

INFORME SOBRE LA  
VIABILIDAD GENÉTICA  
DE LA TRASLOCACIÓN  
DEL SEBADAL DE  
GRANADILLA AL  
SEBADAL DE SAN  
ANDRÉS EN TENERIFE

# INFORME SOBRE LA VIABILIDAD GENÉTICA DE LA TRASLOCACIÓN DEL SEBADAL DE GRANADILLA AL SEBADAL DE SAN ANDRÉS EN TENERIFE

**Redacción:** Pablo Manent Sintés

**Coordinación:** Nieves González Henríquez

*Nieves González*



Instituto Canario de Ciencias Marinas

# **1. Análisis de la viabilidad genética del sebadal de San Andrés (Tenerife)**

<b>1.1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Material y métodos.....</b>	<b>1</b>
<b>Recolección de las muestras .....</b>	<b>1</b>
<b>Procesado de las muestras .....</b>	<b>2</b>
<b>Discriminación de clones.....</b>	<b>3</b>
<b>Análisis genético de los datos.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Resultados.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Variación genética poblacional.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Diferenciación interpoblacional.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Discusión.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5. Conclusiones.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Agradecimientos.....</b>	<b>14</b>
<b>1.7. Referencias.....</b>	<b>15</b>

# 1. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD GENÉTICA DEL SEBADAL DE SAN ANDRÉS (TENERIFE)

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Para objetivos de gestión, el mantenimiento de las poblaciones de fanerógamas marinas debe de estar basado en cuestiones sobre la estructura genética incluyendo la comprensión de la conectividad entre las poblaciones de fanerógamas marinas a lo largo de las áreas costeras. Esto incluye valoraciones sobre el flujo genético, la deriva genética, la influencia del efecto fundador, las ventajas de la heterocigosidad, la identificación de presiones selectivas así como determinar la existencia de metapoblaciones (sensu Orth et al., 1994).

Entonces, el estudio genético de *C. nodosa* permitirá comprender algunos conceptos y procesos fundamentales en genética de poblaciones y evolución que influyen en (i) el mantenimiento y generación la diversidad genética, y que explican el éxito o el declive de las poblaciones, en (ii) las relaciones entre las diferentes poblaciones, que pueden permitir interpretar patrones de migración o seleccionar poblaciones receptoras para acciones de restauración (Falk et al., 2001), y (iii) la interacción de las variables genéticas con procesos bióticos (intrínsecos a los organismos y dependientes de su linaje y biología reproductiva) y abióticos (dependientes de contingencias históricas o ambientales).

El objetivo principal de este informe, a través de la información genética que se posee sobre las poblaciones de *Cymodocea nodosa* analizadas en Tenerife, es intentar determinar si la opción propuesta por Puertos del Estado-Puertos de Tenerife para trasladar parte del sebadal de Granadilla, afectado directamente por la construcción de un dique de abrigo, hacia el sebadal de San Andrés es viable desde el punto de vista genético o por lo menos, si no se puede llegar a ese punto, mostrar nuestra visión o perspectiva ante esta acción aplicando conocimientos de restauración genética, y prevenir o alertar de posibles acciones no exitosas que todavía pueden ser evitadas debido a que no se han empezado las obras ni se ha trasplantado el material vegetal hacia ningún lugar de destino.

## 1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### *Recolección de las muestras*

Durante los años 2003, 2006 y 2007 se recolectaron muestras de varias poblaciones de *C. nodosa* en la isla de Tenerife (Tabla1). En la población de Granadilla, debido a la gran superficie ocupada por el sebadal, se llevó a cabo un muestreo que abarcara prácticamente toda el área de distribución de las plantas para conseguir una estimación adecuada de la diversidad genética de la zona. Así, se recolectaron muestras en 8 estaciones de muestreo.

Junto con los datos asociados a estos muestreos desarrollados por el ICCM, se analizaron también los datos correspondientes a los sebadales de Las Teresitas, El Médano y San Juan, que habían sido muestreados y genotipados con anterioridad por el

Dr. Filipe Alberto (Alberto et al. 2006, Alberto et al. 2007) y cedidos para su análisis en conjunto con el resto de poblaciones por el equipo de investigación liderado por la Dra. Ester Serrão (MAREE-CCMAR-Universidade do Algarve).

TABLA 1: Localización de las poblaciones muestreadas en la isla de Tenerife. (L: Latitud, l: longitud, P: Profundidad aproximada)

Localidad	L	l	P
Las Teresitas	28.042198°	-16.536313°	14-16
Bahía Poris	28.163632°	-16.430848°	7-9
Granadilla-I	28.047275°	-16.526762°	12-14
Granadilla-II	28.047932°	-16.526032°	12-14
Granadilla-III	28.051048°	-16.522233°	12-14
Granadilla-IV	28.051856°	-16.521631°	12-14
Granadilla-V	28.061680°	-16.510684°	8-9
Granadilla-VI	28.061853°	-16.511658°	8-9
Granadilla-VII	28.058823°	-16.516277°	8-9
Granadilla-VIII	28.059309°	-16.517293°	8-9
El Medano	28.043133°	-16.535957°	7-8
Los Cristianos	28.048311°	-16.726315°	12-13
San Juan	28.178221°	-16.813463°	1
Los Gigantes	28.312464°	-16.881212°	14-16

En cada población se realizó un muestreo aleatorio dentro de una cuadrícula de 60 x 14 m<sup>2</sup>, en la que se recolectaron 40 muestras o “ramets” al azar dentro de dicho área. Las muestras estaban formadas por un mínimo de 3 haces conectados por el mismo rizoma (por tanto, se trataba del mismo individuo genético). Para cada muestra, se limpiaron las hojas de epífitos y se pasaron con agua dulce. Acto seguido, se dejaron secar en papel de periódico para eliminar el máximo de humedad posible antes de introducirlas en bolsas individuales codificadas, donde se mantuvieron conservadas en gel de sílice hasta su completo secado para su posterior procesado en el laboratorio.

