

Secuenciación masiva de ADN en conservación: desvelando la historia evolutiva de las especies litorales amenazadas de *Iberodes* (Boraginaceae)

DOI: 10.15366/cv2019.23.006

Iberodes M. Serrano, R. Carbajal & S. Ortiz es un género de Boragináceas subendémico de la península Ibérica, con poblaciones disyuntas en Francia (región sureste y costa oeste en el Golfo de Vizcaya). Este género comprende cinco espe-

cies de plantas anuales (una de ellas con dos subespecies) (Figura 1), originalmente consideradas dentro del género *Omphalodes* (Serrano *et al.*, 2016). Si tenemos en cuenta la especialización ecológica de las cinco especies, el género se

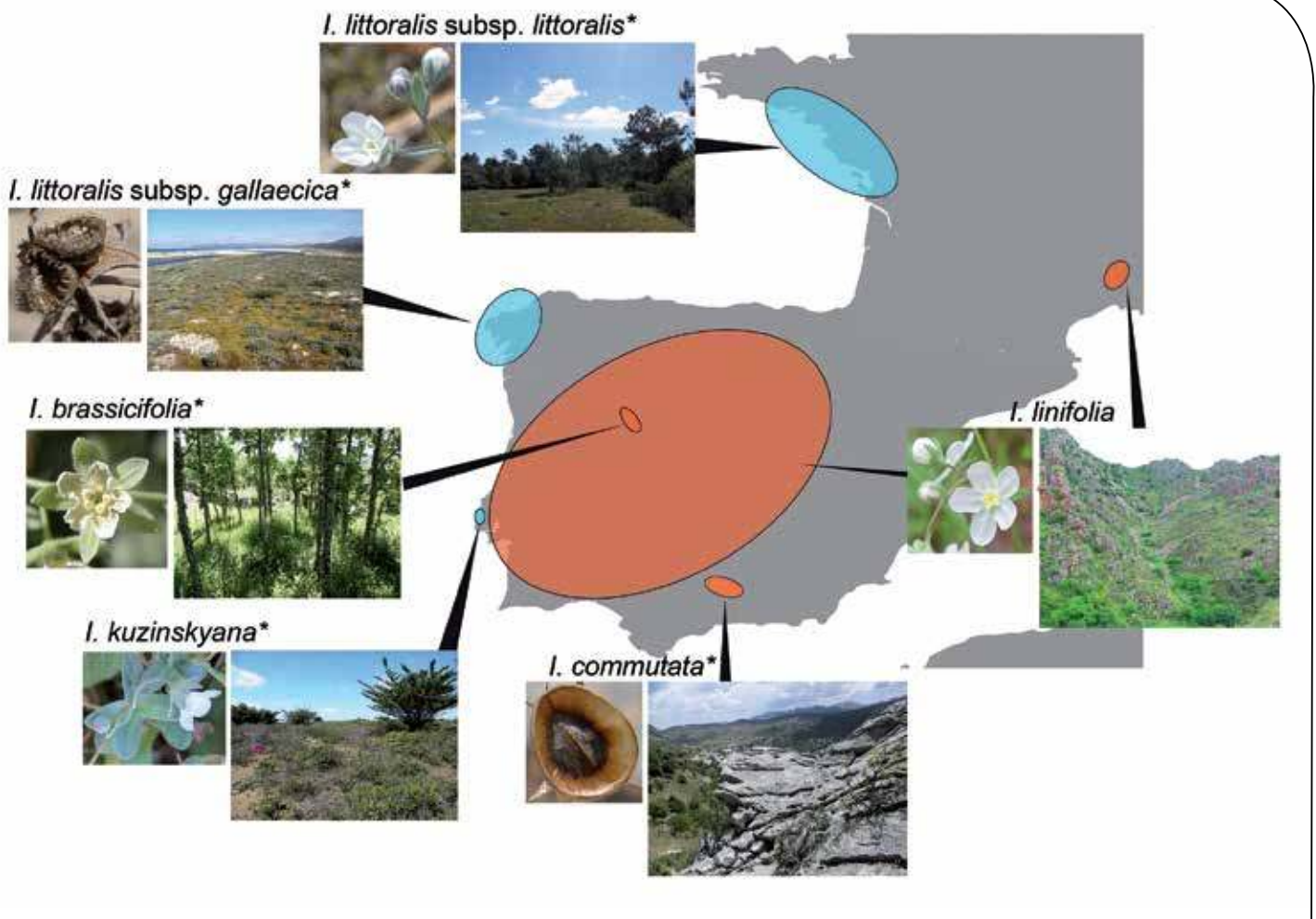


Figura 1: Áreas de distribución de las cinco especies de *Iberodes*. Las elipses coloreadas en azul indican los taxones de hábitat costero; las elipses en naranja marcan los taxones de interior. Los asteriscos designan aquellos que se encuentran catalogados como amenazados según los criterios de UICN.

