

Memoria técnica

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE ACEBUCHE (*Olea cerasiformis* Rivas-Mart. & del Arco) EN GRAN CANARIA Y EVALUACIÓN DE SU USO EN EL REFORZAMIENTO DE LA POBLACIÓN DE LA MONTAÑA DEL CEDRO

Carlos García-Verdugo¹, Pedro Monroy² & Juli Caujapé-Castells¹

¹Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de DNA, Jardín Botánico Canario 'Viera y Clavijo' – Unidad Asociada CSIC, Cabildo de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria,

²Fundación Canaria Amurga-Maspalomas, Avda. Tirajana, 39, Edificio Mercurio, Torre II, 6ª Planta, 35100 San Bartolomé de Tirajana

• Antecedentes y objetivos

Los planes de gestión enfocados a la conservación de la biodiversidad han experimentado un cambio conceptual muy significativo en las dos últimas décadas. La calidad y cantidad de información que podemos extraer de los organismos vivos gracias al uso de herramientas moleculares nos permite conocer, de forma relativamente rápida, cómo se estructura la diversidad asociada a niveles de organización anteriormente desconocidos (diversidad genética). Así, el acuerdo internacional recogido en la *Global Strategy for Plant Conservation* (<http://www.cbd.int/gspc/>) reconoce en su objetivo 5 la necesidad de contemplar la diversidad genética de las especies en la gestión de áreas de alta diversidad vegetal (CBD 2014).

La estructuración de la diversidad genética de una especie a diferentes escalas espaciales (local, regional, global) es el resultado de procesos evolutivos, generalmente complejos y por lo tanto no evidentes, que resultan de su capacidad de colonización y supervivencia durante su historia biogeográfica (Avice 2000). En el marco de la restauración ecológica, determinar la variabilidad genética de una especie y la manera en la que ésta se estructura en el área geográfica que ocupa debería ser un objetivo básico, dado que la restauración debe contemplar las diferentes dimensiones de la diversidad biológica (SER 2004; Reynolds *et al.* 2012; Mijangos *et al.* 2015). En este sentido, los archipiélagos oceánicos como las islas Canarias representan un marco geográfico en el que los diferentes niveles de aislamiento intra- e interinsulares, el efecto de los eventos geológicos y la amplia variedad de hábitats imprimen patrones espaciales de diversidad generalmente complejos (Juan *et al.* 2000).



Los planes destinados a la preservación y gestión de la biodiversidad son por tanto una tarea especialmente difícil en estos ambientes, pero técnicamente abordables si se cuenta con la información básica necesaria para desarrollar medidas de protección y restauración congruentes con la realidad biológica de los organismos.

Dentro del proyecto Life+Guguay, que tiene como uno de sus principales objetivos “la recuperación de los bosques endémicos de *Juniperus* spp, y su flora y fauna”, se ha planteado el reforzamiento de las poblaciones de acebuche canario, *Olea cerasiformis* Rivas-Mart. & del Arco (*Olea europea* subsp. *guanchica* Vargas *et al.*, según autores), presentes en la montaña del Cedro. El acebuche es un árbol emblemático en el archipiélago, cuya presencia en la mayoría de las islas ha quedado sensiblemente reducida por la presión ejercida por el hombre (Fernández-Palacios *et al.* 2008). En la isla de Gran Canaria, el acebuche goza de un buen estado de conservación en el cuadrante nororiental, aunque trabajos previos han detectado una señal de diferenciación genética entre las poblaciones orientales de la isla, que ocupan sustratos geológicos más jóvenes, y las poblaciones occidentales, localizadas en zonas geológicamente más antiguas (Hess *et al.* 2000).

El bajo número de muestras y las técnicas usadas en el citado trabajo impiden, no obstante, una valoración precisa de la constitución genética de las poblaciones de acebuche grancanarias en su conjunto. A pesar de los pocos datos preliminares para Gran Canaria, estudios centrados en poblaciones de otras islas del archipiélago (García-Verdugo *et al.* 2010a, 2010b), también permiten aventurar que el acebuche podría estar representado en los sectores occidentales de la isla por poblaciones más antiguas y con una constitución genética sensiblemente diferente a las poblaciones de la mitad oriental (Bandama, Barranco de los Cernícalos, Barranco de Guayadeque). Es por esto que cualquier acción destinada a reforzar poblaciones de la región occidental debería contemplar el origen y constitución genética de las poblaciones que funcionarían como fuentes semillero (actualmente limitadas a la mitad oriental).

