

## ESTUDIO ELECTROFORETICO DEL GENERO ASPARAGUS L. (LILIACEAE) EN LAS ISLAS CANARIAS.

ANA RAMOS-MARTINEZ

Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo". Apdo. 14 de Tafira Alta, 35017 Las Palmas de Gran Canaria.

Recibido: Diciembre 1991.

Palabras clave: *Asparagus*, *Liliaceae*, electroforesis, proteínas, semillas, evolución, Islas Canarias.

### RESUMEN

El análisis electroforético de proteínas de semillas realizado en los táxones del género *Asparagus* presentes en Canarias, permite el reconocimiento de dos grupos naturales: especies endémicas y no endémicas.

Las especies endémicas se hallan diversificadas en tres grupos dentro los cuales los táxones son génicamente muy similares: *A. umbellatus* ssp. *umbellatus* y *A. fallax* por un lado, *A. scoparius*, *A. plocamoides* y *A. nesiotis* ssp. *purpuriansis* por otro, y *A. arborescens* por un tercero.

Las dos razas cromosómicas (4x, 6x) de la especie no endémica *A. pastorianus* presentan idénticos perfiles de proteínas, lo que sugiere un posible origen autoploide para la forma hexaploide endémica de Fuerteventura.

### SUMMARY

Electrophoresis of seed proteins of *Asparagus* species living in the Canary Islands reveal the endemic species prove to be genetically separate from the non-endemic species.

Within the endemic taxa *A. umbellatus* ssp. *umbellatus* and *A. fallax* on one side and *A. scoparius*, *A. plocamoides* and *A. nesiotis* ssp. *purpuriansis* on the other show a marked resemblance in their seed proteins profiles. These constitute two groups, that however show genetic differences between themselves and with *A. arborescens* a species with a characteristic protein profile.

Both cytotypes (4x, 6x) of the non-endemic species *A. pastorianus* show identical protein profile which suggest a possible autopoloid origin for the hexaploid endemic.

### INTRODUCCION

El género *Asparagus* L. (Liliaceae) está representado en las Islas Canarias por nueve especies, seis de las cuales son endemismos canarios o macaro-

nésicos.

*A. arborescens* Willd ex Schultes & Schultes fil., *A. fallax* Svent. y *A. plocamoides* Svent. son endemismos canarios y *A. scoparius* Lowe, *A. nesiotetes* Svent. y *A. umbellatus* Link, son endemismos macaronésicos, las dos últimas representadas en Canarias por las subespecies endémicas: *A. nesiotetes* ssp.*purpuriensis* Marrero & Ramos y *A. umbellatus* ssp.*umbellatus*. *A. fallax* se sitúa en el bosque de laurisilva (G,T)\*, mientras que los restantes táxones se distribuyen por el piso basal. *A. arborescens* (G,T,C,L,Gr)\* y *A. nesiotetes* ssp.*purpuriensis* (Gr,L,F)\* tienen tendencias marcadamente xerofíticas y ocupan los lugares secos y pedregosos de la zona inferior; *A. scoparius* (P,T,C)\* y *A. plocamoides* (T,C)\* alcanzan altitudes mayores que los anteriores, el primero en la zona centro-norte y, el segundo, en la zona sur o suroeste asociado frecuentemente con el pinar; *A. umbellatus* tiene su óptimo en el bosque termófilo, pero su amplia valencia ecológica le permite adentrarse tanto en el borde de la laurisilva como descender hasta niveles próximos al mar.

De las tres especies no endémicas de *Asparagus* presentes en Canarias, *A. stipularis* Forsskal (L,F)\* y *A. pastorianus* Webb & Berth. (T,C,L,F)\* son especies autóctonas que se sitúan en las zonas xerofíticas; la primera tiene una distribución mediterránea mientras que la segunda está distribuida por el archipiélago canario y por la zona oeste de Marruecos, con una raza cromosómica hexaploide (RAMOS-MARTINEZ,1989) endémica de la isla de Fuerteventura. *A. asparagoides* Druce, sin embargo, es una especie originaria de África del Sur y asilvestrada en Canarias.

Todas las especies endémicas Canarias o macaronésicas del género *Asparagus* L., así como la especie *A. pastorianus* pertenecen al subgénero *Asparagopsis*, *A. stipularis* está incluida en el subgénero *Asparagus* y *A. asparagoides* en el subgénero *Myrsiphyllum* (VALDES,1979).