puede dividir en dos grupos: por un lado, tres especies de ambientes continentales del interior; y por otro, dos especies litorales que viven sobre dunas costeras (Figura 1). Otra peculiaridad añadida de este género es que cuatro de las cinco especies están catalogadas dentro de las categorías de riesgo y amenaza de la UICN, y tres de ellas cuentan con protección legal de acuerdo con los catálogos regionales de Castilla y León y Galicia, el Catálogo Español, la Directiva de Hábitats y el Convenio de Berna (Tabla 1). Todos los taxones amenazados presentan una distribución extremadamente restringida (Figura 1) con una progresión negativa en las últimas déca-

das. Por ejemplo, *I. kuzinskyana* ha visto reducidas sus poblaciones durante el último siglo, de manera que hoy en día el 95% de los ejemplares se concentran en una única población (ICNB, 2007). La principal amenaza para estas especies parece ser la pérdida de hábitats favorables por impactos antrópicos de diversa índole. Particularmente, las poblaciones costeras de *I. kuzinskyana* (Lisboa) e *I. littoralis* subsp. *gallaecica* (Galicia) se han visto mermadas por la fragmentación, pérdida y deterioro del hábitat derivados de la construcción y explotación de estas zonas naturales (ICBN, 2007; López *et al.*, 2015). La quinta especie de *Iberodes* (*I. linifolia*) está

TAXÓN	CATEGORÍA DE AMENAZA UICN	PROTECCIÓN LEGAL
<i>I. brassicifolia</i> M.Serrano, R.Carbajal & S.Ortiz	EN B1ab(ii,v)c(ii,iv)+2ab(ii,v)c(ii,iv) (Moreno, 2008)	En Peligro de extinción Catálogo regional Castilla y León Anexo I (BOCyL, 2007)
<i>I. commutata</i> (G.López) M.Serrano, R.Carbajal & S.Ortiz	VU B1ab(i,ii,iii,iv,v)+2ab(i,ii,iii,iv,v) (Moreno, 2008)	—
<i>I. kuzinskyana</i> (Willk.) M.Serrano, R.Carbajal & S.Ortiz	CR A2a (LVP 2019)	Convenio de Berna, Directiva Hábitats Anexo II (prioritaria)
<i>I. littoralis</i> subsp. <i>gallaecica</i> (Lainz) M.Serrano, R.Carbajal & S.Ortiz	EN B2b(iii)c(iv) (Serrano & Carbajal, 2003)	En peligro de extinción Catálogo Español de Especies Amenazadas (BOE, 2011), Catálogo galego de especies amenazadas (DOG, 2007), Convenio de Berna, Directiva Hábitats Anexo II (prioritaria)
<i>I. littoralis</i> (Lehm.) M.Serrano, R.Carbajal & S.Ortiz subsp. <i>littoralis</i>	VU D2 (INPN, 2019; UICN, 2019)	Directiva Hábitats Anexo II (prioritaria)

Tabla 1: Categoría de amenaza según criterios de la UICN y protección legal en cada caso para los taxones amenazados de *Iberodes*.

ampliamente distribuida por la mayor parte de la mitad occidental de la Península, con algunas poblaciones aisladas en el sureste de Francia (Figura 1). En definitiva, la diversidad de los patrones geográficos, ecológicos y morfológicos dentro de *Iberodes*, unida al elevado porcentaje de taxones amenazados que engloba, hace que este género despierte un gran interés desde el punto de vista de la biología evolutiva y de la conservación.

En biología de la conservación es importante conocer la historia evolutiva que explica la distribución y características ecológicas actuales de las especies amenazadas, de cara a complementar las actividades de seguimiento y recuperación que llevan a cabo las distintas administraciones y centros de investigación. Para ello es fundamental, como punto de partida, contar con un contexto filogenético en el que enmarcar temporal y espacialmente la historia de las plantas amenazadas. De hecho, entender cómo han evolucionado las plantas en el pasado puede darnos pistas sobre qué cabe esperar a medio plazo, y así poder dirigir de una manera eficiente las medidas de conservación a tomar.