El estado de los individuos de la población de la montaña del Cedro, limitado por condiciones subóptimas de crecimiento (altos niveles de herbivorismo, exposición al viento y baja disponibilidad hídrica y de sustrato) hacen inviable la producción de un número abundante de semillas a partir de los efectivos de la propia población. Dado que el fin último del proyecto es el intento de preservar y, en la medida de lo posible, recuperar la diversidad biológica de este enclave, se plantea la duda de qué poblaciones serían las más adecuadas para obtener semillas y reintroducir plantas que no supongan la entrada de genotipos que



hayan divergido notablemente con respecto a los individuos remanentes. La falta de información genética básica que permita discernir qué poblaciones serían las más apropiadas lleva por tanto a plantear este estudio aplicado. El objetivo general es generar información genética para varias poblaciones de *Olea* en Gran Canaria usando tres marcadores plastidiales que en estudios previos han servido para identificar más de diez variantes genéticas (haplotipos) en Canarias y subrayar la existencia de dos linajes claramente diferenciados dentro de Canarias (García-Verdugo *et al.* 2010a, 2010b; Besnard *et al.* en preparación). Esta información permitirá sopesar en qué medida el uso de poblaciones orientales como fuentes semillero está recomendado para actuaciones centradas en otros sectores de la isla, así como identificar qué poblaciones del sector occidental serían las más adecuadas para ejecutar el reforzamiento de la población de la montaña del Cedro.

Objetivos:

- (1) Usar el conocimiento existente sobre la genética del acebuche para identificar las variantes genéticas (haplotipo/s) presentes en la montaña del Cedro
- (2) Caracterizar genéticamente las poblaciones más representativas de la isla de Gran Canaria y señalar las áreas más adecuadas para la generación de plantas destinadas al reforzamiento de la población del Cedro
- (3) Evaluar con los mismos marcadores moleculares si los reforzamientos realizados con anterioridad son congruentes con el patrón de estructuración genética observada en los objetivos (1) y (2).

• Materiales y métodos

Muestreo de poblaciones

Se procedió al muestreo de un conjunto de poblaciones que representan la distribución de *Olea* en la isla de Gran Canaria, con especial énfasis en las zonas que se usan habitualmente como fuente semillero (por ejemplo, Barranco de los Cernícalos) y de la mitad occidental de la isla, donde potencialmente se podría localizar más variabilidad y la identificación de zonas de especial interés para la reintroducción de ejemplares en El Cedro. De cada población se muestrearon cinco individuos, dado que, para el tipo de marcador genético usado, este número es suficiente para detectar la posible variabilidad intrapoblacional. El personal asociado al proyecto Life+Guguy se encargó de muestrear hojas de cinco individuos de la poblacional natural de acebuche del Cedro y de cinco plántulas de acebuche que han sido introducidas en la zona de actuación



recientemente. La procedencia de estas últimas no está clara, pero posiblemente provienen de semillas recolectadas en las fuentes semillero clásicas de la isla (sector oriental).

Además, se incluyó una muestra de individuos de la isla de Tenerife y de Fuerteventura, con el fin de identificar la posible relación de las poblaciones grancanarias con estas islas (García-Verdugo *et al.* 2010b; Besnard *et al.* en preparación). También se incorporó a los análisis una muestra de uno de los acebuches adultos de la zona de Tasarte que recientemente se han empleado para la recolección de semillas. Aproximadamente un 50% de las muestras para este estudio se obtuvieron del banco de ADN del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, que cuenta con una buena representación de esta especie.

Tabla 1. Poblaciones incluidas en el estudio

Población	Código	Isla (sector)	Nº de individuos
Anaga	TEN	Tenerife	5
Tindaya-Betancuria	FUE	Fuerteventura	10
Bandama	BAN	Gran Canaria (este)	5
Barranco Cernícalos	BCE	Gran Canaria (este)	5
Guayadeque	GUA	Gran Canaria (este)	5
Montaña de Guía	GUI	Gran Canaria (oeste)	5
Tirma	TIR	Gran Canaria (oeste)	5
Tasarte	TAS	Gran Canaria (oeste)	5
Montaña de El Cedro	CED	Gran Canaria (oeste)	5
El Cedro-Repoblación	Rep-CED	Gran Canaria (oeste)	5

Análisis de ADN plastidial

Los análisis de laboratorio comenzaron en febrero de 2015, una vez los técnicos del proyecto Life+Guguy recolectaron las muestras de la Montaña del Cedro. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo por el método de Dellaporta *et al.* (1985), dado que ensayos previos con esta técnica en el laboratorio molecular del Jardín Botánico Canario habían proporcionado resultados óptimos en *Olea*.

