



Desarrollo de marcadores genéticos de microsatélites para especies de plantas del género *Phlomis* mediante técnicas de Next-Generation Sequencing (NGS)

Paloma Triguero Piñero

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

TRABAJO DE FIN DE GRADO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Desarrollo de marcadores genéticos de microsatélites
para especies de plantas del género *Phlomis* mediante
técnicas de Next-Generation Sequencing (NGS)

Nombre: Paloma Triguero Piñero

Tutor: Rafael González Albaladejo

Departamento: Biología Vegetal y Ecología

Tipología: Trabajo de carácter experimental

Lugar y fecha de presentación: Por determinar

RESUMEN:

La diversidad genética da lugar a la evolución de las especies, permitiéndoles adaptarse al medio ambiente cambiante, y contribuyendo de este modo a la genética de conservación de las poblaciones de organismos. Esta diversidad genética se mide con marcadores moleculares o genéticos, siendo los marcadores de microsatélites los más empleados. En este trabajo se disponía de una serie de marcadores obtenidos por técnicas de Next-Generation Sequencing (NGS), de dos especies endémicas del género *Phlomis*: *Phlomis lychnitis* y *Phlomis crinita* subsp. *Malacitana*. De las cuales se quería obtener el potencial de amplificación y variabilidad, además de calcular los parámetros básicos de la diversidad genética para así poder determinar el potencial de estos marcadores para futuros estudios de hibridación. Nuestros resultados muestran un conjunto de 10 marcadores de microsatélites que presentaban variabilidad, es decir, marcadores que presentaban diferentes alelos en las muestras, por tanto, polimórficos; y 12 monomórficos, los cuales presentaban un único alelo en la misma posición por lo que no presentaban variabilidad. Para probar la capacidad diagnóstica de los marcadores que presentaron variabilidad se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para ordenar los genotipos multilocus de cada individuo en un espacio multidimensional. Esta representación determinó la capacidad de diferenciar genéticamente las dos especies, al tratarse de dos poblaciones puras. Por ello, podemos afirmar que el conjunto de marcadores empleados es bueno para discernir entre las dos especies estudiadas. En un futuro este estudio se podría transferir a otras especies endémicas del género *Phlomis*.

Palabras clave: variabilidad genética, hibridación, microsatélites, NGS, SSR.

ÍNDICE:

I. INTRODUCCIÓN.....	4
1. MARCADORES GENÉTICOS:.....	4
2. ¿QUÉ SON LOS MICROSATÉLITES?:.....	6
3. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)	7
4. ANTECEDENTES:.....	8
5. ESPECIES DE ESTUDIO:	9
II. OBJETIVOS DEL TFG:	13
III. METODOLOGÍA:	14
1. MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE ADN	14
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	16
1. RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN:.....	16
V. CONCLUSIONES:	23
VI. BIBLIOGRAFÍA:	24

INTRODUCCIÓN:

La cuantificación de la diversidad genética en las poblaciones de organismos es una prioridad en la genética de la conservación (Frankham et al., 2004). La diversidad genética es necesaria en las poblaciones para su adaptación a un medio ambiente cambiante. En otras palabras, la diversidad genética es la materia prima con la que la selección natural opera para la adaptación de las especies al medio. Usualmente poblaciones grandes de especies ampliamente distribuidas tienen una mayor diversidad genética que las poblaciones de especies endémicas que ocurren en un área geográfica más restringida (Gitzendanner y Soltis, 2000). Típicamente la manera de medir esa diversidad genética es mediante el uso de marcadores moleculares o marcadores genéticos.

MARCADORES GENÉTICOS:

El Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano define el Marcador genético como “Un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida”.

Durante los procesos de replicación del ADN se pueden producir mutaciones en el genoma, originadas principalmente por sustituciones, deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones en una o varias bases nucleotídicas. Estas mutaciones generan variabilidad entre los individuos de una población, y pueden usarse como marcadores genéticos (Brooker, 2012), lo que nos permite estudiar la evolución de las poblaciones y en última instancia de las especies.