Durante las últimas décadas, se han ido mejorando las técnicas de secuenciación de ADN, y esto está permitiendo analizar con más precisión los escenarios de especiación en plantas. En la actualidad, las técnicas de secuenciación masiva permiten obtener una parte representativa del genoma de una especie. Esto, unido a la mejora en las capacidades informáticas para analizar grandes cantidades de datos, nos permite reconstruir la historia evolutiva de las especies incluso para casos especialmente complejos. De hecho, estas nuevas herramientas de secuenciación están permitiendo interpretar escenarios de especiación que hasta ahora habían sido difíciles de identificar, como la especiación parapátrida (diferenciación de dos especies entre las que no hay aparentes barreras físicas, y las áreas de distribución resultantes son adyacentes). Este modo de especiación es más difícil de detectar que aquel en el que la especiación se produce por la existencia de barreras físicas (especiación alopátrida), ya que la ausencia de tales barreras hace que pueda haber intercambio genético entre las especies que enmascara las relaciones de parentesco entre ellas, sobre todo en casos de especiación reciente. Sin embargo, las nuevas técnicas genómicas pro-

porcionan las herramientas necesarias para poder abordar con éxito las dificultades que entraña el estudio de especies de reciente especiación.

El propósito de nuestro estudio del género *Iberodes* (parte de la tesis doctoral de A.O.) ha sido reconstruir las relaciones evolutivas de sus cinco especies. En particular, perseguíamos inferir la historia evolutiva de las especies litorales, evaluando el papel de la geografía y la ecología en la génesis de estos particulares miembros del género. Para ello, hemos adoptado una aproximación integradora que combina tres fuentes principales de datos: genómicos, morfológicos y ecológicos. Tras tomar muestras de ADN de poblaciones representativas de las cinco especies de *Iberodes*, hemos aplicado la técnica de secuenciación masiva de sitios asociados a enzimas de restricción (*RAD-sequencing*). Esta técnica nos permite, de una manera rápida y económica, secuenciar una representación reducida del genoma, permitiendo así comparar genomas de especies muy estrechamente emparentadas en cualquier grupo de plantas. La técnica de *RAD-sequencing* nos permitió inferir el tiempo geológico en que se originaron las distintas especies, así como evaluar sus relaciones de parentesco y la estructura genética de cada una. Por otro lado, obtuvimos datos de caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos con los que hemos podido evaluar la diferenciación morfológica entre las especies. Finalmente, obtuvimos datos climáticos (variables de temperatura y precipitación) de las localidades de las especies de *Iberodes* para poder analizar el grado de diferenciación de sus preferencias climáticas, así como estimar sus áreas de distribución potencial en el presente y en el pasado.

***Iberodes linifolia*, ancestro vivo de las especies costeras amenazadas**

Como resultado de nuestro estudio, dedujimos que las especies de costa *I. kuzinskyana* e *I. littoralis* se habrían originado por diferenciación de poblaciones de la especie ancestral *I. linifolia*. Según nuestros análisis, las especies descendientes quedan anidadas filogenéticamente dentro de la especie progenitora (Figura 2), por lo que *I. linifolia* se considera una