#### *Procesado de muestras*

El trabajo de laboratorio consistió en la extracción del DNA a partir del material vegetal de cada muestra en forma de polvo. Se siguió el método de extracción CTAB 2X (Doyle y Doyle, 1988) con algunas modificaciones optimizadas para la especie en estudio (Alberto F., datos no publicados). Basadas en los tiempos y las revoluciones por minuto que debían llevarse a cabo en los pasos de centrifugación, en un reajuste de las cantidades y volúmenes de los reactivos a usar durante el protocolo.

Después de la extracción, se utilizaron 3 multiplex PCR con marcaje fluorescente para analizar un total de 8 loci microsatélites en un secuenciador automático ABI 377 mediante el uso del software GENESCAN (Applied Biosystems). Se siguieron las indicaciones de amplificación y genotipado utilizadas en Alberto et al (2005).

*Cymodocea nodosa* puede reproducirse tanto asexualmente (creciendo de un modo vegetativo y con la capacidad de crear unidades modulares repetitivas, clones o “ramets” del mismo individuo genético o “genet”) como sexualmente (cuando se crean individuos genéticamente diferenciados a partir de eventos de recombinación tras la fusión de los gametos).

Puesto que nuestros datos genéticos identifican a cada muestra recolectada (o ramet) mediante un determinado genotipo formado por combinaciones alélicas correspondientes a 8 loci (que denominaremos desde ahora MLG, por “Multi-Locus Genotype”), cuando los MLG que representan a 2 o más muestras son iguales hemos de evaluar si (i) son resultado de eventos de clonalidad (y, por tanto, pertenecen al mismo genet), o (ii) se trata de individuos sexuales (genets diferentes) que, por azar, comparten idénticos MLGs. Mientras que disponer de la matriz completa (ramets + genets) es imprescindible desde el punto de vista de estructura genética intra-poblacional, para evaluar el impacto de la clonalidad y estimar el área donde esperamos encontrar clones, las estimaciones de los niveles de diversidad genética y de las relaciones entre las subpoblaciones deben basarse solamente en la matriz de genets, pues que de lo contrario estaríamos dando mayor peso a los alelos que estuvieran representados en los clones.

La matriz inicial de MLGs (compuesta por ramets y genets) se analizó estadísticamente para identificar los MLGs que podrían representar clones que formaban un solo genet y eliminarlos de la matriz a utilizar para el análisis de diversidad genética. Para iniciar este proceso, se eliminaron primero de la matriz inicial todas las réplicas que podían ser clonales y se testó la hipótesis de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) para cada una de las poblaciones mediante un test exacto de probabilidad (Raymond y Rousset, 1995a).

Con estos resultados, siguiendo las indicaciones de Arnaud-Haond et al (2007), Arnaud-Haond et al (2005), Park y Werth (1993) y Sydes y Peakall (1998), se calcularon sobre la matriz inicial la probabilidad de aparición de cada MLG ( $P_{\text{GEN}}$ ) y la probabilidad de que 2 copias o más de un MLG se hayan formado a partir de eventos sexuales ( $P_{\text{SEX}}$ ) teniendo en cuenta el coeficiente de consanguinidad  $F_{\text{IS}}$  (Weir y Cokerham, 1984).  $P_{\text{GEN}}$  y  $P_{\text{SEX}}$  se calcularon usando el programa informático GENECLONE 1.1 (no publicado pero modificado a partir de Arnaud-Haond y Belkhir, 2007). Se ha considerado como individuos derivados de eventos sexuales a las 2 o más copias de MLGs con una  $P_{\text{SEX}}$  mayor de 0.05.

### *Análisis genético de los datos*

La riqueza genotípica se estimó por población según Dorken y Eckert (2001) como:

$$R = (G-1)/(N-1)$$

Donde  $G$  es el nº de MLGs observados y  $N$  el nº de muestras (ramets) analizadas.

Después de eliminar los ramets que pertenecían a un mismo genet del conjunto de datos, se estimaron las frecuencias alélicas y el coeficiente de consanguinidad  $F_{IS}$  (Weir y Cokerham, 1984) y se testó nuevamente la hipótesis de equilibrio HW para cada población como se explicó anteriormente. Todos estos análisis se llevaron a cabo usando el programa informático GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995b).

El programa Transformer-3 (Caujapé-Castells y Baccarani-Rosas 2005) se utilizó para la transformación rápida y sin errores de la matriz de genotipos en los archivos de entrada requeridos por cada programa informático de análisis de datos genéticos utilizado. Los estimadores básicos de variación genética poblacional [nº de loci polimórficos  $P$  (criterio 0.99), la heterocigosidad observada ( $H_{obs}$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_{exp}$ )] se calcularon mediante el programa BIOSYS-1 versión 1.7 (Swofford y Selander, 1989). Se estimó también para cada población la riqueza alélica  $\hat{A}$  (Alberto et al. 2006; Leberg, 2002) utilizando la rutina standArich (Alberto 2006, no publicado) dentro del paquete estadístico R (R Development Core Team).

La diferenciación poblacional se analizó teniendo en cuenta diferentes niveles jerárquicos. Por un lado, se estudió si había diferencias significativas en la distribución alélica entre pares de poblaciones estimando el  $P$ -valor usando el test exacto de Fischer, mediante el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995a, b). Por otro lado, se estimaron los valores del estadístico de variabilidad genética interpoblacional  $F_{ST}$  y se estudió si había diferencias significativas en las varianzas de las frecuencias alélicas mediante un ANOVA (Weir y Cokerham, 1984).

El grado de conectividad o aislamiento genético entre las poblaciones muestreadas se examinó testando la hipótesis de aislamiento por distancia (IBD) (Wright, 1943; Rousset, 1997) mediante el test de Mantel (Mantel, 1967) usando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995b).

Se realizó así mismo un análisis cluster a nivel poblacional para la isla de Tenerife basado en el coeficiente de identidad genética no sesgado de Nei (1978), usando el programa informático BIOSYS-1 versión 1.7 (Swofford y Selander, 1989).

