

# FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *PAROLINIA* (BRASSICACEAE) BASADA EN SECUENCIAS ITS.



Ruth Jaén Molina\*, Juli Caujapé Castells\*, Olga Fernández-Palacios, Julia Pérez de Paz, Rosa Febles y David Bramwell.

Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo". Ap de correos 14 de Tafira Alta, E-35017, Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias.

\*autores para correspondencia (email: julicaujape@grancanaria.com y ruthjaen@grancanaria.com)

## RESUMEN

El género endémico canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae) es un taxón presumiblemente relicto que actualmente consta de siete especies distribuidas en cuatro islas canarias: *P. aridanae* (en La Palma), *P. schyzogynoides* (en La Gomera), *P. intermedia* (en Tenerife) y *P. filifolia*, *P. glabriuscula*, *P. ornata* y *P. platypetala* (en Gran Canaria). Los resultados de la secuenciación de las regiones ITS1 + ITS2 permite hacer dos inferencias básicas: 1) los taxones vivos más cercanos a *Parolinia* son el género *Diceratella* (distribuido actualmente en el este del continente africano) y el género *Morettia* (geográficamente más próximo a las islas Canarias), ya identificados por investigaciones anteriores como taxones cercanos a *Parolinia* morfológica, citogenética (2n = 22) y palinológicamente y; 2) el género *Parolinia* es monofilético, formando las especies de las islas más occidentales grupos hermanos basales a las cuatro especies de Gran Canaria, lo cual sugiere una compleja historia de colonización en la que la extinción podría haber jugado un papel relevante. La falta de resolución detectada indica la necesidad de testar marcadores hipervariables (AFLPs, ISSRs, RAPDs) para resolver las relaciones entre los taxones o bien explorar nuevos marcadores de secuencia con mayor polimorfismo inter-poblacional.

## INTRODUCCIÓN

*Parolinia* Webb (Brassicaceae) es un género endémico canario que está representado por siete especies que se distribuyen en Gran Canaria (*P. ornata* Webb, *P. platypetala* Kunkel, *P. filifolia* Kunkel ex Svent. y *P. glabriuscula* Montelongo & Bramwell), Tenerife (*P. intermedia* Svent. & Bramwell), La Palma (*P. aridanae* Santos nomen nudum) y La Gomera (*P. schyzogynoides* Svent.). *Parolinia* ha sido relacionada a nivel biogeográfico con *Diceratella* Boiss., *Morettia* DC. y *Notoceras* (Ait.) Amo, todos ellos, géneros de la disyunción Macaronésica-Sáhara-Síndica-África del Este (Jonsell 1978; Khalik et al., 2002), además de por compartir características morfológicas, citogenéticas (2n=22) y palinológicas (Reese 1957; Jonsell 1978, 1979; Humphries et al., 1978; Pérez de Paz, 1980; Aryamavd, 1983; Bramwell, 1986; Febles, 1989). Análisis moleculares basados en secuencias ITS de representantes de los cuatro géneros confirman dicha relación (Jaén et al., 2005 y 2006) habiendo sido, recientemente, incluidos dentro de la tribu Euclidieae II (Warwick et al., 2007), de forma que se separan de otros géneros con los que habían sido agrupados anteriormente en la tribu Matthioleae (Schulz, 1936). En este estudio, además de incluir representantes de todas las especies de *Parolinia* descritas hasta el momento, hemos incluido a otros representantes de la familia Brassicaceae que se distribuyen también en Canarias como son *Erysimum* L., *Crambe* L. y *Descurainia* Webb & Berthel. y de otros géneros de tribus cercanas, como *Oreoloma* Botsch., *Sterigmotestemum* M. Bieb., *Pseudocamelina* (Boiss.) N. Busch y *Matthiola* R. Br. (algunas de ellas secuencias extraídas del GenBank, señaladas con \* en Tabla 1).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Muestreo

Hemos analizado 42 muestras (Tabla1) que representan a distintas poblaciones de las siete especies del género *Parolinia* Webb (19 muestras), 9 especies del género *Matthiola* R. Br. (Canarias, Madeira, Mediterráneo e Irán) y representantes de 11 géneros de la familia Brassicaceae como outgroups (13 muestras).