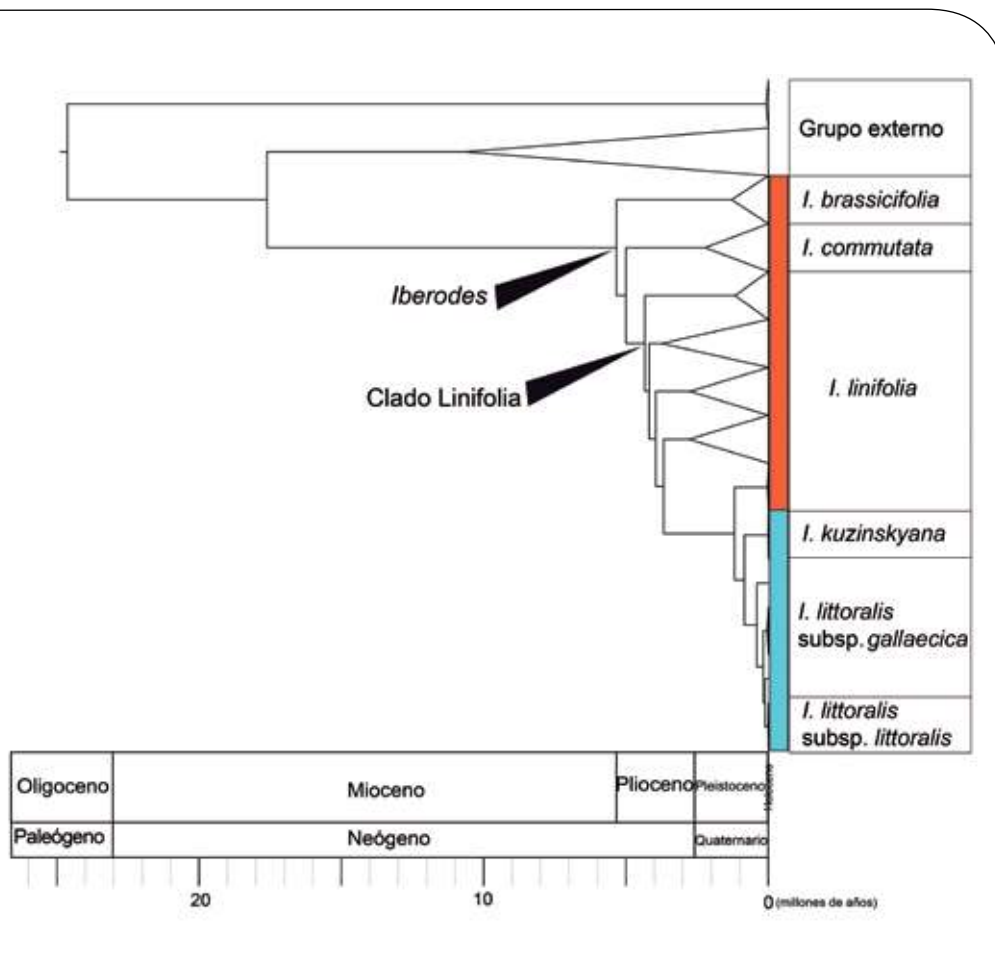


Figura 2: Filogenia datada del género *Iberodes*. Todas las ramas del árbol tienen apoyos superiores al 98%. Las especies de interior están señaladas con una barra vertical naranja y las especies de costa, con una barra de color azul.

especie parafilética. Las tres especies forman el denominado clado Linifolia, para el que hemos podido inferir procesos de especiación parapátrida y alopátrida en sentido oeste-noroeste de la Península y Francia. A pesar de que la parapatría es difícil de evaluar, la aproximación integradora de este estudio nos ha permitido encontrar diversas evidencias que apoyan este modo de especiación. En primer lugar, se aprecia solapamiento de las áreas de distribución potencial de *I. linifolia* e *I. kuzinskyana*, tanto en las modelizaciones en el presente como en el pasado. Es decir, hay una aparente ausencia de barreras físicas en tiempos pasados y recientes. Los datos morfológicos y climáticos indican una diferenciación reciente y gradual. En términos morfológicos, las tres especies forman grupos independientes, con *I. kuzinskyana* presentando caracteres intermedios. Igualmente, detectamos un bajo solapamiento de las preferencias climáticas de las tres especies, con un gradiente de diferenciación del interior hacia ambientes costeros con menor estacionalidad de la temperatura y mayores precipitaciones en el mes más seco (Figura 3). Por ello, la diferenciación y especiación ecológicas parecen haber jugado un papel importante en la diversificación del género. *Iberodes linifolia* forma un grupo genético bien diferenciado, sin aparente mezcla genética con las especies costeras, e *I. kuzinskyana* forma un grupo genético intermedio entre *I. linifolia* e *I. littoralis*. Por último, los resultados de otros autores y nuestras propias investigaciones apuntan a iguales niveles de ploidía, por lo que es poco probable una barrera cromosomática como motor de la especiación.