Los marcadores genéticos empleados en la caracterización molecular e identificación de linajes en *Olea* se basó en la experiencia previa con esta planta (Hess *et al.* 2000; García-Verdugo *et al.* 2009, 2010a, 2010b; Besnard *et al.* 2011). Se procedió a la amplificación y secuenciación de tres regiones plastidiales que en trabajos anteriores permitieron la identificación a alta resolución de variantes genéticas (haplotipos) en las poblaciones de *Olea* del archipiélago (García-Verdugo *et al.* 2010a, 2010b, Besnard *et al.* 2011). Actualmente existen hasta 10



regiones variables que servirían para cumplir este objetivo (Besnard *et al.* 2011), pero tres de ellas se juzgaron como suficientes para identificar la existencia de posibles divergencias poblacionales entre distintas zonas de la isla a un coste y tiempo coherentes con los objetivos del proyecto. Las amplificaciones por PCR tuvieron lugar en los laboratorios del Jardín Botánico Canario y la secuenciación se encargó a un servicio externo (MACROGEN).

• Resultados y discusión

Los datos generados con los tres marcadores se ordenaron en secuencias concatenadas que permitieron definir diferentes haplotipos. El número total de haplotipos encontrados en Gran Canaria fue de cinco, cifra que aumenta significativamente el número de variantes genéticas conocidas en la isla; hasta la actualidad se había descrito un único haplotipo para Gran Canaria (García-Verdugo *et al.* 2010b). La mayor parte de las muestras se asoció a uno de los dos haplotipos más frecuentes: GC-I y GC-II. En la figura 1 se muestra un ejemplo con dos de los marcadores plastidiales secuenciados (*psbE-petL* y *trnK-rps16*) en el que se observa la naturaleza de los cambios genéticos que permiten diferenciar entre ambos haplotipos.

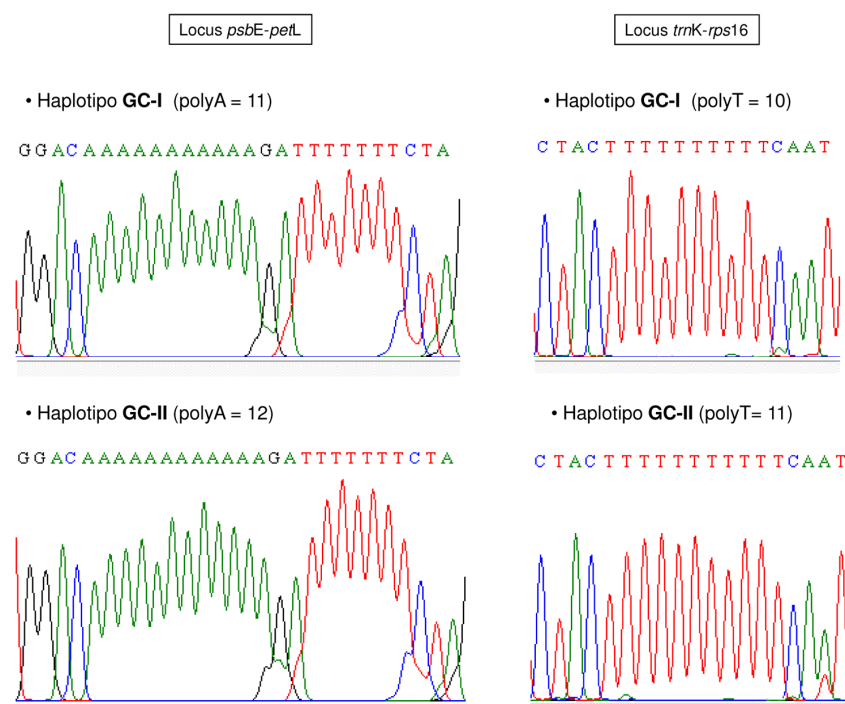


Figura 1. Cromatogramas mostrando las diferencias genéticas en las secuencias de ADN (microsatélites plastidiales) que permiten la identificación de diferentes haplotipos en las poblaciones de acebuche de Gran Canaria. En el ejemplo se muestran los cambios encontrados para dos *loci* (*psbE-petL* y *trnK-rps16*), pero en el estudio se incluyó también un tercer *locus* (*trnH-psbA*)