Los marcadores genéticos, al ser fragmentos específicos de ADN, se pueden identificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Esta técnica, desarrollada en 1983 por Kary Mullis, permite amplificar *in vitro* regiones específicas de ADN para su posterior análisis, incrementando el número de copias. Este nuevo ADN se sintetiza gracias a unos cebadores que se sitúan en los extremos de los segmentos de ADN que están presente en la muestra, y que es replicado selectivamente por una enzima denominada *Taq* polimerasa (Nelson y Cox, 2007).

El procedimiento de la PCR tiene 3 pasos, que se repiten usualmente entre 25 y 30 ciclos (Figura 1):

1. Desnaturalización de la cadena de ADN: las dos hebras de ADN se separan por calentamiento (normalmente a 95°C).
2. Hibridación o alineamiento: los cebadores de ADN sintético flanquean la región del ADN que se desea amplificar (usualmente ocurre a una temperatura entre 45-65°C).
3. Extensión: el ADN nuevo se sintetiza por polimerización gracias a la acción de la ADN polimerasa (suele llevarse a cabo a 72°C).

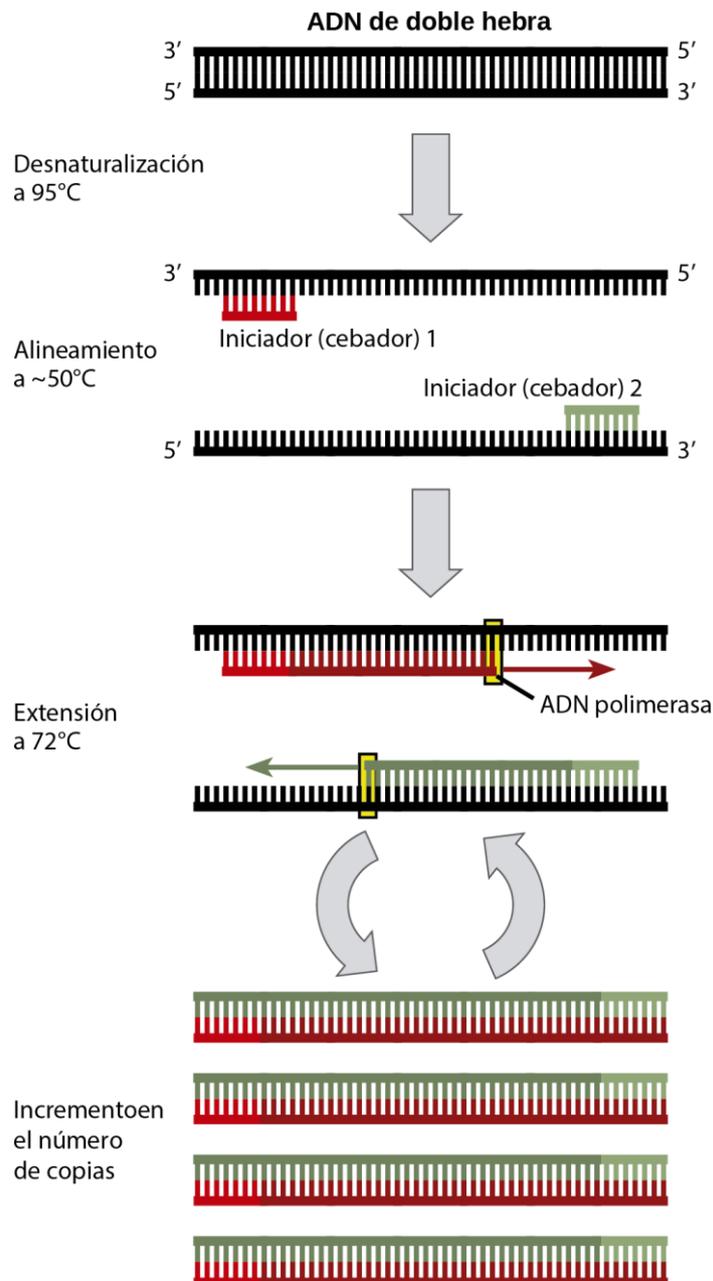


Figura 1. Amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR. Imagen tomada de: <https://archive.cnx.org/contents/67807e37-b253-4d45-92af-9e5cc4c13c57@8.html>.

