

Estudio integral de la genética y filogeografía de *Cistus heterophyllus*

Ana Otero^{1,2,3,*}, Alberto J. Coello^{2,3,*}, Emilio Cano³, P. Pablo Ferrer-Gallego⁴, Inmaculada Ferrando-Pardo⁴, Miquel Capó⁵, Carles Cardona⁶, Jesús Robles⁷, María José Vicente², Pablo Vargas³, Mario Fernández-Mazuecos⁸

¹ The Field Museum, ² Universidad Politécnica de Cartagena, ³ Real Jardín Botánico (CSIC), ⁴ Servicio de Vida Silvestre y Red Natura 2000-CIEF, ⁵ Universidad Politécnica de Madrid, ⁶ Centre Forestal de les Illes Balears (IBANAT), ⁷ Subdirección General de Patrimonio Natural y Cambio Climático (Región de Murcia), ⁸ Universidad Autónoma de Madrid
* Ambos autores han contribuido de manera equivalente a la realización de este trabajo

Introducción

Cistus heterophyllus Desf. (Fig. 1) es una especie mediterránea distribuida principalmente en el noroeste de África (Marruecos y Argelia) y tiene presencia puntual en la Península Ibérica y las Islas Baleares: Cartagena, Valencia y la isla de Cabrera. En la Península Ibérica, se encontró por primera vez a principios del siglo XX (Jiménez, 1903). Las poblaciones ibéricas se incluyen actualmente en *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Pau) M. B. Crespo & Mateo (Crespo & Mateo, 1988), especie comúnmente conocida como la jara de Cartagena. Por su parte, la población de Cabrera ha sido descubierta recientemente (Cardona & M. Capó, en revisión). *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* ha sido evaluada a nivel global según los criterios de la IUCN como “en peligro crítico” (Güemes *et al.*, 2006). A nivel nacional está protegida con la categoría “en peligro de extinción” dentro del Catálogo Español de Especies Amenazadas, además de ser la única especie vegetal de la lista de taxones declarados en “situación crítica” por el Ministerio para la Transición Ecológica y El Reto Demográfico del Gobierno de España (Orden TEC/1078/2018). La discriminación morfológica entre las subespecies *carthaginensis* y *heterophyllus* es problemática, y análisis genéticos basados en RAPD arrojaron dudas sobre su consistencia taxonómica (Jiménez *et al.*, 2007). Además, la especie híbrida con facilidad con *C. albidus* (*C. x clausonii*). Todo ello hace necesario abordar un estudio filogeográfico profundo de la especie que incorpore tecnologías de secuenciación masiva para desvelar las relaciones entre linajes y poblaciones, y ayudar así al manejo correcto y conservación de las poblaciones españolas que están sumamente amenazadas.