### 2. Extracción y amplificación del ADN

La extracción del ADN total se realizó por el método CTAB 2X (Doley & Doley, 1987; Palmer et al., 1989) a partir de hojas frescas o conservadas en gel de sílice. Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo a partir de aproximadamente 50 ng de ADN total en un volumen final de 50 µl, incluyendo todos los componentes de la mezcla comercial RedTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich) y BSA para una concentración final del 5%. Tanto la amplificación de la región ITS1 como de la región ITS2 se llevó a cabo con los pares de primers 18F/ 5.8R y 5.8F/ 25R respectivamente, todos ellos descritos en Mummendorf et al., 1997. Las condiciones de temperatura y tiempo establecidas en el termociclador Eppendorf Mastercycler gradient fueron las siguientes: 5 min. a 95°C, seguido por 32 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min. a 52°C y 90 s a 72°C, con un paso de extensión final de 7 min. a 72°C. Los productos de amplificación fueron purificados con las columnas GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich).

### 3. Secuenciación

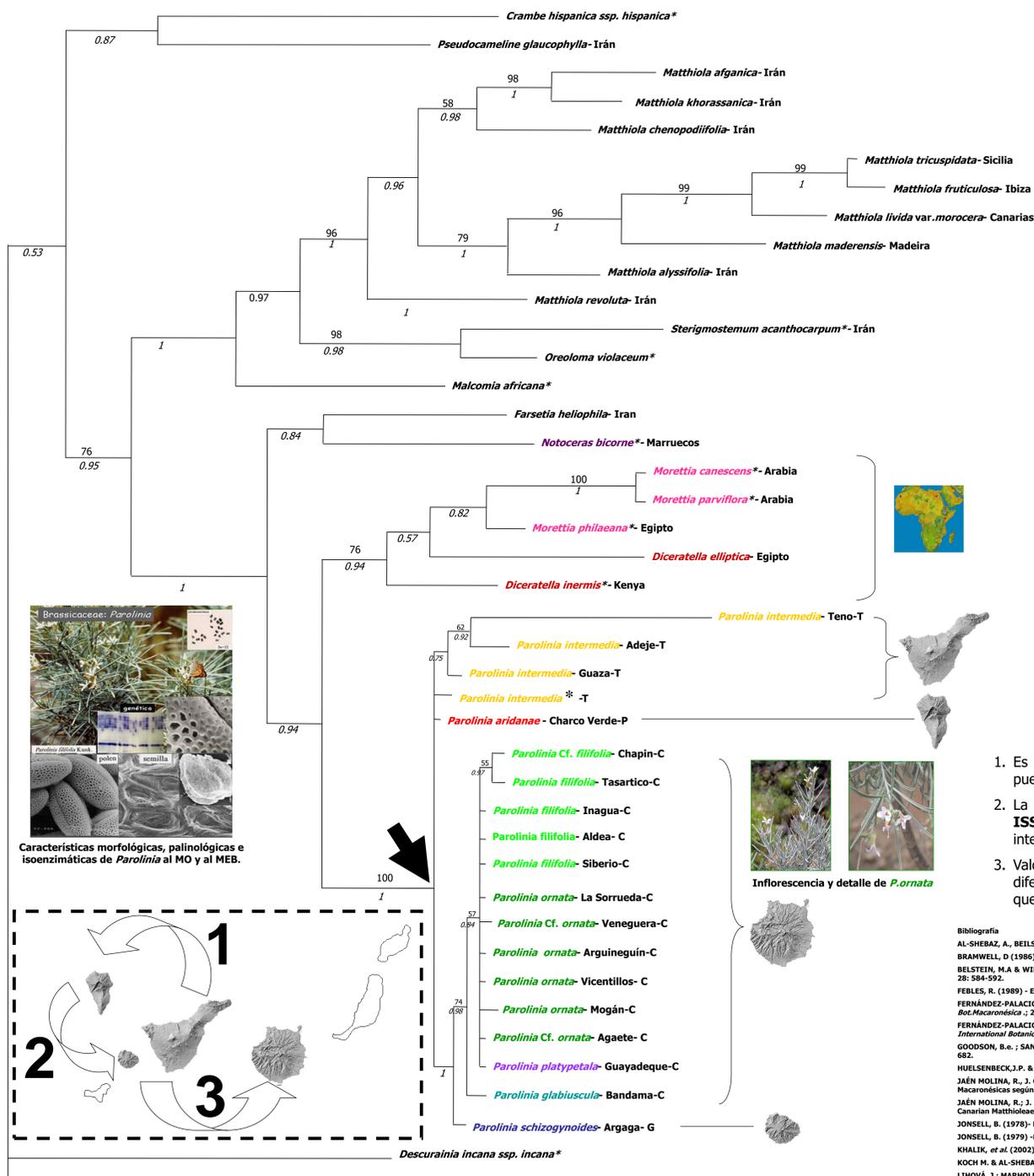
La secuenciación directa de los productos amplificados se realizó en el secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) del Laboratorio de Genética Forense de de la ULPG, con el kit Big Dye Terminator v 2.0 (ABI). Los primers empleados fueron los mismos que para la amplificación y las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: 3 min. a 94°C fue seguido por 30 ciclos de 10 s a 94°C, 5 s a 50°C, y 4 min. a 60°C.

