. Resultats

La seqüenciació dels 124 individus va revelar la existència de 4 genotips, les característiques dels quals s'enumeren a la taula 2. La seva observació permet constatar les següents singularitats:

1) Els genotips 1 i 2 són molt més pròxims entre ells, que qualsevol d'ells ho és al genotip 3 (figura 2). De fet, el genotip 3 es diferencia per 23 mutacions del genotip 1, i 22 del genotip 2 (figura 3).

2) El genotip 4 es la suma de les mutacions presents del genotip 2 i el genotip 3.

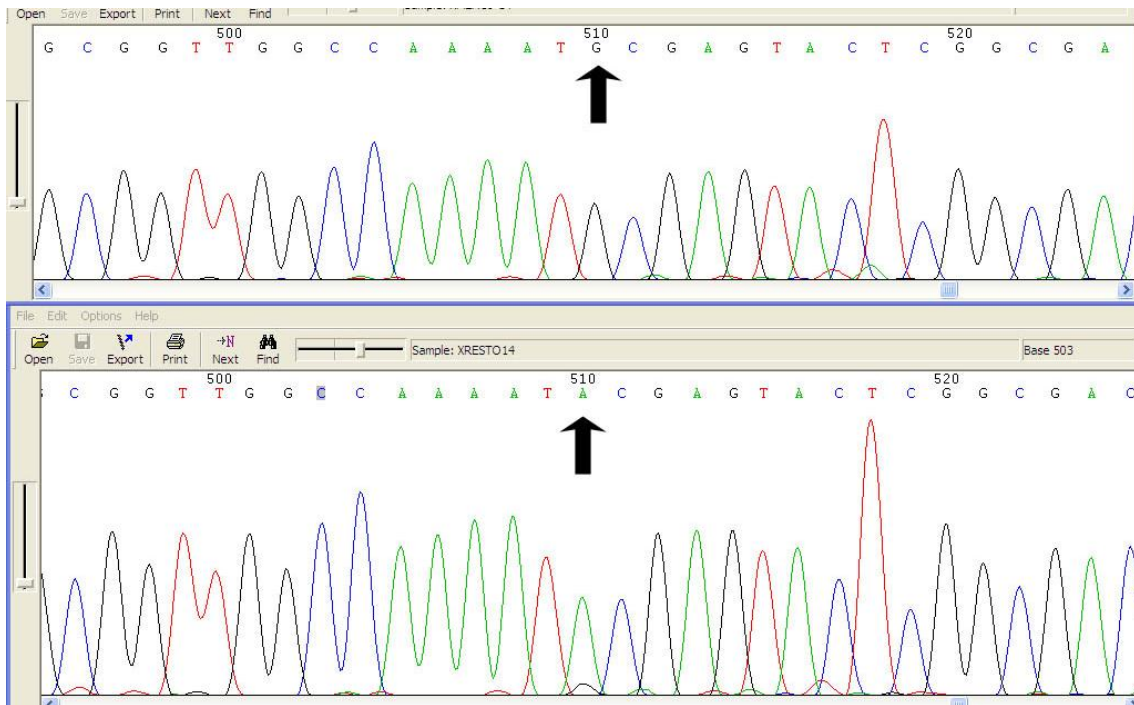


Figura 2. Comparació del lloc diagnòstic (assenyalats per fletxes) entre els genotips 1 i 2, motivat per una mutació entre una guanina (G, dalt) i una adenina (A, baix).

Genotip	Posició																						
	71	100	126	130	144	156	168	173	263	264	275	472	473	483	504	521	522	543	548	563	610	627	638
1	C	T	A	C	A	C	C	C	T	C	A	-	-	T	A	G	C	A	A	C	T	T	C
2	C	T	A	C	A	C	C	C	T	C	A	-	-	T	A	G	C	A	G	C	T	T	C
3	A	C	G	T	G	T	T	T	C	T	G	C	C	A	G	T	T	T	A	T	C	C	G
4	A+C	C+T	A+G	C+T	A+G	C+T	C+T	C+T	C+T	C+T	A+G	C	C	A+T	A+G	G+T	C+T	A+T	A+G	C+T	C+T	C+T	C+G

Taula 2. Descripció dels genotips trobats en les 124 mostres de *R. ludovici-salvatoris* de Mallorca, Cabrera i la població de Tirant. Codi: A= Adenina; C= Citosina; T= Timina; G= Guanina; -: mutació estructural que implica la pèrdua d'una base.

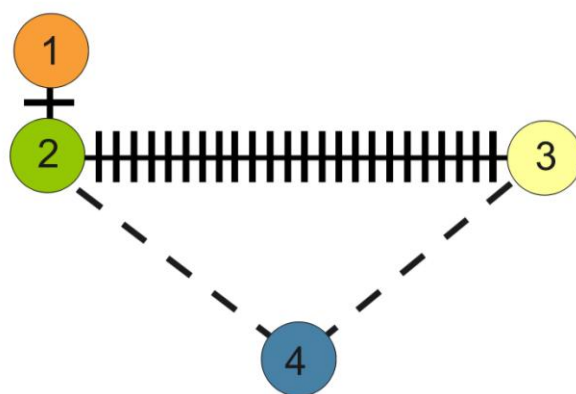


Figura 3. Relacions entre els genotips de *Rhamnus* trobats. El genotip 4 és la combinació de tenir els llocs diagnòstics dels haplotips 2 i 3.