¿QUÉ SON LOS MICROSATÉLITES?:

Los microsatélites, también llamados SSR (Simple Sequence Repeat), STR (Short Tandem Repeat) o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) son secuencias de ADN constituidas por repeticiones en tándem de unidades cortas de 1 a 6 pares de bases (Jarne y Lagoda, 1996; Selkoe y Toonen, 2006). Los microsatélites comprenden regiones de ADN no codificante. Las repeticiones más abundantes se dan en forma de mono, di y trinucleótidos, y en menor porcentaje en tetra, penta y hexanucleótidos (Kantartzi, 2013).

En plantas, los microsatélites se localizan en regiones no repetitivas del ADN, es decir, en regiones anteriores a la expansión del genoma. A pesar de ello, están localizados uniformemente a lo largo del genoma, aunque son muy variables en el número de unidades repetidas entre individuos. El patrón más abundante encontrado en el genoma de las plantas es $(AT)_n$, $(GA)_n$ y $(GAA)_n$ donde n se refiere al número total de repeticiones, generalmente en el rango de 5 a 40 (Selkoe y Toonen, 2006). Las regiones de ADN que rodean los loci de microsatélites se denominan regiones flanqueantes y generalmente son regiones conservadas entre individuos de la misma especie (a veces incluso entre individuos de especies cercanas filogenéticamente). El desarrollo de marcadores de microsatélites se basa en el diseño de oligonucleótidos cebadores (*primers*) en estas regiones flanqueantes que guíen la amplificación del *locus* de microsatélite mediante PCR.

Como marcadores genéticos, los microsatélites son muy útiles y poseen una gran variedad de aplicaciones en genética y ecología vegetal gracias a su reproductibilidad, su elevada variabilidad alélica debido a una alta tasa de mutación (promedio de 5×10^{-4} mutaciones por locus por generación) (Schlötterer, 2000), su comportamiento selectivamente neutro, una herencia codominante, abundancia relativa y buena cobertura a lo largo del genoma. Entre sus múltiples aplicaciones se encuentra por ejemplo la estima de la variación genética a nivel molecular en una colección de germoplasma que ayude a la correcta elección de progenitores para cruces en un programa de mejora, el mapeo y marcado de genes o QTL (*Quantitative Trait Loci*, loci responsables de rasgos fenotípicos cuantitativos), el estudio de la estructura y variabilidad genética de las poblaciones naturales de plantas así como el establecimiento de relaciones taxonómicas y filogenéticas entre poblaciones y especies (Lowe et al., 2004).

Tradicionalmente un gran obstáculo para el uso de estos marcadores tan versátiles en especies no-modelo era su desarrollo, costoso en tiempo y en dinero (Schoebel et al., 2013). El proceso requería usualmente la preparación de librerías enriquecidas de ADN (fragmentación

del ADN y amplificación de los fragmentos), clonación (inserción de los fragmentos de ADN en plásmidos de células *E. coli* competentes y cultivo de las colonias) y posterior secuenciación mediante secuenciación Sanger de los fragmentos clonados (p.e. Albaladejo et al., 2008, 2010).

TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)

Las técnicas de secuenciación masiva o de próxima generación (*Next Generation Sequencing* o NGS) han revolucionado en la última década el panorama en la secuenciación del ADN. En un breve periodo de tiempo tres marcas comerciales lanzaron al mercado casi de forma simultánea tres plataformas de secuenciación masiva; el pirosecuenciador 454 Life Sciences (Roche, Basilea, Suiza), el Solexa Genome Analyzer (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU) y el SOLiD (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Cada una con sus ventajas e inconvenientes han rebajado los tiempos y sobretodo los costos de secuenciación por base pudiendo generar millones de lecturas de ADN a una escala sin precedente.

Las diferentes técnicas de NGS comparten tres pasos básicos en común (Myllykangas et al., 2012); (i) preparación de librerías de ADN que básicamente consiste en la fragmentación del ADN con enzimas de restricción y la adicción de secuencias cortas conocidas (adaptadores) a los extremos de los fragmentos, (ii) inmovilización de los fragmentos de ADN a una superficie sólida por medio de los adaptadores, y (iii) secuenciación de los fragmentos inmovilizados mediante una amplificación previa de los mismos que permita obtener una señal detectable.