La electroforesis de proteínas de semillas es una herramienta útil en los estudios taxonómicos y evolutivos, siendo cada vez más utilizada como una técnica adicional para la identificación de especies y para la determinación de las relaciones filogenéticas en grupos de plantas (LADIZINSKY & HYMOWITZ, 1979; GONZALEZ-AGUILERA et al., 1986; FERNANDEZ-PERALTA et al., 1986).

El presente estudio es un intento de evaluar las relaciones entre los distintos táxones del género *Asparagus* presentes en el archipiélago canario, a través de la similitud entre los perfiles de proteínas de semillas de las distintas especies, como dato complementario a los estudios cariológicos y morfológicos.

## MATERIAL Y METODOS

Para este estudio se utilizaron semillas sin germinar recolectadas en poblaciones naturales o procedentes de los ejemplares que se mantienen en cultivo en el Jardín Botánico "Viera y Clavijo" (Figura 1).

Se realizó una electroforesis en gel vertical de poliacrilamida con SDS siguiendo la técnica de WEBER & OSBORN (1969) con ligeras modificaciones (LUTEMBERG et al.,1975). Los extractos de proteínas se obtuvieron añadiendo 20 de tampón extractor por cada 0.01 gr. de semillas trituradas.

\* P: La Palma. H: Hierro. G: Gomera. T: Tenerife. C: Gran Canaria. F: Fuerteventura. L: Lanzarote. Gr: Graciosa.

TAXON	POBLACION *	2N
<b>A.arborescens</b>	Jinámar (GC).	20
	Peñas del Tao (L).	20
	Pedro Barba (GR).	--
<b>A.umbellatus</b> ssp.umbellatus	Monte Lentiscal (GC).	20
<b>A.fallax</b>	Material cultivado en el J.B. "Viera y Clavijo", orig. Vueltas de Taganana (T)	20
<b>A.scoparius</b>	La Atalaya. Sta. Brígida. (GC)	20
<b>A.plocamoides</b>	Rosiana. S. Bartolomé de Tirajana (GC).	20
<b>A.nesiotes</b> ssp.purpuriensis	Peñas del Tao. Malpaís de la Corona (L).	60
<b>A.pastorianus</b>	Telde (GC).	40
	Rio Palmas (F).	60
<b>A.stipularis</b>	Material cultivado en el J.B. "Viera y Clavijo".	20
<b>A.asparagoides</b>	Camino Los Lirios. Bandama. (GC).	20

Figura 1.-

Para la comparación entre dos patrones de bandas de proteínas, se ha utilizado el índice de similitud (S.I.) de VAUGHAN & DENFORD (1968).

$$S.I. = \frac{N \text{ de bandas similares}}{N \text{ de bandas similares} + N \text{ de bandas distintas}} \times 100.$$

Dado que los perfiles de proteínas de las tres poblaciones consideradas para la especie *A.arborescens* no muestran variabilidad, se ha considerado una sólo población para caracterizar el perfil de cada uno de los táxones estudiados, a excepción de la especie *A.pastorianus*, para la cual se han analizado dos poblaciones correspondientes a las dos razas cromosómicas presentes en Canarias.

## RESULTADOS

En la Figura 2 se representa el diagrama de los perfiles de proteínas obtenidos mediante la electroforesis, y en la Figura 3 se expone la matriz de los índices de similitud entre los diferentes táxones considerados.

Para el conjunto de las táxones estudiados, se observa que las especies endémicas muestran perfiles de proteínas relativamente próximos entre sí (S.I. = 58.82%) y más alejados de los táxones no endémicos (S.I. = 30.00%), aunque situándose algo más cercanas a *A. pastorianus* y a *A. stipularis* (S.I. entre 19.05% y 30.00%) que a *A. asparagoides* (S.I. = 13.64%).

En el grupo de las especies no endémicas hay que señalar la ausencia de variabilidad entre las dos razas cromosómicas de la especie *A. pastorianus*, que muestran idénticos perfiles de proteínas (S.I. = 100%), así como los bajos índices de similitud existentes entre las distintas especies no endémicas estudiadas (S.I. = 15.00%).