### 4. Análisis

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Bioedit (Hall 1999) y alineadas con el programa Clustal W (Thompson et al., 1994), reajustándose manualmente cuando fue necesario. Se realizaron análisis de Máxima Parsimonia (MP) con el programa PAUP\*4.0b10 (Swofford 2002) bajo las opciones SPR (Morrison, 2007), "branch-swapping" y MULTREES. Para evaluar la robustez de las diferentes ramas del árbol se calculó el índice de "bootstrap" (BP) para 10.000 réplicas con la opción "fast". El programa Mr Bayes v.3.0 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) fue usado para el análisis filogenético mediante inferencia bayesiana bajo el modelo evolutivo JC (Jukes and Cantor, 1969) definido como el más conveniente en Modeltest v.3.06 (Posada et al., 1998). Las probabilidades posteriores (BPP) de apoyo de los clados fueron estimadas por consenso mayoritario ("majority rule").

## RESULTADOS

El análisis de MP de la matriz de datos de 42 secuencias (ITS1+2) y 507 caracteres dio lugar a 157 árboles filogenéticos. El número de pasos de uno de los árboles máximo parsimoniosos fue de 778 y los valores de los índices de consistencia, homoplasia y retención fueron los siguientes CI=0.56; HI= 0.43 y RI=0.69. El árbol consenso mayoritario resultante del análisis bayesiano resolvió mejor las relaciones interinsulares de las especies de *Parolinia* pero sigue sin resolver las relaciones intra-insulares. En la Fig. 4 se muestra el árbol consenso con valores BP y BPP de soporte de los clados.



**Figura 4.** Árbol consenso (majority rule) obtenido por el análisis bayesiano de secuencias ITS 1 y 2 de distintos representantes del género *Parolinia* y otros géneros de la familia Brassicaceae, usando el modelo evolutivo Jukes & Cantor. Los índices de "bootstrap" superiores al 50% del análisis de MP se muestran sobre las ramas que definen los distintos clados, mientras que los valores de probabilidad posterior resultantes del análisis bayesiano se muestran en cursiva, bajo las mismas. Se indican las zonas geográficas en las que se distribuyen las distintas especies. A los géneros *Diceratella*, *Morettia* y *Notoceras* se les han asignado diferentes colores para diferenciarlos del resto de los outgroups y dentro de *Parolinia* se ha asignado un color diferente para cada una de las especies. La flecha indica el ancestro común más reciente a todas las especies actuales de *Parolinia*. El cuadrado en línea discontinua contiene una hipótesis de colonización inter-insular de *Parolinia* en tres pasos, según la topología del árbol ITS.

**Tabla 1.** Información detallada de las muestras del género *Parolinia* y otros géneros de la familia Brassicaceae incluidas en este estudio.