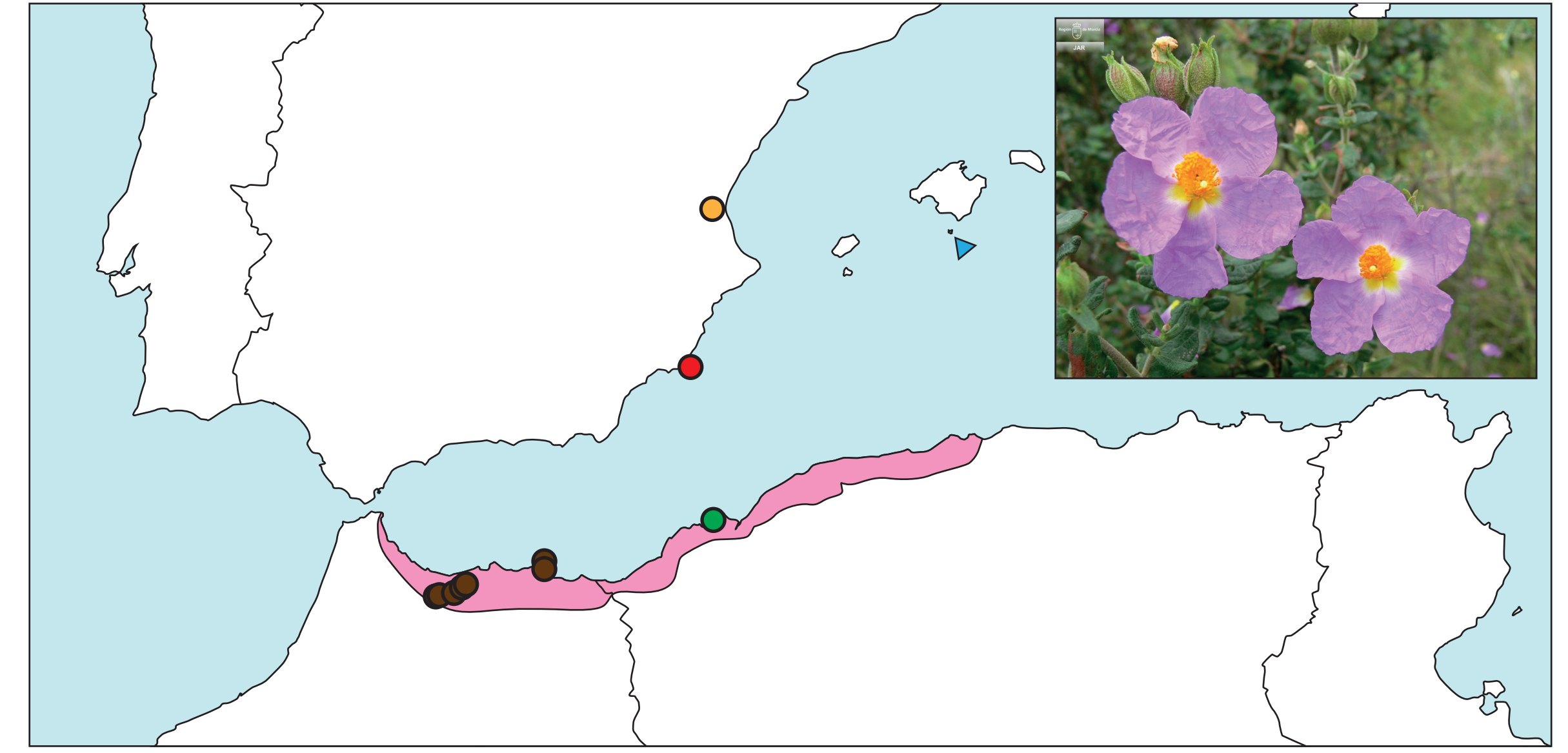


Fig. 1: Muestreo de *Cistus heterophyllus*. Las poblaciones han sido coloreadas de acuerdo a su localización: Cartagena en rojo, Valencia en naranja, Marruecos en marrón y Argelia en verde. La nueva población descubierta en la isla de Cabrera está señalada con un triángulo. La distribución de *C. heterophyllus* en el norte de África se ha sombreado en rosa. El recuadro muestra una imagen de la especie.

Objetivo

El objetivo es inferir la historia filogeográfica de *C. heterophyllus* a partir de datos genómicos obtenidos mediante genotipado por secuenciación (*Genotyping-by-sequencing*, GBS) y de una amplia representación poblacional de la distribución de la especie. En particular, este estudio se centra en analizar el grado de diferenciación filogeográfica entre poblaciones ibéricas y africanas.

Metodología

- Se recolectaron 182 individuos entre ejemplares de *C. heterophyllus* y especies próximas del género, incluida una amplia representación de *C. albidus*.
- Extracción de ADN mediante CTAB (Doyle & Doyle, 1987; Cullings, 1992).
- Preparación de librerías de GBS siguiendo el protocolo de Fernández-Mazuecos *et al.* (2018).
- Secuenciación mediante plataforma Illumina HiSeq X (150PE).
- Ensamblaje *de novo* a través del pipeline de *ipyrad* (Eaton & Overcast, 2020), con un umbral de agrupamiento del 90% y un porcentaje mínimo de muestras secuenciadas por locus del 25%.
- Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud (ML) con el programa RaxML (Stamatakis, 2014), utilizando *C. crispus* como grupo externo (Guzmán *et al.*, 2009). El análisis se realizó con y sin individuos de origen potencialmente híbrido.
- Análisis de componentes principales (PCA) utilizando la matriz de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para investigar la diferenciación genética entre poblaciones.