Dentro del grupo de las especies endémicas, únicamente *A. arborescens* muestra un perfil de proteínas característico, observándose en los restantes táxones la formación de dos grupos con perfiles de proteínas idénticos o muy similares: *A. scoparius*, *A. nesiotis* ssp. *purpuriansis* y *A. plocamoides* (S.I. = 92.31%), por un lado, y *A. umbellatus* ssp. *umbellatus* y *A. fallax* (S.I. = 100%), por otro.

*A. scoparius* y *A. nesiotis* ssp. *purpuriansis*, con 13 bandas cada uno, presentan idénticos perfiles de proteínas (S.I. = 100%). La banda de movilidad electroforética Rf-0.37 presente en los anteriores táxones, está ausente en *A. plocamoides*, siendo esta la única diferencia en el perfil de bandas proteicas entre estas especies (S.I. = 92,31%).

Los táxones *A. umbellatus* ssp. *umbellatus* y *A. fallax* con 15 bandas cada uno, muestran, así mismo, idéntico perfil de proteínas (S.I. = 100%).

## DISCUSION

Los resultados de la electroforesis de proteínas de semillas junto con los estudios cariológicos y morfológicos, permite clarificar las relaciones filogenéticas entre las especies y establecer los mecanismos evolutivos dentro del grupo de *Asparagus* canarios.

Por un lado, los resultados muestran que la duplicación en el número cromosómico tanto a nivel intraespecífico (*A. pastorianus*, razas cromosómica 4x,6x) como interespecífico (*A. nesiotis* ssp. *purpuriansis* 6x), (*A. plocamoides* 2x), (*A. scoparius* 2x), no afecta al patrón de bandas de proteínas. La similitud en el patrón electroforético entre los citotipos de *A. pastorianus* y la ausencia en las islas de otra especie con un patrón de bandas similar indicaría un posible origen autoploide de la raza con más alto nivel de ploidía. (LADIZINSKY & JOHNSON,1972; NAKAI,1977; LADIZINSKY & HYMOWITZ,1979, MOUSTAKAS et al.,1983, 1986; GIFFORD & CHINNAPPA,1985; SIMONIDIS et al.,1985, etc. Sin embargo, la ausencia de citotipos de menor nivel de ploidía en *A. nesiotis* ssp. *purpuriansis*, así como la existencia de otras especies con un alto grado de similitud génica, nos impide definirnos por un origen auto o alopoloide para esta especie. De cualquier manera, la poliploidía es una poderosa barrera reproductiva que impide la introgresión, propiciando el aislamiento reproductivo entre poblaciones y/o especies. Sin embargo, los habitats marcadamente alopatricos entre los citotipos de *A. pas-*



	PL	SC	NES	UM	FA	ARB	PAS	ST	ASP
PL	100.00	92.31	92.31	78.57	78.57	62.50	30.00	21.05	13.64
SC		100.00	100.00	75.00	75.00	58.82	28.57	20.00	13.04
NES			100.00	75.00	75.00	58.82	28.57	20.00	13.04
UM				100.00	100.00	68.75	22.73	20.00	8.00
FA					100.00	68.75	22.73	20.00	8.00
ARB						100.00	28.57	19.05	8.00
PAS							100.00	19.05	8.00
ST								100.00	14.29
ASP									100.00

Figura 3. Índices de similitud (S.I.) de VAUGHNAN & DENFORD.

PL: *A.plocamoides*; SC: *A.scoparius*; NES: *A.nesiones* ssp. *purpuriensis*; UM: *A.umbellatus*; FA: *A.Fallax*; ARB: *A.arborescens*; PAS: *A.pastorianus* (4x,6x); ST: *A.stipularis*; ASP: *A.asparagoides*.

*torianus* por un lado, y *A. nesiotis* ssp. *purpuriensis* y las especies con similar S.I., por otro, sugieren que la poliploidía en el género *Asparagus* en Canarias vendría a establecerse más como mecanismo adaptativo que como barrera reproductiva, ampliando el rango de distribución de formas de menor nivel de ploidía a condiciones de vida aparentemente más severas (HUMPHRIES, 1979).

Por otro lado, el análisis electroforético de proteínas de semillas permite el reconocimiento de dos grupos naturales: táxones endémicos y no endémicos (S.I.30.00%).