GÉNERO	ESPECIE	LOCALIDAD/ VOUCHER	REGIÓN	PAÍS
<i>Parolinia</i>	<i>aridanae</i> A.Santos	Charco Verde	La Palma	España
<i>Parolinia</i>	<i>schyzogynoides</i> Svent.	Argaga	La Gomera	España
<i>Parolinia</i>	<i>intermedia</i> Kunkel	Guayadeque	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>glabriuscula</i> Montelongo & Bramwell	Caldera de Bandama	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>Cf. ornata</i> Webb.	Agate	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>ornata</i> Webb.	Mogán	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>ornata</i> Webb.	Vicentillos	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>ornata</i> Webb.	La Sorrueda	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>ornata</i> Webb.	Barranco de Arguineguin	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>Cf. ornata</i> Webb.	Veneguera	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>filifolia</i> Kunkel	Inagua	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>filifolia</i> Kunkel	Siberio	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>Cf. filifolia</i> Kunkel	Riscos de Chapín	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>filifolia</i> Kunkel	Tasartico	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>filifolia</i> Kunkel	La Aldea	Gran Canaria	España
<i>Parolinia</i>	<i>intermedia</i> Svent. & Bramwell.	Adjeje	Tenerife	España
<i>Parolinia</i>	<i>intermedia</i> Svent. & Bramwell.	Teno	Tenerife	España
<i>Parolinia</i>	<i>intermedia</i> Svent. & Bramwell.	Bramwell & Sventenius1453 (MO)	Tenerife	España
<i>Parolinia</i>	<i>intermedia</i> Svent. & Bramwell.	Guaza	Tenerife	España
<i>Matthiola</i>	<i>livida</i> (Del.) DC var. <i>morocera</i> Christ	Tuña	Gran Canaria	España
<i>Matthiola</i>	<i>maderensis</i> Lowe	Pico do galos	Madeira	Portugal
<i>Matthiola</i>	<i>tricuspidata</i> R. Br.	Campofelice di Roccella.	Sicilia	Italia
<i>Matthiola</i>	<i>fruticulosa</i> (L.) Maire	Platja del Comte	Ibiza	España
<i>Matthiola</i>	<i>revoluta</i> Bunge ex Boiss.	Esfahan	Irán	Irán
<i>Matthiola</i>	<i>chenopodiifolia</i> Fisch. & C. A. Mey	Khorsgan/ Naein	Irán	Irán
<i>Matthiola</i>	<i>khorrassanica</i> Bunge ex Boiss.	Khorsgan	Irán	Irán
<i>Matthiola</i>	<i>alysifolia</i> (D.C.) Borm.	Birjand	Irán	Irán
<i>Matthiola</i>	<i>alghanica</i>	Chenaran	Irán	Irán
<i>Diceratella</i>	<i>elliptica</i> (D.C.) Jonsell	Djebel Elba	Egipto	África
<i>Diceratella</i>	<i>inermis</i> Jonsell	Kenya	Kenya	África
<i>Notoceras</i>	<i>bicornis</i> (Ait.) Amo	Marruecos	Marruecos	África
<i>Farssetia</i>	<i>heliophila</i> Bunge ex Cosson	Fars	Irán	Irán
<i>Malcolmia</i>	<i>africana</i> (L.) R. Br. in W. T. Aiton	Utah	EEUU	EEUU
<i>Erysimum</i>	<i>scoparium</i> Wettst.	Arabia Saudí	Arabia	Arabia
<i>Morettia</i>	<i>parviflora</i> Boiss.	Arabia Saudí	Arabia	Arabia
<i>Morettia</i>	<i>philaeana</i> D.C.	Egipto	Egipto	África
<i>Pseudocamelina</i>	<i>glaucochylla</i> (D.C.) N. Bush.	Ostane Markazi	Irán	Irán
<i>Sterigmotestemum</i>	<i>acanthocarpum</i> (Fisch. & C.A.Mey)	Irán	Irán	Irán
<i>Oreoloma</i>	<i>violaceum</i> Botsch.	China	China	China
<i>Descurainia</i>	<i>incana</i> ssp. <i>incana</i> (L.) Webb & Berth.	Hieman et al., 2002	AY028604	AY028604
<i>Crambe</i>	<i>hispanica</i> L. ssp. <i>hispanica</i>	Wyoming, Natrona County.	EEUU	EEUU
		Warwick BCN 8308 (DAO)	AY722442	AY722442

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de nuestra investigación nos permiten plantear las siguientes reflexiones e hipótesis:

• **Los taxones vivos más cercanos a *Parolinia* son el género *Diceratella* (NE-África) y el género *Morettia* (Sáhara y Arabia)** relación apoyada por un bootstrap del 76% y una probabilidad posterior del 94%. Esto sugiere que podría tratarse de relictos de un contingente antes más ampliamente distribuido, en el que ha habido extinciones (glaciaciones) o también que nos encontramos ante un caso de **dispersión a larga distancia**.