### 1.3. RESULTADOS

#### *Variación genética poblacional*

Fueron genotipados 542 ramets de *Cymodocea nodosa* de las 7 localidades muestreadas en la isla de Tenerife, revelando un total de 51 alelos y 403 MLGs para los 8 loci analizados.

El número de genets por población estuvo entre 9 (en punta Teno) y 256 (en Granadilla). Sin embargo, estos resultados están afectados por el tamaño de la muestra y, por lo tanto, la riqueza genotípica  $R$  es el parámetro que estandariza en mayor medida estos sesgos, mostrando el máximo valor en el Medano, muy cercano a Granadilla geográficamente y el mínimo valor en Punta Teno (Tabla 2).

Como se explicó anteriormente en la parte de material y métodos, *C. nodosa* es una planta clonal y por lo tanto, puede haber MLGs iguales que no sean clones y en consecuencia individuos sexuales. En las poblaciones del estudio, se encontraron un máximo de 3 individuos sexuales con idénticos MLGs en Las Teresitas y un mínimo de 1 en Punta Teno. Hay que destacar que en Granadilla sólo se detectaron 2 MLGs que pertenecían a individuos sexuales, a pesar de que el tamaño de la muestra en esta localidad fue muy superior al del resto. Este hecho se vio reflejado en su elevada  $R$ , por lo que el análisis del  $P_{SEX}$  se llevó a cabo en pocos ramets.

TABLA 2: Valores de los descriptores básicos de la variación genética de *Cymodocea nodosa* para las poblaciones muestreadas en Tenerife. N: número de ramets muestreados, G: número de genets,  $R$ : riqueza genotípica, A: número de alelos,  $\hat{A}$ : riqueza alélica después de la estandarización para  $G(23)$ ,  $H_{obs}$  y  $H_{exp}$ : heterozigosidad observada y esperada,  $P$ : porcentaje de loci polimórficos (criterio 0.99) y  $F_{IS}$ : coeficiente de consanguinidad. Salidas significativas del equilibrio Hardy-Weinberg: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

Localidad	N	G	R	A	$\hat{A}$	$H_{obs}$	$H_{exp}$	P	$F_{IS}$
Las Teresitas (TER)	37	25	0.667	20	2.83 ± 0.08	0.38 ± 0.08	0.38 ± 0.08	87.5	0.01
Bahía del Porís (POR)	40	23	0.564	22	2.75	0.44 ± 0.13	0.37 ± 0.08	87.5	-0.18 **
Granadilla (GRA)	311	256	0.823	42	3.44 ± 0.28	0.44 ± 0.07	0.45 ± 0.07	100	0.03 **
El Medano (MED)	36	34	0.943	27	3.33 ± 0.12	0.35 ± 0.09	0.43 ± 0.09	100	0.18 *
Los Cristianos (CRI)	39	27	0.684	19	2.34 ± 0.06	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.05	100	0.02
San Juan (JUA)	39	29	0.737	22	2.66 ± 0.12	0.30 ± 0.10	0.28 ± 0.09	87.5	-0.08
Punta Teno (TEN)	40	9	0.205	16	2.00	0.50 ± 0.16	0.33 ± 0.10	75	-0.56 *

El parámetro  $R$  describe la importancia relativa entre la reproducción sexual y la clonalidad de la especie, por lo que los valores obtenidos delatan que el mantenimiento de las poblaciones de la especie en Tenerife depende en gran medida de la reproducción sexual. Esto se puede apreciar mejor considerando el valor global de  $R$  para la especie en Tenerife ( $R = 0.743$ ). Sin embargo, el mínimo valor encontrado de  $R$  y de  $\hat{A}$  (en Punta Teno) indican que la clonalidad es una estrategia importante en esta población, debido seguramente a su escaso tamaño poblacional e aislamiento genético que impide la entrada de inmigrantes de otras poblaciones vecinas que podrían ayudar a aumentar estos valores.

La distribución de las frecuencias alélicas (Fig.1) muestra que Granadilla es la población con mayor número de alelos (ver también Tabla 2) representando el 82.4% de la variación alélica total. El Médano, Bahía del Porís y San Juan poseen también valores elevados de este parámetro (53% y 43.1% respectivamente) y Punta Teno a pesar de tener una  $R$  muy baja representa el 31.4% de la variación alélica, no tan alejada de la población de las Teresitas o Los Cristianos (39.2 y 37.3%, respectivamente).

Se encontraron alelos exclusivos (Tabla 3) en algunas poblaciones como Granadilla (con 10), Bahía del Porís, El Medano y San Juan (con 2 cada una) y Los Cristianos (con 1) mientras que el resto de alelos se encontraron en varios sebedales. Si



consideráramos Granadilla y El Médano como una sola población debido a su proximidad geográfica y a la continuidad de la pradera, dicho sebadal albergaría 14 alelos exclusivos (2 alelos compartidos por ambas poblaciones son diferentes a los exclusivos de cada una).

Estos alelos exclusivos, junto a otros compartidos pero en muy baja frecuencia, llegaron a ser considerados como raros según el criterio de Caujapé-Castells y Pedrosa-Comfort, (2004) y en base a la metodología estadística sugerida en Bengtsson et al (1995) para el tratamiento de los datos. Se encontraron un total de 30 alelos raros, de los cuales Granadilla tiene 24 (80%), 13 de ellos compartidos con 1 ó 2 poblaciones y 11 exclusivos (36,7%). En el resto de sebadales, detectamos un máximo de 6 alelos raros (en el Médano) y un mínimo de uno (en Punta Teno).

TABLA 3: Alelos raros para los 8 loci analizados en *Cymodocea nodosa* y su localización en las praderas de Tenerife. F: frecuencia total.