Colonización del litoral ibérico y Golfo de Vizcaya en los últimos tres millones de años

Cuando reconstruimos la historia evolutiva de las especies de costa, pudimos estimar que la diversificación de linajes en el clado Linifolia se inició durante el Plioceno Medio (3,85-3,6 millones de años), coincidiendo con el aumento de la estacionalidad (menor en la costa) que culminó con el establecimiento del clima Mediterráneo (hace 3,4-2,8 millones de años). Este periodo ha sido fundamental para la diferenciación de una gran parte de la flora mediterránea actual (Moreno, 2011). Los periodos glaciares/interglaciares posteriores del Pleistoceno (2,5-0,01 millones de años) favorecieron los movimientos de expansión y contracción geográfica de las especies, formándose zonas de refugio en las que se diferenciaron numerosos endemismos. Precisamente, la zona de solapamiento de las áreas potenciales de *I. linifolia* e *I. kuzinskyana* en el centro-oeste de Portugal es congruente con uno de los refugios glaciares propuestos por Médail & Diadema (2009). Igualmente, la diferenciación de

nicho y el aislamiento geográfico parecen haber tenido un papel fundamental en la diferenciación entre las especies y subespecies de costa. La especiación alopátrida parece ser el modo más plausible de diferenciación entre *I. kuzinskyana* e *I. littoralis* dada la distancia geográfica entre las áreas que ocupan estas desde el pasado reciente. Sin embargo, no podemos dilucidar si esta especiación (en el último millón de años) pudo estar determinada por un proceso de expansión y contracción de áreas, o bien por dispersiones a larga distancia a lo largo de la costa atlántica y posterior aislamiento geográfico, ya que las proyecciones a tiempos pasados solo nos permiten reconstruir la distribución de las especies en el pasado reciente (desde hace 140000 años hasta el presente). Por último, la diferenciación de las dos subespecies de *I. littoralis* estuvo aparentemente precedida de una expansión del rango de distribución desde la costa de Galicia a la costa oeste de Francia durante el último máximo glacial, seguida de un aislamiento geográfico debido a la contracción de la distribución en tiempos más recientes y subsecuente cambio de nicho climático que llevó a la diferenciación de las dos subespecies.

Taxonomía, historia evolutiva y conservación de poblaciones amenazadas

Como resultado del estudio de la biología evolutiva de *Iberodes* hemos observado que se repite un patrón escalonado (imbricado) de especiación, en el que unas especies (o subespecies) derivan de otras especies progenitoras que aún siguen vivas (Figura 2). En particular, la especialización eco-

lógica en ambientes costeros parece haber sido clave para la diferenciación de las especies amenazadas del litoral. Además, parece que las plantas costeras tienen a su vez nichos climáticos diferentes entre sí que les hacen conservar una entidad ecológica y evolutiva propia. Teniendo en cuenta el fuerte deterioro que están sufriendo estas áreas por causas antrópicas (cambio climático, sobreexplotación, etc.) resulta prioritario centrar los esfuerzos de conservación en mantener los hábitats de estas especies. Además, hemos podido deducir que, pese a que las dos especies de costa *I. kuzinskyana* e *I. littoralis* se encuentran anidadas dentro de *I. linifolia*, las

especies costeras son grupos evolutivos independientes y sin aparente flujo genético. Esto, unido a la diferenciación morfológica y climática de los tres representantes del clado Linifolia, nos permite confirmar con certeza que, pese a su parafilia, *I. linifolia* se comporta como una especie diferente de las costeras. De este modo, en lugar de circunscribir *I. kuzinskyana* e *I. littoralis* dentro de *I. linifolia* como meras formas subespecíficas, nuestro estudio aporta las pruebas que justifican sin lugar a duda su tratamiento como especies independientes y, en consecuencia, su consideración como linajes prioritarios a conservar dada su entidad evolutiva.

ANA OTERO¹, PEDRO JIMÉNEZ-MEJÍAS^{2,3},
MARIO FERNÁNDEZ-MAZUECOS¹, VIRGINIA VALCÁRCEL^{2,3},
ANDREW HIPPI^{4,5} Y PABLO VARGAS¹

1. Departamento de Biodiversidad y Conservación, Real Jardín Botánico (RJB-CSIC). Pza. de Murillo 2, 28014 Madrid, España. 2. Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global (CIBC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, España. 3. Departamento de Biología (Botánica), Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin, 2, 28049 Madrid, España. 4. The Morton Arboretum, 4100 Illinois Route 53, Lisle, IL 60532-1293, EE.UU. 5. The Field Museum, 1400 S Lake Shore Drive, Chicago, IL 60605, EE.UU.