• **El género *Parolinia* es monofilético** (BP=100 y BPP=1), por lo cual los datos de las regiones ITS explican su presencia en Canarias por un único evento colonizador.

• **Las especies de Gran Canaria son monofiléticas**, por lo tanto la presencia del género en esta isla se explica por un sola introducción post-colonizadora (BP=74 y BPP= 0.98). Salvo *P. glabriuscula* las demás especies (*P. filifolia*, *P. ornata* y *P. platypetala*) se agrupan en un sub-clado (BP=57 y BPP=0.94) pero están muy poco diferenciadas. Esto se ve reforzado en parte, por los estudios basados en micromarcadores genéticos, morfológicos-reproductivos y la revisión taxonómica de estas especies (Fernández-Palacios et al., 2004 y 2005, y en prep.) en los que se constata la gran similitud de *P. ornata* y *P. platypetala* y diferencian a *P. filifolia*.

• **La secuencia colonizadora inter-insular es compleja.** *Paridanae* (La Palma) y *P. intermedia* (Tenerife) forman grupos hermanos basales a *P. schyzogynoides* de La Gomera, que a su vez es grupo hermano basal a las cuatro especies de Gran Canaria. Esta última relación se ve reforzada por el estudio de diversidad genética basado en isoenzimas del género (Fernández Palacios et al., 2006) en el que estas dos islas comparten 3 alelos exclusivos. En la Fig. 4, mostramos una de las posibles hipótesis (en sentido general Oeste-Este) sobre la compleja historia de colonización de *Parolinia* en las islas Canarias. Aunque este patrón es contradictorio al de otros estudios de diversidad genética y taxonómica (la isla con mayor diversidad taxonómica es la que se podría haber colonizado más recientemente), guarda similitud con el sugerido para *Descurainia* (Goodson, et al., 2006). Además, la extinción podría haber jugado un papel distorsionador importante en la interpretación de la colonización inter-insular si existieron ancestros que desaparecieron en la distribución actual de las islas y/o donde el género no está presente (Lanzarote, Fuerteventura y El Hierro).

• ***Notoceras*** a pesar de compartir tribu (Euclidieae) y número cromosómico (2n = 22) con *Parolinia*, *Diceratella* y *Morettia*, ocupa una posición filogenética más cercana a *Farssetia* (tribu Alyseae y 2n=24) y una relación lejana con *Malcolmia* (Euclidieae y 2n=28) a pesar de la clasificación de Al-Shebaz et al., 2006. Por lo que, se muestra nuevamente como en Crucíferas es necesario seguir **profundizando en el análisis molecular**, para poder resolver la correcta clasificación taxonómica de los grupos que la conforman y, más aún, cuando fenómenos como la **hibridación y la poliploidía** parecen estar jugando un papel clave en su historia evolutiva (Lihová et al., 2000; Koch et al., 2002; Belstein et al., 2003; Warwick et al., 2007).

• **La clara asignación de *Parolinia* y *Matthiola* a diferentes clados** apoya la actual separación de estos dos géneros [previamente considerados dentro de la tribu Matthioleae por Schulz (1936)] en tribus diferentes Euclidieae y Anthonieae, (Al-Shebaz et al., 2006 y Warwick et al., 2007), respectivamente, quedando descartada la relación en su historia evolutiva.

## DIRECTRICES FUTURAS

1. Es necesario **explorar nuevos marcadores** de secuencia con mayor polimorfismo inter-poblacional, pues la variabilidad encontrada tanto para ITS1 como ITS2 entre los taxa de *Parolinia* es muy reducida.
2. La falta de resolución detectada indica la necesidad de **testar marcadores hipervariables (AFLPs, ISSRs, RAPDs)** para comprobar si pueden resolver mejor las relaciones inter-específicas e interinsulares del género.
3. Valorar las **regiones propuestas como candidatas a "códigos de barras"** en vegetales para diferenciar poblaciones dentro de las especies de *Parolinia* y valorar las **implicaciones taxonómicas** que pueden tener.