Resultados

- 13 individuos descartados por baja calidad tras las secuenciación, junto con varios individuos que no pudieron ser secuenciados.
- Alineamiento final de 394 loci (56004 pb).
- En el árbol filogenético que incluye los individuos potencialmente híbridos se observa monofilia para las diferentes especies de *Cistus* con máximos apoyos salvo para *C. albidus* (BS = 75%) y *C. heterophyllus* (BS = 71%) y bajo apoyo para las relaciones filogenéticas entre *C. creticus*, *C. heterophyllus* y *C. albidus* (BS = 55%; Fig. 2A).
- Híbridos de *C. heterophyllus* y *C. albidus* en posiciones basales de ambos clados y anidados dentro de *C. albidus* (Fig. 2A).
- La filogenia sin ejemplares fenotípicamente híbridos recupera la filogenia de las tres especies y sus relaciones (BS = 100%; Fig. 2B).
- Las tres muestras de Valencia están anidadas entre las poblaciones norteafricanas, concretamente emparentadas con las muestras de Argelia con moderado apoyo (BS = 69% en Fig. 2A; BS = 60% en Fig. 2B).
- No hay parentesco cercano entre las poblaciones murciana (BS = 91% en Fig. 2A; BS = 100% en Fig. 2B) y valenciana (BS = 89% en Fig. 2A; BS = 79% en Fig. 2B), ni en las reconstrucciones filogenéticas ni en el PCA (Fig. 3).
- El PCA muestra una diferenciación clara entre *C. creticus*, *C. heterophyllus* y *C. albidus*, con los híbridos de las dos últimas especies en clara posición intermedia entre ellas (Fig. 3).
- Las muestras de Cartagena aparecen claramente diferenciadas del resto de *C. heterophyllus* en el PCA (Fig. 3).
- Las poblaciones valencianas parecen asociarse a las del norte de África como parte de *C. heterophyllus* subsp. *heterophyllus*, mientras que solo la población de Cartagena se mantendría como *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Fig. 3).