	ALELO	F	Localización
Cn2-16:	108	0.015	BAP, GRA, CRI
	112	0.093	GRA
	118	0.002	GRA
	120	0.004	GRA
Cn2-18:	108	0.054	GRA, CRI, TEN
	112	0.029	GRA, MED
	116	0.004	GRA
	118	0.004	GRA
	122	0.014	GRA
	124	0.02	GRA
Cn4-29:	204	0.067	BAP, GRA
	206	0.065	BAP
Cn2-45:	222	0.015	MED
	226	0.034	TER, GRA
	228	0.004	GRA
	230	0.008	GRA
Cn2-38:	201	0.043	BAP, GRA
	205	0.074	GRA, MED
Cn2-14:	220	0.017	JUA
	228	0.035	BAP, GRA
	232	0.011	TER, GRA
Cn2-24:	173	0.002	GRA
	179	0.002	GRA
	183	0.034	JUA
	193	0.023	GRA, MED
	197	0.072	GRA, MED, JUA
	199	0.038	MED, JUA
Cn4-19:	224	0.019	CRI
	238	0.096	TER, GRA
	242	0.012	TER, GRA, MED

Las poblaciones de Bahía del Porís, Granadilla, El Médano y Punta Teno no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg. En la primera y la última fué debido a un exceso significativo de herocigotos y las 2 restantes a un déficit de heterocigotos (ver valores de  $F_{IS}$  en la tabla 2). El valor positivo más elevado se estimó para El Médano, indicando una posible consanguinidad.

Para el resto de  $F_{IS}$  positivas, los niveles de homocigosidad son bajos y la consanguinidad no parece ser tan importante.

Los estimadores básicos de variación genética por población se ofrecen en la Tabla 2. Los valores de riqueza alélica ( $\hat{A}$ ), heterocigosidad esperada ( $H_{exp}$ ) alcanzan sus valores máximos en Granadilla ( $3.44 \pm 0.28$  y  $0.45 \pm 0.07$  respectivamente). Sin embargo, el mínimo de  $\hat{A}$  (2.00) lo encontramos en Punta Teno y el de  $H_{exp}$  ( $0.28 \pm 0.09$ ) en San Juan. Todos los sebadales mostraron proporciones muy elevadas de loci polimórficos ( $P$ ), que nunca bajaron del 75% obtenido para Punta Teno.

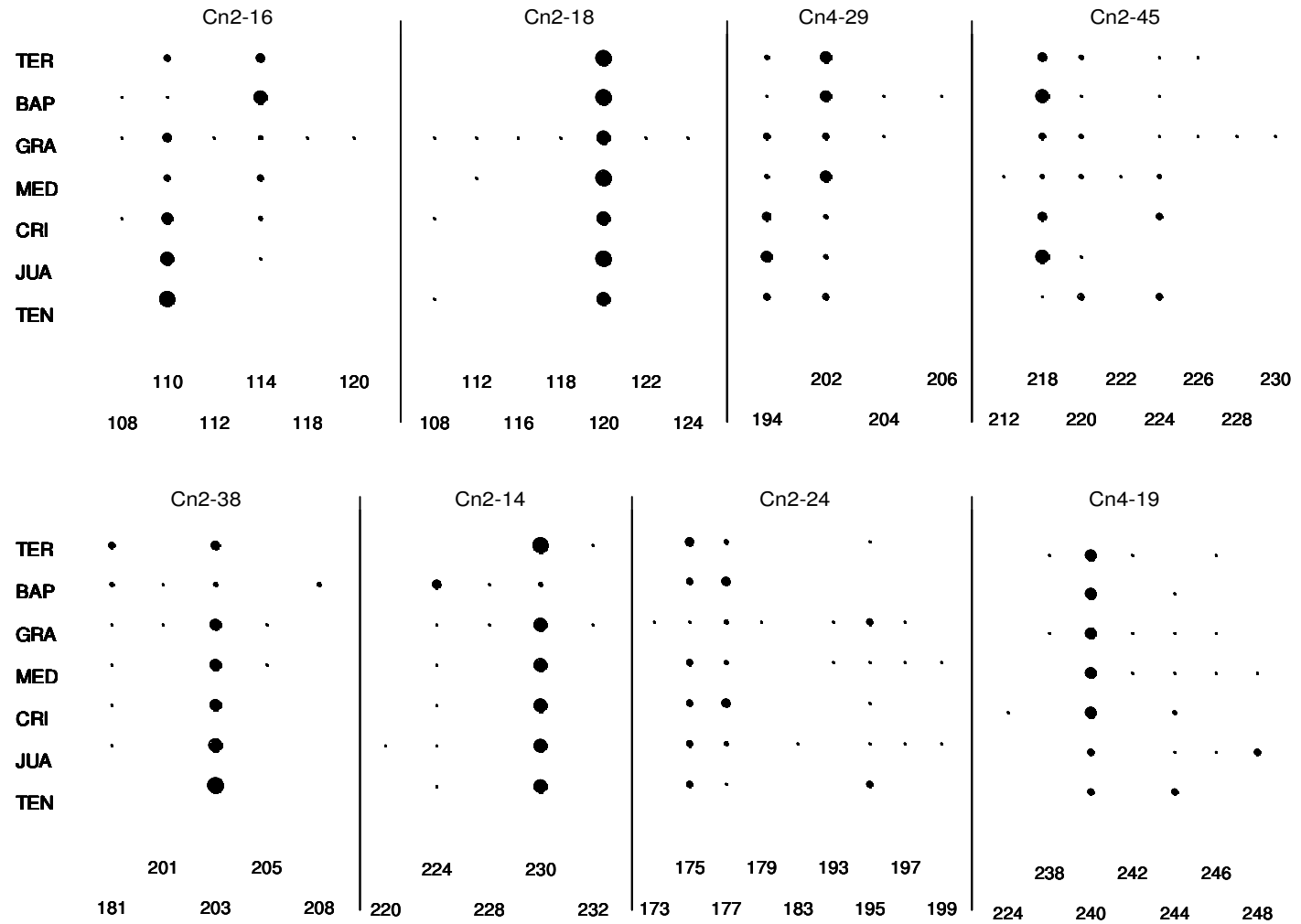


Fig. 1: Distribución de las frecuencias alélicas de los 8 loci analizados para *C. nodosa* en las poblaciones de Tenerife. Círculos: alelos; Diámetro de los círculos: frecuencia alélica.