Como muestra la reconstrucción de la red de haplotipos (Figura 2), la diferenciación entre los haplotipos GC-I y GC-II se debe a cambios encontrados en cada una de las tres regiones analizadas (tres mutaciones), lo que sugiere que la diferenciación genética entre ambos es muy acusada. La incorporación de nuevos marcadores (en este estudio sólo se han usado 3 de los 10 identificados), incrementa aún más la distancia genética que existe entre ambos (Besnard *et al.* en preparación).

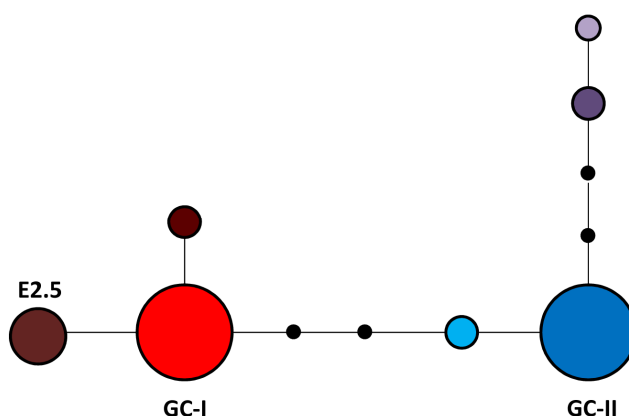


Figura 2. Red de haplotipos obtenida por el método de reconstrucción *median joining*. Los haplotipos más frecuentes, GC-I y GC-II, se encuentran separados por tres mutaciones. El haplotipo GC-I se encuentra genéticamente muy próximo al haplotipo E2.5 (poblaciones continentales del suroeste de Marruecos).

Con respecto a la distribución de los haplotipos en el territorio insular, los resultados de este estudio definen claramente la existencia de un linaje representado por el haplotipo GC-I en las poblaciones orientales de la isla (Caldera de Bandama, Barranco de los Cernícalos y Barranco de Guayadeque), que presenta mayor relación con los haplotipos encontrados en la isla de Fuerteventura (Figura 3). Esta relación es congruente con lo descrito en trabajos previos (García-Verdugo *et al.* 2010b). Por otro lado, y en cierto modo apoyando los resultados preliminares de Hess *et al.* (2000), se observa que las poblaciones de la mitad occidental de Gran Canaria contienen haplotipos que se pueden asociar a otro linaje (GC-II y derivados), que es distinto del oriental. En general, la región occidental de Gran Canaria alberga una mayor diversidad haplotípica. Así, es llamativa la presencia de haplotipos exclusivos en la población de la montaña de Guía, que parecen ser variantes genéticas no descritas para ninguna otra población del archipiélago hasta ahora. Por su parte, la población natural de montaña del Cedro presenta una composición de haplotipos similar a la muestreada en Tasarte, Tirma, e incluso Anaga (Tenerife).



Es necesario matizar que la similitud entre Anaga y El Cedro ha de ser interpretada con cautela, especialmente en relación a la identificación de posibles fuentes semilleras. Aunque la similitud en la composición de haplotipos posiblemente está asociada a una cierta ocurrencia histórica de flujo génico entre esa zona de Gran Canaria y Tenerife (como ya se ha descrito en *Olea* entre las regiones de Teno, en Tenerife, y La Gomera; García-Verdugo *et al.* 2010a), hay que subrayar que el uso de un mayor número de marcadores plastidiales podría revelar la existencia de nuevas subvariantes en las poblaciones de una y otra isla, como consecuencia del efecto de aislamiento inducido por las barreras oceánicas. Por otro lado, el tipo de marcador usado en este estudio permite definir sólo la estructura genética de “grano grueso”. Marcadores con un mayor nivel resolución, como los microsatélites nucleares, posiblemente revelarían diferencias mayores a las observadas con los marcadores plastidiales. Es por ello recomendable que a la hora de establecer fuentes semillero de uso en la isla de Gran Canaria se adopte un criterio geográfico poderando los datos aportados por este estudio; esto es, usando poblaciones geográficamente próximas y con haplotipos similares.