### Bibliografía

- AL-SHEBAZ, A., BELSTEIN, M.A., & KELLOGG, E.A. (2006) – Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Pl. Syst. Evol.* 259: 89-120
- BRAMWELL, D. (1986) – Contribución a la biogeografía de las islas Canarias. *Bot. Macaronésica*; 14:3-34.
- BELSTEIN, M.A & WINDHAM, M.D. (2003) – A PHYLOGENETIC ANALYSIS OF WESTERN NORTH AMERICAN DRABA (BRASSICACEAE) BASED ON NUCLEAR RIBOSOMAL DNA SEQUENCES FROM THE ITS REGION. *Syst. Bot.* 28: 504-522.
- FEBLER, R. (1989) – Estudios en la flora macaronésica: algunos números de cromosomas. *VI. Botánica Macaronésica* 17: 57-76.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, O., PÉREZ DE PAZ, J., FEBLER, R., y CAUJAPÉ CASTELLS, J. (2004) – Diversidad genética en *Parolinia*: *P. glabriuscula* y *P. platypetala* (Brassicaceae:Matthioleae). *Bot. Macaronésica* ; 25:147-164.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, O., J. CAUJAPÉ CASTELLS, O. FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. PÉREZ DE PAZ, R. FEBLER, D. BRAMWELL, A. REYES, H. AKHANI & K. A. KHALIK. (2005) – Filogenia molecular de las Matthioleae Macaronésicas según la información de las regiones ITS y *trnK-psbA*. *2º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes)*, Gijón.
- JAÉN MOLINA, R.; J. CAUJAPÉ CASTELLS, O.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.; PÉREZ DE PAZ, R.; FEBLER, D.; BRAMWELL, A.; REYES, H.; AKHANI & K. A. KHALIK. (2006) – Toward a molecular phylogeny of the Canarian Matthioleae (Brassicaceae): first insights based on sequence data for ITS1 and ITS2. *ASPT Meeting - Libro de Resúmenes*, Cádiz (California).
- JONSELL, B. (1978) – New taxa of *Diceratella* and *Farssetia* (Cruciferae) from E Tropical Africa. *Bot. Notiser*; 131:251-257.
- JONSELL, B. (1979) – New taxa of Cruciferae from East Tropical Africa and Madagascar. *Bot. Notiser*; 132:521-537.
- KHALIK, et al. (2002) – Numerical taxonomic study of some tribes of Brassicaceae from Egypt. *Plant. Syst. Evol.* 223:207-221.
- KOCH M. & AL-SHEBAZ, A.I. (2002) – Molecular data indicate complex intra- and intercontinental differentiation of American *Draba* (Brassicaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 89: 88-109.
- LIHOVÁ, J., MARHOLD, K. % NEUFFER, B. (2000) – Taxonomy of *Cardamine amara* (Cruciferae) in Iberian Peninsula. *Taxon* 49:747-763.
- GOODSON, B.E.; SANTOS-GUERRA, A.; JANSEN, R.K. (2006) – Molecular systematics of *Descurainia* (Brassicaceae) in the Canary Islands: biogeographic and taxonomic implications. *Taxon* 55 (3): 671-682.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F.R. (2001) – MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- JAÉN MOLINA, R., J. CAUJAPÉ CASTELLS, O., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J., PÉREZ DE PAZ, R., FEBLER, D., BRAMWELL, A., REYES, H., AKHANI & K. A. KHALIK. (2005) – Filogenia molecular de las Matthioleae Macaronésicas según la información de las regiones ITS y *trnK-psbA*. *2º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes)*, Gijón.
- JAÉN MOLINA, R.; J. CAUJAPÉ CASTELLS, O.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.; PÉREZ DE PAZ, R.; FEBLER, D.; BRAMWELL, A.; REYES, H.; AKHANI & K. A. KHALIK. (2006) – Toward a molecular phylogeny of the Canarian Matthioleae (Brassicaceae): first insights based on sequence data for ITS1 and ITS2. *ASPT Meeting - Libro de Resúmenes*, Cádiz (California).
- RESE, G. (1957) – In: Federow. Chromosome numbers of Flowering Plant (1974).
- WARWICK, S.I.; SAUDER, C.A.; AL-SHEBAZ, A.I. & JACQUEMOUND, F. (2007) – Phylogenetic relationships in the tribes Anthonieae, Chorisporae, Euclidieae, and Hesperideae (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 94:56-78.