## Diferenciación interpoblacional

Todas las poblaciones muestreadas estuvieron genéticamente diferenciadas y se rechazó la hipótesis nula de distribución alélica igual entre poblaciones ( $p < 0.001$  en todos los casos).

El análisis de los  $F$ -estadísticos globales (Tabla 5) muestra un promedio de diferenciación interpoblacional para *C. nodosa* en Tenerife de  $F_{ST} = 0.130$ . A nivel poblacional la diferenciación genética entre individuos sufrió una disminución importante con  $F_{IS} = 0.016$ . Sin embargo, considerando el total de genets de todas las poblaciones también se observa una diferenciación mucho mayor ( $F_{IT} = 0.144$ ), parecida a la  $F_{ST}$ . A nivel de cada locus individual, Cn2-16 y Cn2-14 presentaron los valores más elevados a nivel interpoblacional, por lo que contribuyen más a explicar las divergencias genéticas encontradas.

Entre pares de poblaciones, los valores de  $F_{ST}$  calculados (Tabla 5) muestran un mínimo entre las Teresitas y el Médano ( $F_{ST} = 0.019$ ), y un valor máximo entre Bahía del Porís y Punta Teno ( $F_{ST} = 0.444$ ). Granadilla ostentó unos valores parecidos oscilando entre  $F_{ST} = 0.246$  (Granadilla-Bahía del Porís) y  $F_{ST} = 0.034$  (Granadilla-El Médano). Los valores de  $F_{ST}$  detectados en los pares de poblaciones Las Teresitas - El Médano ( $F_{ST} = 0.019$ ), Granadilla - Los Cristianos ( $F_{ST} = 0.075$ ) y en Las Teresitas - Granadilla ( $F_{ST} = 0.075$ ) fueron los más bajos indicando una menor diferenciación entre estos pares de poblaciones.

TABLA 5: Matriz de valores de diferenciación genética entre las poblaciones de *Cymodocea nodosa* en Tenerife a través del estimador  $F_{ST}$  (Weir y Cokerham, 1984)

	Teresitas	B. Porís	Granadilla	Medano	Cristianos	San Juan
B. Porís	0.206					
Granadilla	0.075	0.246				
Medano	0.019	0.212	0.034			
Cristianos	0.130	0.312	0.070	0.085		
San Juan	0.240	0.434	0.135	0.198	0.144	
Punta Teno	0.230	0.444	0.106	0.131	0.135	0.241

Para el análisis de aislamiento por distancia (IBD) se han considerado 2 escenarios (Fig. 2). En el primero se consideró a Granadilla como se había considerado en todos los análisis anteriores, es decir utilizando el tamaño muestral total formado por 256 genets (ver tabla 2). En este caso, no se detectó una relación significativa entre la distancia genética y la geográfica ( $R = 0.24$ ,  $p = 0.35$ , Mantel test).

En el segundo escenario (considerando las 8 unidades de muestreo de Granadilla (ver Tabla 1) por separado en el análisis IBD), sí se detectó una correlación elevada y fuertemente significativa entre la distancia genética y la geográfica ( $R = 0.41$ ,  $p = 0.005$ ,

Mantel test). Esto indica que cuando introducimos nuevos valores de  $F_{st}/(1-F_{st})$  relativos a distancias mucho menores que en el análisis anterior: 100 m (entre pares de unidades de Granadilla: GI-GII, GIII-GIV, GV-GVI, GVII-GVIII), 500 m (GIGII-GIIIGIV, GVGVI-GVIIGVIII) y 2000 m (GIGIIGIIGIV-GVGVIGVIIGVIII), se encontró un patrón de aislamiento por distancia.

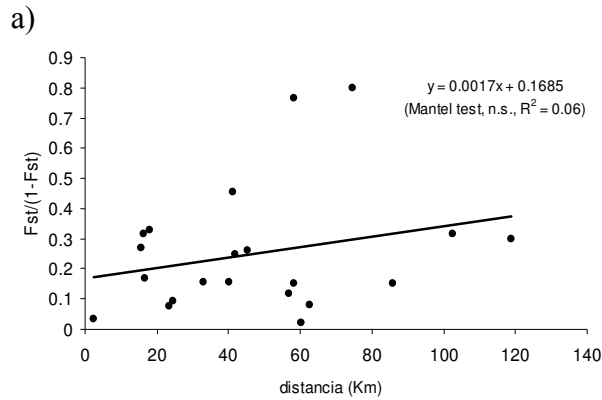


TABLA 4: Valores globales de los  $F$ -estadísticos (Weir y Cokerham, 1984) para *Cymodocea nodosa* en Tenerife

Locus	Fwc(is)	Fwc(st)	Fwc(it)
Cn2-16	0.048	0.197	0.236
Cn2-18	0.036	0.022	0.057
Cn4-29	0.060	0.112	0.165
Cn2-45	0.076	0.103	0.171
Cn2-38	0.094	0.101	0.185
Cn2-14	-0.112	0.205	0.116
Cn2-24	-0.096	0.126	0.042
Cn4-19	-0.007	0.132	0.126
todos	0.016	0.130	0.144

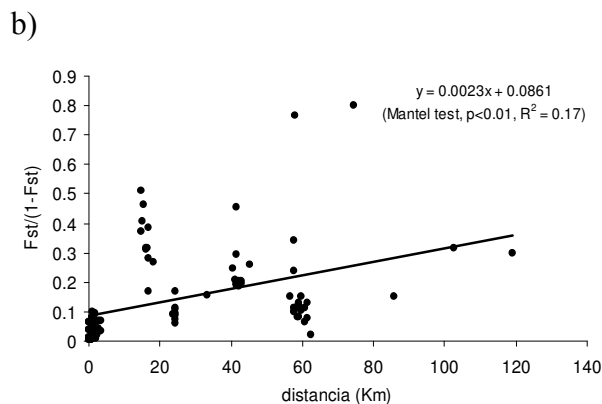


Fig. 2: Aislamiento por distancia (IBD) para las poblaciones de *Cymodocea nodosa* en Tenerife. Considerando a) Granadilla como una población y b) Granadilla como 8 unidades de muestreo. Los puntos representan pares de valores de distancia genética y geográfica entre poblaciones y/o unidades de muestreo. Los valores de la regresión estimados de la pendiente, intercepto y  $R^2$ . Además del  $p$ -valor del test de Mantel (Mantel, 1967).