Por último, nuestro estudio demuestra claramente que los individuos que hasta la fecha se han introducido en la montaña del Cedro presentan de manera inequívoca el haplotipo GC-I (Figura 3, Ref-CED). En otras palabras, proceden de semillas recolectadas en poblaciones orientales.

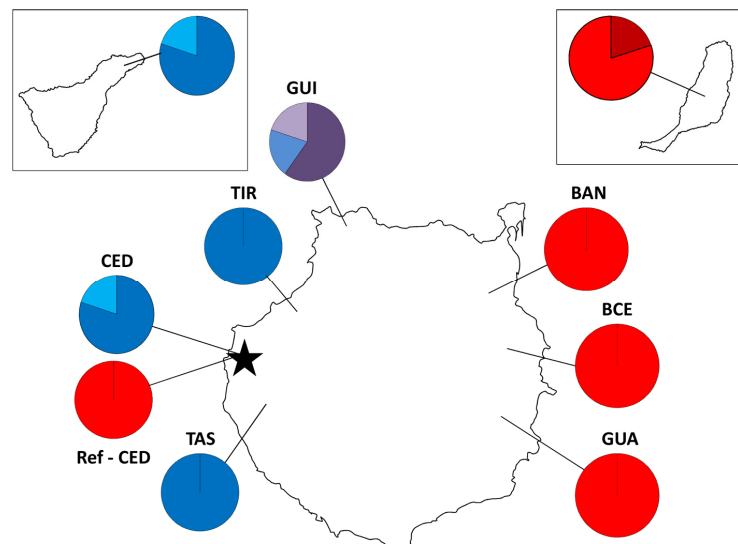


Figura 3. Distribución de haplotipos de acebuche en Gran Canaria. La estrella marca la zona de la actuación del proyecto LIFE-Guguy, con dos conjuntos de muestras asociadas: población natural de acebuche (CED) y árboles introducidos a partir de fuentes semilleras típicamente usadas en tareas de reforzamiento y reintroducción de acebuche en la isla (Ref – CED).



• **Recomendaciones para las actuaciones del proyecto LIFE-GUGUY en relación al reforzamiento de poblaciones de acebuche**

Entendiendo que el fin último de las actividades de restauración/reforzamiento poblacional es preservar la biodiversidad y los procesos que han llevado a la configuración de la misma, nuestros resultados nos permiten realizar las siguientes recomendaciones:

1. La generación de planta para el reforzamiento de las poblaciones naturales de acebuche en la montaña del Cedro debería efectuarse a partir de poblaciones próximas que presenten los haplotipos encontrados en dicha localidad.

En este sentido, se descarta el uso de las poblaciones de montaña de Guía, por poseer un mayor número de variantes genéticas exclusivas, que han divergido sensiblemente con respecto al haplotipo CG-II, posiblemente por efecto del aislamiento poblacional.

También se desaconseja el uso de material procedente de Tenerife, a pesar de la similitud de haplotipos mostrada en este estudio, por la muy probable diferencia en estructura genética que revelarían marcadores de mayor resolución bajo las condiciones de fuerte aislamiento geográfico que existe entre ambas islas.

La población de Tirma, pese a contar con haplotipos similares a los del Cedro y ser geográficamente próxima, es técnicamente difícil de emplear como fuente semillero por el bajo número de ejemplares remanentes (alrededor de 20 plantas) y la baja accesibilidad de los individuos adultos.

La población que reúne las mejores condiciones es la de Tasarte, por su composición de haplotipos, proximidad geográfica y accesibilidad de individuos adultos. De hecho, uno de los individuos a partir de los que se han empezado a recolectar semillas para su uso en planes de reforzamiento presenta el haplotipo mayoritario en la montaña del Cedro (GC-II).

2. Sería altamente recomendable que las plántulas introducidas en la montaña del Cedro en actuaciones recientes de reforzamiento fueran traslocadas a poblaciones de la mitad oriental de la isla, dado que la marcada diferenciación genética existente entre el linaje occidental y el haplotipo asociado a dichas plántulas (GC-I), se contrapone claramente a la idea de preservar la biodiversidad conocida en ese área de la isla de Gran Canaria.