La clara diferenciación en los perfiles de proteínas entre especies endémicas y no endémicas podría apoyar un origen monofilético para los *Asparagus* canarios, diversificados posteriormente en tres grupos (S.I. dentro de cada grupo = 92,31%). Así, a excepción de *A. arborescens* que muestra un perfil de proteínas característico, la diversidad de las bandas proteicas no se manifiesta entre especies sino entre grupos de especies: *A. umbellatus* ssp. *umbellatus* y *A. fallax* por un lado y *A. scoparius*, *A. plocamoides* y *A. nesiotis* ssp. *purpuriensis* por otro. Los rangos de variación observados entre estos grupos (S.I. entre 58.82 y 78.57%) son similares a los encontrados por otros autores entre especies estrechamente relacionadas del mismo o diferente género (*Festuca*, BULINSKA-RADOMSKA & LESTER, 1985, 1986; *Gonospermum*, *Lugoa* y *Tanacetum*, FEBLES, 1990; *Reseda*, GONZALEZ-AGUILERA & FERNANDEZ-PERALTA, 1983, 1984 y FERNANDEZ-PERALTA & GONZALEZ-AGUILERA 1982; *Sideritis*, FERNANDEZ-PERALTA & GONZALEZ-AGUILERA, 1984, 1986; etc.).

La ausencia de variabilidad interespecífica observada dentro de cada grupo indica una alta similitud del material génico, al menos en aquellos genes estructurales que controlan el contenido proteico de las semillas. Estos altos grados de similitud son también encontrados por otros autores (LOWREY & CRAWFORD, 1985; HELENURM & GANDERS, 1985; CRAWFORD et al., 1987) en géneros evolucionados en islas oceánicas en los que existe una amplia variabilidad morfológica y ecológica pero poca o nula variabilidad en ciertos caracteres moleculares tales como isoenzimas o DNA cloroplástico. CRAWFORD et al. (1987) sugieren que en islas oceánicas pueden no ser necesarias extensas diferencias genéticas para producir especies distintas, de tal modo que dos poblaciones aisladas reproductivamente por ocupar hábitats distintos pueden acumular cambios fenotípicos y ecológicos sustentados en unos pocos cambios genéticos, resultando así especies génicamente similares.

Por tanto, parece que el género *Asparagus* en las Islas Canarias ha seguido dos mecanismos de diversificación distintos. Por un lado, se han originado tres grupos evolutivos con fuertes barreras de aislamiento reproductivo entre ellos que se manifiestan en la divergencia génica, cariológica y morfológica, así como en la ausencia de híbridos interespecíficos entre poblaciones simpátricas de especies de distintos grupos. Por otro lado y dentro de cada grupo la situación es distinta, es el aislamiento ecogeográfico el que ha jugado un papel importante en la especiación actuando como aislamiento reproductivo y originando la aparición de especies génicamente similares así como cariológica (RAMOS-MARTINEZ, 1989) y morfológicamente (VALDES, 1979) más próximas.

### AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria gracias a cuya beca de investigación pudo realizarse este trabajo, y a la Dra. Rosa Febles por su orientación y ayuda durante el desarrollo del mismo.

### BIBLIOGRAFIA

- BULINSKA-RADOMSKA,Z & LESTER,R.N (1985).- Relationships Between Three Species Of *Festuca* sect.*Bovinae* (*Poaceae*). *Pl.Syst. Evol.* 149; 135-140.
- BULINSKA-RADOMSKA,Z. & LESTER,R.N. (1986).- Species Relationships in *Festuca* (Sect.*Ovinae*,*Poaceae*).*Pl. Syst. Evol.* 154, 175-182.
- CRAWFORD,D.J., WITKUS,R. and STUESSY,T.F. (1987).- Plant Evolution and Speciation on Oceanic Islands. In *Differentiation Patterns in Higher Plants* 183-199. Academic Press.
- FEBLES HERNANDEZ,R. (1990).- Analisis Citogenético y Evolutivo en las Especies Endémicas de los Géneros *Gonospermum* Less., *Lugoa* D.C. y *Tanacetum* L. (Compositae:Anthemideae) de la Islas Canarias. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma. Madrid.
- FERNANDEZ-PERALTA,A.M & GONZALEZ-AGUILERA,J.J.(1982).- Cytogenetics and evolutionary studies on the Spanish species of *Reseda* L. Section *Luteola* Dumort (*Resedaceae*). *Taxon* 31 (1): 1-8.
- FERNANDEZ-PERALTA,A.M & GONZALEZ-AGUILERA,J.J. (1984).- Genome differentiation between two closely related species of *Sideritis* L. (*Lamiaceae*). *Genetica* 64, 177-183.
- FERNANDEZ-PERALTA,A.M.& GONZALEZ-AGUILERA,J.J.(1986).- Phylogenetic Relationships en the *Sideritis leucantha* group (*Lamiaceae*). *Pl. Syst. Evol.*,152: 167-183.
- GIFFORD,D.J. & CHINNAPPA,C.C. (1986).- Studies on the *Stellaria longipes* complex (*Caryophyllaceae*). VII. The seed proteins. *Can. J. Bot.* 64:1327-1330.
- GONZALEZ-AGUILERA,J.J. & FERNANDEZ-PERALTA,A.M.(1983).- The Nature of Polyploidy in *Reseda* sect. *Leucoreseda* (*Resedaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 142, 223-237.
- GONZALEZ-AGUILERA, J.J & FERNANDEZ-PERALTA,A.M.(1984).- Phylogenetic relationships in the family *Resedaceae* L. *Genetica* 64,185-197.