Finalmente, el análisis cluster con la distancia genética de Nei (1978) resolvió 3 grupos. El primero de ellos estuvo formado por Las teresitas, El médano y Granadilla como subgrupo principal unido a Los Cristianos de forma más débil (Fig. 3). El segundo grupo estuvo formado por los sebadales de San Juan y Punta Teno. Finalmente, el tercer grupo encontraríamos el sebadal de la bahía del Porís muy alejado del resto de poblaciones.



de elegir el sebadal de San Andrés como zona receptora es una buena elección “genética” para la especie.

En este sentido, una buena práctica en ausencia de conocimiento es trasladar material entre zonas próximas geográficamente; sin embargo, nuestra selección ha ido en otro sentido: la zona donante y receptora deben compartir condicionantes ecológicos y su proximidad no tiene por que ser necesariamente geográfica, sino “ecológica”. Consecuentemente, y bajo un marco evolutivo, si los genes regulan los procesos fisiológicos, las características del ciclo biológico y del comportamiento, tolerancia a condiciones ambientales extremas, capacidades de dispersión y colonización, etc. (Raven, Evert, y Eichhorn 1986) y las estructuras genéticas de las poblaciones están en equilibrio dinámico con las variables o procesos ecológicos que las han creado y mantenido por efecto de la selección, es lógico pensar que esta premisa es acertada en cuanto a que podemos predecir que los individuos trasplantados presentan la aptitud de poder crecer y reproducirse en esas nuevas condiciones y posiblemente no alterará gravemente su estructura genética poblacional. Ejemplos se encuentran en la literatura (Proccacini y Piaci, 2001; Knapp y Rice, 1998).

Por lo tanto, y como punto positivo de partida para el éxito del supuesto trasplante, a priori parece ser que *Cymodocea nodosa* comparte unas condiciones ecológicas semejantes en la isla de Tenerife, aunque con algunas particularidades locales que respondan a una diferenciación genética poblacional que intentaremos explicar y enfocar hacia un correcto manejo de la especie para este caso concreto en cuestión.

La diversidad genética de las poblaciones es un aspecto muy importante en restauración genética y debería poder tenerse en cuenta ante cualquier decisión de este tipo. Entonces, atendiendo a los resultados sobre los descriptores de variación genética poblacional y centrándonos en los datos de la pradera donante, Granadilla tuvo la mayor riqueza alélica y heterocigosidad esperada de los sebadales analizados y unos valores de  $F_{ST}$  bajos en general. Además, presentó más del 80% de la variación detectada representada por alelos comunes compartidos con el resto de poblaciones. Esto podría explicar un intercambio genético mayor con las poblaciones vecinas, y en menor medida con las lejanas situadas en la costa SW. La elevada proporción de alelos raros neutrales que hemos detectado con los microsatélites pueden estar indicando la presencia de alelos con potencial selectivo. Éstos representan subproductos evolutivos exclusivos para la población, y pueden otorgar propiedades ventajosas ante eventuales fenómenos estocásticos ambientales. Sin embargo, hay que ser consecuente y sin duda, el mayor número de muestras recolectadas en esta población ha podido influir en este resultado.

En este sentido, la pradera de Granadilla ofrece un reservorio genético muy importante a nivel de todo el archipiélago y por supuesto de los sebadales de Tenerife, por lo que debe considerarse muy importante tomar una decisión de trasplante apropiada para no perder esta característica intrínseca a la población y que el éxito sea beneficioso en términos de resistencia y persistencia para el conjunto de sebadales en Tenerife.

Desde el punto de vista de la restauración genética, y atendiendo a los niveles de diferenciación poblacional, esta cantidad de variación genética hace que esta pradera sea

una opción óptima para trasladar plantas de *C. nodosa* hacia otras poblaciones vecinas y en nuestro caso, hacia la zona de San Andrés.

Atendiendo como opción de zona receptora al sebadal de San Andrés, nosotros hemos tomado como una referencia geográfica muy próxima, posiblemente continua en el pasado al sebadal de Las Teresitas. Los resultados encontrados en los descriptores de variación genética en comparación con el resto de poblaciones de Tenerife mostraron que Las Teresitas posee valores elevados superados sólo por la población donante y El Médano, a excepción de tener uno de los valores más bajos de riqueza genotípica detectados aunque puede considerarse normal si lo comparamos con los encontrados en otras islas y a nivel general para la especie en Canarias (Alberto et al. 2006). Este valor de riqueza genotípica, como ya apuntó el mismo autor, se explicaría por las perturbaciones antrópicas en el litoral, que podrían ser la causa principal de la fragmentación del hábitat en esta zona y, consecuentemente, promueven el recubrimiento mediante el crecimiento clonal.

Consecuentemente, desde este punto de vista genético, el sebadal de Las Teresitas como zona receptora no debería plantear un problema, sino más bien podría ayudar a incrementar la variación genética local. Sin embargo, habría que asegurar que la pradera de San Andrés se encuentra en una fase de recuperación natural inducida por el cese de los impactos antrópicos y que la traslocación de individuos podría ayudar a acelerar la recolonización de la zona y recubrir la superficie original a partir de la distribución parcheada y fragmentada que presenta hoy en día.

Los valores de  $F_{is}$  de las poblaciones de Tenerife no presentan signos de consanguinidad, a excepción del sebadal de El Médano. En esta población, a pesar de tener un elevado valor de heterocigosidad esperada con respecto al resto, su heterocigosidad observada es menor y en consecuencia, se encuentra en un déficit de heterocigotos. Por lo tanto, en este sentido, Granadilla no aportaría un beneficio aparente al sebadal de Las Teresitas, pero sí al sebadal de El Médano, que se beneficiaría del transplante disminuyendo sus niveles de consanguinidad.