• **Recomendaciones adicionales para el reforzamiento/reintroducción de poblaciones de acebuche en la isla de Gran Canaria**

1. Fomentar un mejor conocimiento de las poblaciones naturales de acebuche no consideradas en este estudio, especialmente las conocidas en el sur y suroeste de la isla (Mogán, Aldea Blanca) y la zona septentrional de la isla (por ejemplo, Moya). En vista de los resultados obtenidos en este estudio, se podrían encontrar áreas que presenten variantes genéticas no conocidas hasta ahora.

2. Establecimiento de nuevas fuentes semillero que recojan la diversidad detectada en el presente estudio. Además de la definición de fuentes del haplotipo GC-II (Tasarte y, en la medida de lo posible, Tirma), la recolección de frutos en montaña de Guía permitiría contar con un material de propagación muy valioso en planes de recuperación de esa zona, donde el número de individuos es escaso.

3. Revisar las introducciones efectuadas con anterioridad en zonas de la mitad occidental de la isla, como por ejemplo en Tirma o en la montaña de Amagro, y determinar si los efectivos plantados se corresponden con el linaje occidental propio de la zona. Dado que la fuente semillero típica (Barranco de los Cernícalos, BCE) está claramente asociada al haplotipo GC-I, las introducciones efectuadas en los últimos años tienen altas probabilidades de no ser adecuadas con el mantenimiento de la diversidad genética local.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda prestada por las siguientes personas e instituciones durante la ejecución de este proyecto: el personal de Life+Guguy que participó en la recolección de muestras de la montaña del Cedro, especialmente Marta Martínez e Isabel Nogales; Carolina Ramírez ayudó en la extracción de ADN de parte de las muestras que se han empleado en este estudio; Stephan Scholz y Moisés Soto participaron en la recolección de algunas muestras; Águedo Marrero proporcionó información relevante para el muestreo de la población de Tirma; Guillaume Besnard facilitó datos sobre el uso de regiones plastidiales para los análisis genéticos. La Consejería de Medioambiente y Emergencias del Excmo. Cabildo de Gran Canaria financió el estudio molecular.



Bibliografía

- Avice JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Besnard G, Hernandez P, Khadari B, Dorado G, Savolainen V. 2011. Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology* 11: 80.
- CBD. 2014. Progreso en el logro de las metas de la estrategia mundial para la conservación de las especies vegetales 2011 – 2020 (UNEP/CBD/SBSTTA/18/3). <http://www.cbd.int/gspc/documents.shtml>
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19–21.
- Fernández Palacios JM. *et al.*, eds. 2008. *Los Bosques Termófilos de Canarias*. Proyecto LIFE04/NAT/ES/000064. Excmo. Cabildo Insular de Tenerife.
- García-Verdugo C, Fay MF, Granado-Yela C, Rubio de Casas R, Balaguer L, Besnard G, Vargas P. 2009. Genetic diversity and differentiation processes in the ploidy series of *Olea europaea*: a multiscale approach from subspecies to island populations. *Molecular Ecology* 18: 454–467
- García-Verdugo C, Forrest AD, Fay MF, Vargas P. 2010a. The relevance of gene flow in metapopulation dynamics of an oceanic island endemic, *Olea europaea* subsp. *guanchica*. *Evolution* 64: 3525–3536
- García-Verdugo C, Forrest AD, Balaguer L, Fay MF, Vargas P. 2010b. Parallel evolution of insular *Olea europaea* subspecies based on geographical structuring of plastid DNA variation and phenotypic similarity in leaf traits. *Botanical Journal of the Linnean Society* 162: 54–66
- Hess J, Kadereit JW, Vargas P. 2000. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Molecular Ecology* 9: 857–868.
- Juan C, Emerson BC, Oromí P, Hewitt GM. 2000. Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 104–109.
- Mijangos JL, Pacioni C, Spencer PBS, Craig MD. 2015. Contribution of genetics to ecological restoration. *Molecular Ecology* 24: 22–37.
- Reynolds LK, McGlathery KJ, Waycott M. 2012. Genetic diversity enhances restoration success by augmenting ecosystem services. *PLoS ONE* 7: e38397
- Society for Ecological Restoration International Science and Policy Working Group. 2004. *The SER International Primer on Ecological Restoration*. Tucson: Society for Ecological Restoration International.