- GONZALEZ-AGUILERA, J.J., ARRIAGA MARTITEGUI, P. & FERNANDEZ-PERALTA, A.M. (1986).- Differentiation on the Seed Protein Profiles of Two Closely Related Species of *Narcissus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol 14, No.6, pp 657-659.
- HELERNUM, K. and GANDERS, F.R. (1985).- Adaptative radiation and genetic differentiations in Hawaiian *Bidens*. *Evolution* 39, 753-765.
- HUMPHRIES, C.J. (1979).- Endemism and Evolution in Macaronesia. En *Plants and Islands* (Ed. D. Branwell): 171-199. Academic Press (London).
- JONHSON, B.L. & THEIN, M.N. (1970).- Assessment of Evolutionary Affinities in *Gossypium* by protein electrophoresis. *Ame. J. Bot.*, 57: 1081-1092.
- LADIZINSKY, G. & JONHSON, B.L. (1972).- Seed protein homologies and the evolution of polyploidy in *Avena*. *Can. J. Genet. Cytol.* 14: 875-888.
- LADIZINSKY, G. & HYMOWITZ, T. (1979).- Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 54: 145-151.
- LOWREY, T.K. and CRAWFORD, D.J. (1985).- Allozyme divergence and evolution in *Tetramolopium* (Compositae: Asteraceae) on the Hawaiian Islands. *Sys. Bot.* 10, 64-72.
- LUTEMBERG, B., MEIJERS, J., PETERS, R., VAN DER HOEK, P. & VAN ALPHEN, L. (1975).- Electrophoretic resolution for the major outer membrane protein of *Escherichia coli* K 12 into four bands. *Feb letters*, 58: 254- 258.
- MOUSTAKAS, M., COUCOLI, E. & TSEKOS, I. (1983) .- Isoelectric focusing of seed proteins from natural gecko populations of two *Agropyron* species. En: Stathakos D. (Ed.), *Electrophoresis' 82*, p. 725- 731. Walter Gruyter & Co., Berlin.
- MOUSTAKAS, M., SYMENOIDIS, L. & COUCOLI, H. (1986).- Seed Protein Electrophoresis in *Agropyron junceum* (L.) P.B. Complex. *Annals of Botany* 57: 35-40.
- NAKAI, Y. (1977).- Variations of esterase isozymes and some soluble proteins in diploids and their induced autotetraploids in plants. *Japanese Journal of Genetics* 52: 171-181.
- RAMOS-MARTINEZ, A. (1989).- Aportaciones al conocimiento cariológico del género *Asparagus* L. (*Liliaceae*) en las Islas Canarias. *Bot. Macar.* 18: 3-14.
- SYMENOIDIS, L.A., MOUSTAKAS, M.B. & COUCOLI, H.D. (1986).- Karyotype and seed protein profile analysis of diploids and tetraploids *Hordeum bulbosum* L.. *Phyton*. Vol. 25, fas. 1: 31-38.
- VALDES, B. (1979).- Revisión del género *Asparagus* L. (*Liliaceae*) en Macaronesia. *Lagascalia* 9 (1): 65- 107.
- VAUGHAN, J.G. & DENFORD, K.E. (1968).- An acrylamide gel electrophoresis study of the seed proteins of *Brassica* and *Sinapsis* species with special reference to their taxonomic value. *J. Exp. Bot.*, 19: 724-723.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969).- The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.- *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.