En concordancia con Alberto et al (2006), las poblaciones de Tenerife analizadas se encuentran genéticamente diferenciadas en base a la distribución desigual de los alélos entre las poblaciones. Las orientaciones de las costas en combinación con las corrientes marinas que afectan a las poblaciones de Tenerife pueden ser los factores principales que lo expliquen. Así, parece existir una tendencia respecto a la relación que se da entre la agrupación formada en el cluster y la orientación de las poblaciones analizadas en la isla de Tenerife. El primer grupo lo formarían los sebadales orientados hacia el SE de la isla a excepción de Los Cristianos (aunque es la población más cercana a El Médano), el grupo 2 lo formarían los sebadales orientados hacia el SW. En el caso del sebadal de la bahía del Porís, se refuerza la hipótesis del aislamiento genético y evolución por deriva, a pesar de su situación geográfica cercana al sebadal de Granadilla.

Los valores de  $F_{ST}$ , que cuantifican la proporción de variación genética total atribuible al componente inter-poblacional, permiten interpretar las diferencias encontradas en función de los niveles de flujo génico. Las poblaciones de la bahía del Porís, Punta Teno y San Juan tuvieron los mayores valores de este parámetro, semejantes a los encontrados por Alberto et al (2006) en poblaciones de diferentes islas,

por lo que se deduce que hay unos niveles de diferenciación fuertes y menor flujo génico entre estas poblaciones y las demás. No obstante, el análisis de los  $F$ -estadísticos indicó que la mayoría de la diversidad genética detectada en Tenerife reside dentro de las poblaciones.

La reducción de la distancia en el análisis de IBD entre estaciones de muestreo (explicado en el apartado de resultados como la partición de la población de Granadilla en varias estaciones) logró detectar un patrón de aislamiento genético explicado por la distancia geográfica. Sin embargo, utilizando el tamaño muestral total formado por 256 genets, no se encontró un patrón significativo de IBD; por lo que la distancia mínima entre pares de poblaciones muestreadas pudo ser demasiado elevada. Esto sugiere un flujo génico restringido a decenas de kilómetros; a partir de esta distancia, la deriva genética parece ser la explicación más factible de los niveles de diferenciación inter-poblacional en los sebales de Tenerife.

Por lo tanto, estos análisis indican que las poblaciones con los mayores niveles de divergencia genética son la bahía del Porís, Punta Teno y San Juan. Tales divergencias podrían ser atribuibles a la deriva genética (que habría permitido un aislamiento y una evolución independiente de factores biológicos) o a la existencia de factores físicos que impedirían el intercambio genético de estas poblaciones con las vecinas. Aparte de estos casos, el grado de conectividad detectado entre todas las poblaciones de Tenerife parece responder a niveles de flujo génico considerables; en particular, los valores de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones sugieren que Granadilla no tiene unos niveles de diferenciación muy elevados con el resto de poblaciones (a excepción del Porís y San Juan).

Atendiendo a los análisis anteriores que explicarían la distribución de la variación genética interpoblacional en Tenerife, las poblaciones más divergentes podrían contener complejos genéticos que han evolucionado independientemente. En consecuencia, considerarlas como posibles zonas receptoras podría aumentar el riesgo de introducir genotipos no deseados y producir cambios no beneficiosos en ellas.

Bajo el punto de vista genético, sería conveniente que estas poblaciones no entraran en consideración para un posible trasplante, debido a que la conexión entre las poblaciones a través del flujo genético es un indicador importante (Falk et al. 2001, Fonseca et al. 1998, Hedrick, 2005, Lesica y Allendorf, 1999) y decisivo a la hora de elegir la zona receptora.

## 1.5. CONCLUSIONES

Desde un punto de vista genético, el presente estudio indica que la opción de trasplante desde Granadilla hacia el sebadal de Las Teresitas es una opción viable por los siguientes motivos:

- No poner en peligro los niveles de diversidad genética de la población receptora, que incluso podrían llegar a aumentar con el tiempo.
- La posible disminución de la adaptabilidad de la población (fitness) por la entrada de genotipos y alelos externos (*outbreeding depression*) no parece ser un factor de peligro si consideramos dicho movimiento de individuos de una población a la otra.



- Los niveles de diferenciación genética y de IBD entre Granadilla y Las Teresitas no son tan elevados como para que puedan repercutir de forma negativa en un trasplante.

Otra opción de trasplante, a nuestro parecer, sería considerar el sebadal de El Médano como zona receptora debido a lo explicado para Las Teresitas con el beneficio añadido de que dicho trasplante podría compensar la deficiencia de heterocigotos detectada y, por consiguiente, atenuar la influencia de la consanguinidad en la dinámica de esta población.

Otro punto esencial y que nunca debe pasarse por alto es el contexto ambiental actual donde va a llevarse a cabo el trasplante. Este factor debería considerarse desde dos puntos de vista: el primero, obviamente, responde a las necesidades ambientales particulares que necesita la especie para sobrevivir y reproducirse a lo largo del tiempo con éxito. Así, encontramos la zona de San Andrés como un lugar donde actualmente se conoce la presencia actual de la especie y se sabe que su presencia en la zona es histórica y se remonta tiempo atrás.

Sin embargo, por otro lado, hay que considerar si las condiciones naturales se han degradado o perturbado por actividades antrópicas y las condiciones ambientales actuales, o si estas condiciones físico-químicas del medio para mantener con éxito los tamaños poblacionales pasados, por el contrario, han menguado desde entonces por causas antrópicas ajenas a la dinámica natural de los ecosistemas marinos litorales canarios.

Simplemente, con estas palabras pretendemos alertar que unas directrices genéticas, por muy correctas que sean nunca podrán exitosas sino se cumple la premisa esencial en ecología de la restauración: garantizar la supervivencia y éxito reproductivo de la nueva población creada en el tiempo para que, a través de el trasplante, adquiera o recupere las capacidades y aptitudes para auto-mantenerse por si misma (es decir, persistencia, resistencia a cambios estocásticos y estabilidad).