La distribució dels genotips trobats no és a l'atzar, sinó que revela una estructuració geogràfica i taxonòmica clara. Així, el genotip 1 es troba fixat a totes les mostres de Mallorca i Cabrera. El genotip 2, sols es troba a 3 individus de Tirant; mentres que el genotips 3 i 4 sols es troben a la població de Tirant. A fi de determinar quin era l'origen del genotip divergent 4 es va procedir a analitzar individus de *R. alaternus* de procedències diverses, comprovant que tots les mostres analitzades presentaven exclusivament aquest genotip. Aquests resultats foren concloents per interpretar els resultats obtinguts, sobretot pel que fa a les mostres de Tirant. Així, el genotip 1 és característic de les plantes pures de *R. ludovici-salvatoris* de Mallorca i Cabrera, el genotip 2 caracteritza als individus purs de Menorca, el genotip 3 representa als individus híbrids (F1) trobats a Tirant, i finalment el genotip 4 inclou als individus de Tirant que son d'origen híbrid i que són el resultat de generacions híbrides posteriors amb *R. alaternus* (exemplars molt introgrèdits) i que han arribat a fitxar el seu genotip.

La assignació dels genotips trobats a totes les mostres analitzades es mostra a la taula 3, i la seva distribució geogràfica a la figura 4.

Illa	Població	Ind.	Genotip				Interpretació
			1	2	3	4	
Mallorca	Artà	1-16	X				LUDOVICI
	Binifaldó	1-15	X				LUDOVICI
	Estallencs	1-13	X				LUDOVICI
	C sa Bataia	1-19	X				LUDOVICI
	Formentor	1-15	X				LUDOVICI
	Ternelles	1-15	X				LUDOVICI
Cabrera	Port	1-15	X				LUDOVICI
Menorca	Tirant	1		X			LUDOVICI
	Tirant	2			X		HIBRID (F1)
	Tirant	3		X			LUDOVICI
	Tirant	4				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	5				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	6				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	7				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	8				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	9				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	10				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	11				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	12				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	13				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	14				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	15				X	HIBRID (Fn)
	Tirant	16		X			LUDOVICI

Taula 3. Assignació dels genotips i interpretació biològica resultant.  
X= present. F1= híbrid recent, de primera generació. Fn= híbrid posterior, que ha assimilat el genotip de *R. alaternus* per introgressió.

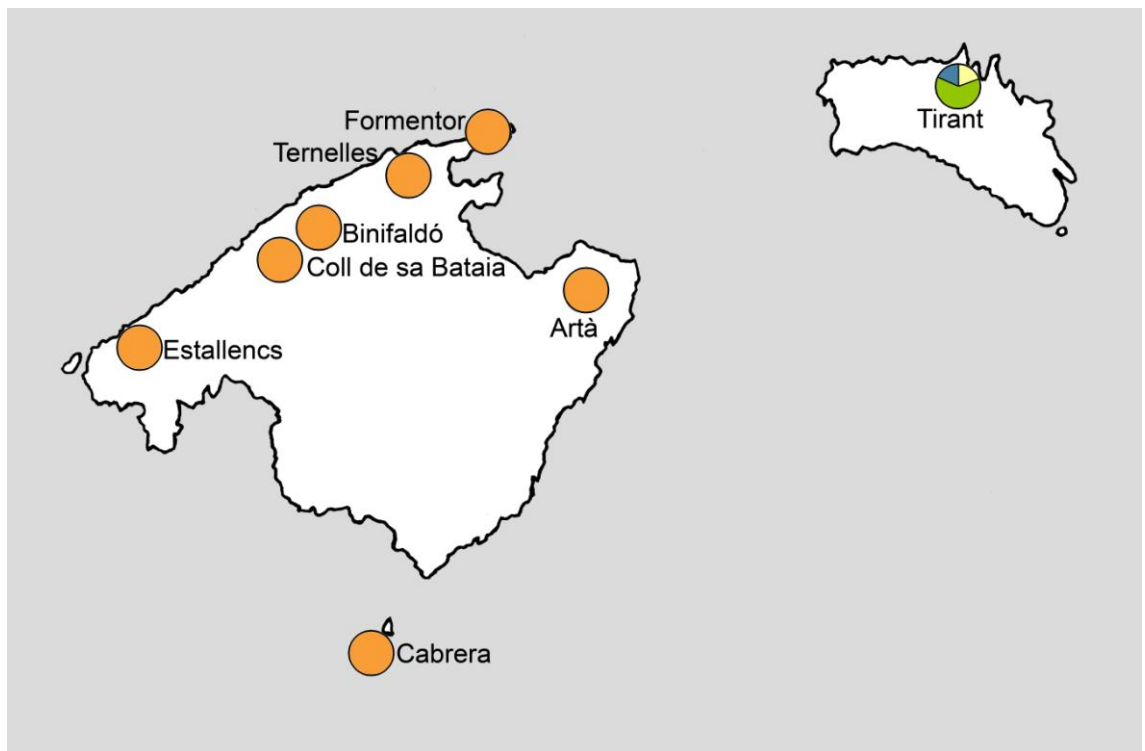


Figura 4. Distribució geogràfica dels 4 genotips trobats a l'estudi. El seu color reflexe la assignació donada a la figura 3. Genotip 1= Carabassa. Genotip 2= verd. Genotip 3= groc. Genotip 4= blau. A la població de Tirant s'especifica el percentatge de cada genotip present.

## 5. Conclusions

L'anàlisi molecular posa clarament de manifest que

(i) els individus purs de *R. ludovici-salvatoris* de Menorca son genèticament diferents de totes les poblacions analitzades de Mallorca i Cabrera. Donat que les variacions en el marcador analitzat (ITS) són prou rares en el si de les espècies, aquest suggereix un grau de divergència notable de la població menorquina

(ii) la població menorquina analitzada es troba seriosament en greu perill d'extinció com a conseqüència dels fenòmens d'intercanvi genètic que s'han produït amb el seu congènere no endèmic *R. alaternus*.