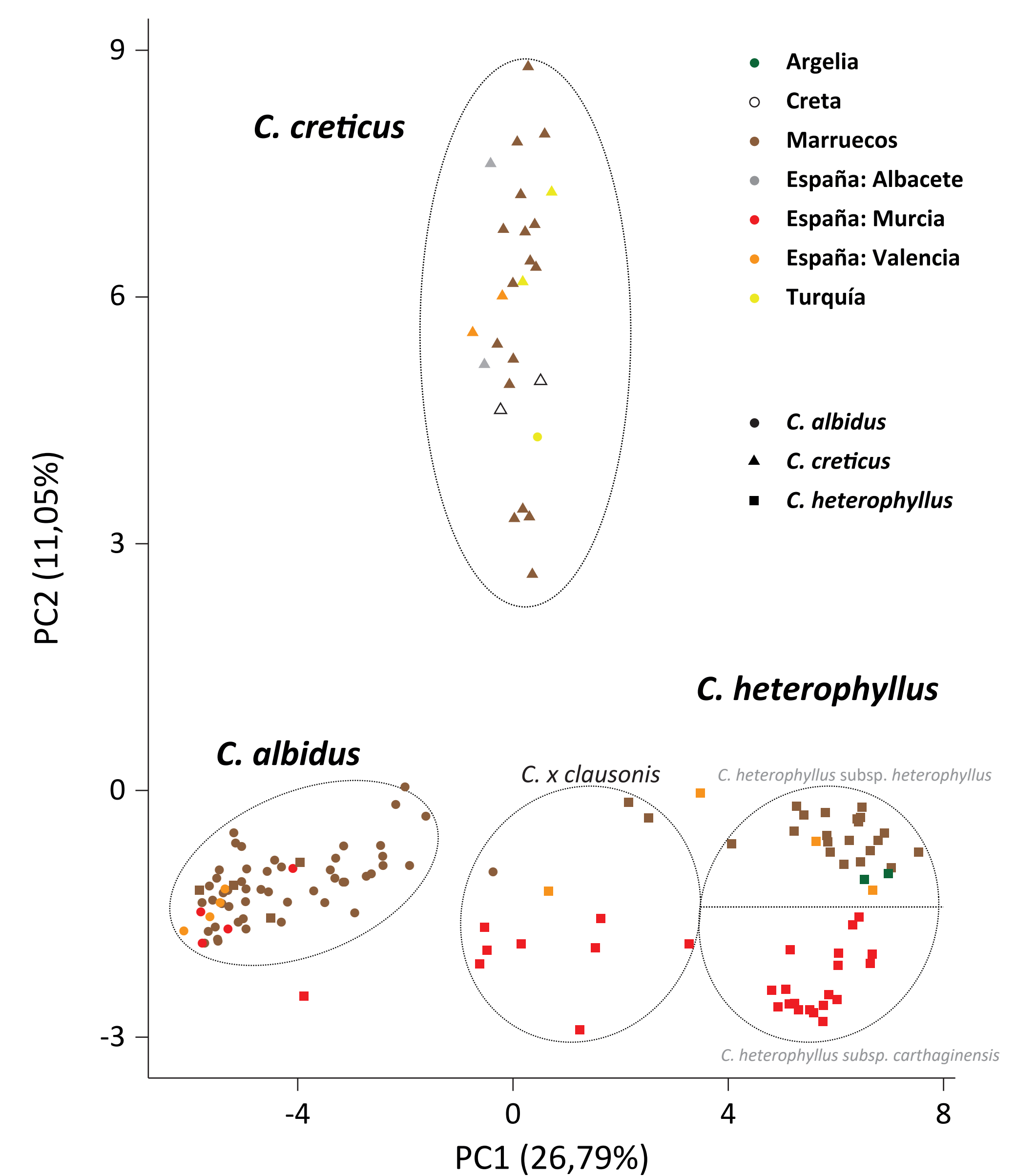


Fig. 3: Análisis de componentes principales (PCA) basados en la matriz de SNPs. En la figura se indican los grupos genéticos para cada especie. La procedencia de cada población se indica con el color según la leyenda.

Conclusiones

Estos resultados preliminares del estudio filogeográfico de *C. heterophyllus* muestran: (i) la capacidad de la técnica de GBS para resolver las relaciones filogeográficas en esta especie; (ii) cierta diferenciación entre las poblaciones de Cartagena y Valencia, ya que estos últimos parecen estar más relacionados con poblaciones del norte de África; y (iii) la presencia en la población de Cartagena de un elevado número de individuos sin aparentes trazas de hibridación con *C. albidus*. Actualmente se continúa trabajando para incluir en el estudio un mayor número de poblaciones del norte de África, así como la población recientemente descubierta en la isla de Cabrera (2022), para mejorar la representación del área de distribución de la especie.

Agradecimientos

Este trabajo es parte del proyecto “Consolidación de acciones de recuperación de la jara de Cartagena en la Región de Murcia”, cofinanciado por la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca, Medio Ambiente y Emergencias de la Región de Murcia y por el Fondo de Restauración Ecológica y Resiliencia del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. La producción de *Cistus heterophyllus* en la Comunidad Valenciana se benefició del soporte financiero del Fondo Europeo Agrícola del Fondo Rural (FEADER) en el marco de la Operación 8.5.3 “Conservación y desarrollo de la Red Natura 2000” como parte del Programa de Desarrollo Rural de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

References
Crespo & Mateo (1988). Consideraciones acerca de la presencia de *Cistus heterophyllus* Desf. en la Península Ibérica. *Anales Real. Bot. Moiol* 45(1): 165-171.
Cullings (1992). Design and testing of a primer specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol. Ecol.* 1(6): 233-240.
Doyle & Doyle (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19(1): 11-15.
Eaton & Overcast (2020). Rapid interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics* 36(8): 2500-2504.
Fernández-Mazuecos & Vargas (2018). Especiación en el género *Cistus*: la jara de Cartagena (*Cistus heterophyllus*), una especie en peligro. 26-31.
Güemes *et al.* (2006). *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006: e16309/163232799.
Guzmán *et al.* (2009). Adaptive Radiation in Mediterranean *Cistus* (Cistaceae). *PLoS ONE* 4(7): e6362.
Jiménez (2003). La jara de Cartagena. *Mem. Real Soc. Esp. Hist. Nat.* 2: 15-116.
Jiménez *et al.* (2007). Evidencia de hibridación en *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Cistaceae) a partir de marcadores moleculares RAPD. *Anales de Biología* 29: 95-103.
Stamatakis (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312-1313.