## 1.6. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Nayra García Jimenez, Manuel Ruiz de La Rosa y a Jose Abella Gutiérrez por aguantar mis súplicas para la recolección de muestras y parte del procesado de las mismas. A Ramón, una persona maravillosa a la que le debo muchas horas de navegación y que ha permitido que todas las muestras lleguen a buen puerto siempre, de su insaciable motivación por inculcarnos su sabiduría sencilla pero efectiva así como el respeto hacia la naturaleza. Al Jardín Botánico Viera y Clavijo por cedernos sus instalaciones y permitir la extracción de DNA y especialmente al departamento de Biología Molecular liderado por el Dr. Juli Caujapé Castells el cual ha mantenido con nosotros una inestimable y productiva colaboración durante todo el desarrollo del estudio. Al equipo de investigación liderado por la Dra. Ester Serrão, Marine Ecology and Evolution CCMAR-Universidade do Algarve, por sus constantes apoyos durante la estancia en Portugal. En especial, a Filipe Alberto por ceder amablemente los datos genéticos de las poblaciones de Las Teresitas, El Médano y San Juan que han sido cruciales para estudiar la viabilidad del sebadal de San Andrés. Además, junto a J. Caujapé castells porque siempre han estado ahí cuando ha sido necesaria su

intervención en muchos de los aspectos que aparecen en el presente estudio como fueron sus constantes comentarios, discusiones fructíferas y correcciones estadísticas sobre el presente manuscrito. A Nereida, que sin sus pacientes y correctos consejos fueron esenciales en la toma de confianza con las pipetas.

## 1.7. REFERENCIAS

- Alberto F. 2005. Dispersal, sex and clonality in the marine environment: population genetic structure of the seagrass *Cymodocea nodosa* on Mediterranean and Atlantic coasts. Tesis Doctoral. Universidade do Algarve. 156 pp.
- Alberto F., Arnaud-Haond S., Duarte C.M., Serrão E.A. 2006. Genetic diversity of a clonal angiosperm near its range limit: the case of *Cymodocea nodosa* at the Canary Islands. *Marine Ecology Progress Series* 309: 117-129.
- Arnaud-Haond, S., Migliaccio, M., Diaz-Almela, E., Teixeira, S., Van der Vliet, M.S., Alberto, F., Procaccini, G., Duarte C.M., Serrão, E. 2007. Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: east-west cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of biogeography* 34: 963-976.
- Arnaud-Haond, S., Belkhir, K. 2007. GenClone 1.0: a new program to analyse genetic data of clonal organisms. *Molecular Ecology Notes* 7: 15-17.
- Clewell, Andre. F. 2000. Restoring for natural authenticity. *Ecological restoration* 18: 216-217.
- Caujapé-Castells J. y Pedrola-Monfort J. 2004. A sampling design for the ex-situ genetic conservation of the Ibero-Moroccan endangered endemic *Androcymbium gramineum*: implications for the assessment of a conservation strategy from a survey of genetic diversity for neutral markers. *Conservation genetics* 5: 131-144.
- Caujapé-Castells J, Baccarani-Rosas M (2005) Transformer-3: a program for the analysis of molecular population genetic data. EXEGEN software & Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".
- Clewell, A.F. 2000. Restoring for natural authenticity. *Ecological restoration* 18: 216-217.
- Dorken, M.E., Eckert, C.G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* 89: 339-350.
- Falk D.A., Knapp E.E. and Guerrant E.O. 2001. An introduction to restoration genetics. Prepared by the Society for Ecological Restoration. For: Plant Conservation Alliance, Bureau of Land Management, US Department of Interior, U.S. Environmental Protection Agency.
- Fonseca M, Kenworthy W J, Thayer G W. 1998. Guidelines for the conservation and restoration of seagrasses in the United States and adjacent waters. NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis Series No 12. NOAA Coastal Ocean Office, Silver Spring, MD. 222 pp.
- Hedrick, P. 2005. "Genetic restoration:" a more comprehensive perspective than "genetic rescue". *Trends in ecology and evolution* 20: 109.
- Knapp, E.E., Rice, K.J. 1998. Comparison of isozymes and quantitative traits for evaluating pattern of genetic variation in purple needlegrass (*Nasella pulchra*). *Conservation Biology* 12 (5): 1031-1041.

- Orth R J, Luckenbach M and Moore K A. (1994). Seed dispersal in a marine macrophyte: Implications for colonization and restoration. *Ecology* 75: 1927-1939.
- Parks, J.C., Werth, C.R. 1993. A study of spatial features of clones in a population of bracken fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany* 80: 537-544.
- Leberg, P.L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11: 2445-2449.
- Lesica, P., Allendorf, F.W. 1999. Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match?. *Restoration Ecology* 7: 42-50.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Procaccini G., Piazzini L. 2001. Genetic polymorphism and transplanting success in the Mediterranean seagrass, *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Restoration ecology* 9: 332-338.
- Raven, P.H., Ray, F.E., Eichhorn, S.E. 1986. *Biology of plants*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Worth publishers
- Raymond, M., Rousset, F. 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995b. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Raven, Peter H., Ray F. Evert, y Susan E. Eichhorn. 1986. *Biology of plants*. Fourth ed. New York: Worth Publishers.
- Reyes, J., 1993. Estudio de las praderas marinas de *Cymodocea nodosa* (Cymodoceae, Magnoliophyta) y su comunidad de epífitos, en El Médano (Tenerife, Islas Canarias). Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. 424 pp
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Sydes, M.A. Peakall, R. 1998. Extensive clonality in the endangered shrub *Haloragodendron lucasii* (Haloragaceae) revealed by allozymes and RPADs. *Molecular Ecology* 7: 87-93.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of the population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Orth R J, Luckenbach M and Moore K A. (1994). Seed dispersal in a marine macrophyte: Implications for colonization and restoration. *Ecology* 75: 1927-1939.
- Swofford, D.L., Selander, R.B. 1989. BIOSYS-1: a computer program for the analysis for the allelic variation in genetics. University of Illinois, Urbana, Ill.
- Wright. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.

Oleas Patel