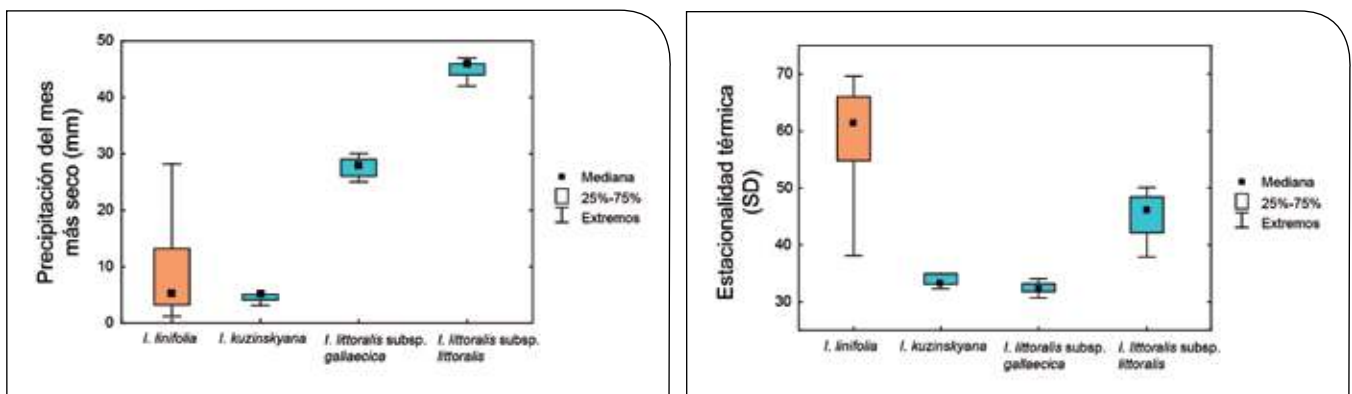


Figura 3: Gráfico box-plot de dos variables del nicho climático para cada uno de los cuatro taxones que forman el clado Linifolia.

Bibliografía

- BOCyL (2007). Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora. Boletín Oficial de Castilla y León (BOCyL) 119 (20/6/2007): 13197-13204.
- CEEA (2011). Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino «BOE» núm. 46, de 23 de febrero de 2011.
- DOG (2007). Decreto 88/2007 do 19 de abril, polo que se regula o Catálogo galego de especies ameazadas. Diario Oficial de Galicia, 89 (09/05/2007): 7409-7423.
- ICNB (2007). Plano Nacional de Conservação da Flora em Perigo (1ª Fase). Relatório Final. Volume IV. Instituto da Conservação da Natureza.
- INPN (2019). Liste Rouge de la Flore Vasculaire de Poitou-Charentes. Última consulta: 17 de Junio de 2019 en https://inpn.mnhn.fr/espece/listerouge/RG/LRR_flore_vasculaire_Poitou_Charentes_2018.
- López, L., R. Retuerto, S. Roiloa, X. Santiso & R. Barreiro (2015). A multi-faceted approach for assessing evolutionary significant conservation units of the endangered *Omphalodes littoralis* spp. *gallaecica* (Boraginaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17: 54-65.
- LVP (2019). Lista Vermelha da Flora Vascular de Portugal Continental. Última consulta: 17 de Julio de 2019 en <http://listavermelha-flora.pt/flora-singlet/?slug=Omphalodes-kuzinskyanae>
- Médail, F. & K. Diadema (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* 36: 1333-1345.
- Moreno, J.C., coord. (2008). Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino) y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, Madrid.
- Moreno, J.C. (2011). La diversidad florística vascular española. *Memorias Real Sociedad Española Historia Natural*, 2ª ep. 9: 75-107.
- Serrano, M. & R. Carbajal (2003). *Omphalodes littoralis* subsp. *gallaecica* M. Lainz. En: Bañares, A., G. Blanca, J. Güemes, J.C. Moreno & S. Ortiz. (Eds.) *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*: 274-275. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Serrano, M., R. Carbajal, A. Pereira Coutinho & S. Ortiz (2016). Two new genera in the *Omphalodes* group (Cynoglosseae, Boraginaceae). *Nova Acta Scientifica Compostelana (Biologia)* 23: 1-14.
- IUCN (2019). *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019.1*. Última consulta: 17 de Junio de 2019 en www.iucnredlist.org.