La plataforma de secuenciación que se usó como paso previo a la realización de este TFG fue el pirosecuenciador 454 Life Sciences GS FLX. Un esquema de funcionamiento de esta plataforma se encuentra ilustrado en la figura 2. En esta plataforma la superficie sólida donde se ligan los fragmentos de ADN son cientos de miles de bolitas de 1 μm de diámetro (*beads*) y el proceso de amplificación de ADN se lleva a cabo en una emulsión (*emPCR*). Cada *bead* se encuentra en un pocillo microscópico de una placa denominada Picotiter con millones de pocillos. Los diferentes nucleótidos se van añadiendo de forma secuencial y cuando se incorpora alguno a la cadena de ADN que se está sintetizando en cada pocillo se libera una molécula de pirofosfato que alimenta una serie de reacciones que culminan en la emisión de luz por acción de la enzima luciferasa. Esta señal luminosa queda registrada por un sensor CCD.

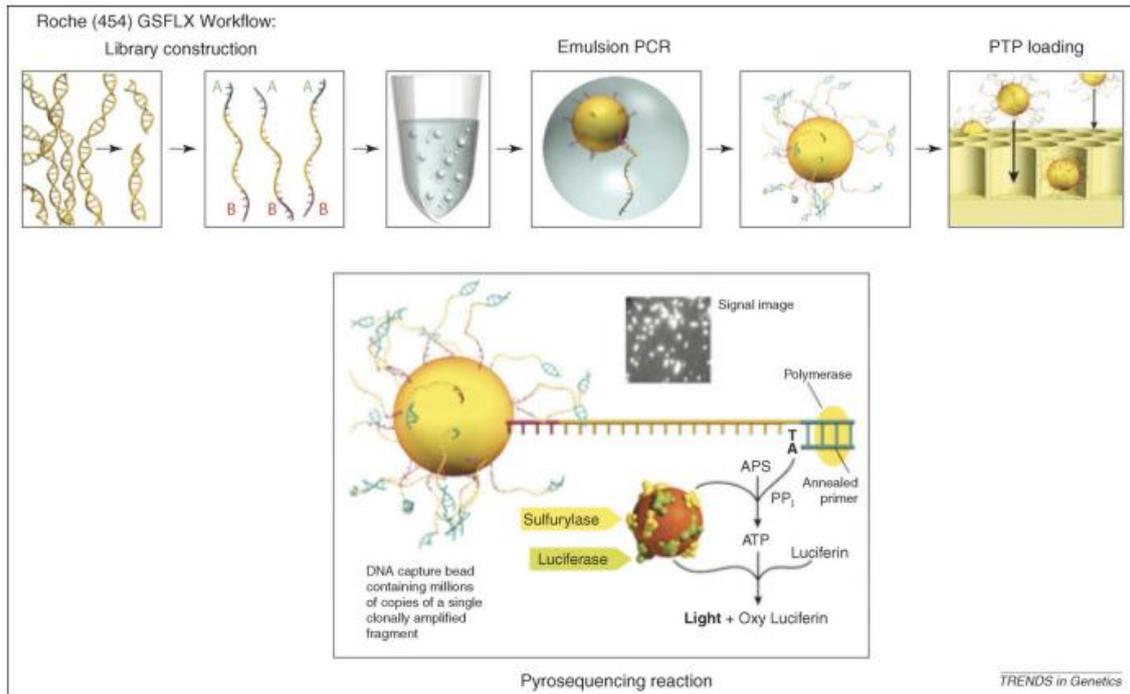


Figura 2. Esquema de funcionamiento de la plataforma 454. La construcción de la librería liga adaptadores específicos a los fragmentos de ADN. Los fragmentos se ligan a las *beads* en una emulsión donde se realiza una PCR para la amplificación de los fragmentos previa a la secuenciación. El panel inferior ilustra la reacción de pirosecuenciación que ocurre tras la incorporación de un nucleótido para reportar la secuencia de síntesis del ADN (tomado de Mardis, 2008).

ANTECEDENTES:

Como paso previo a la realización de este TFG se disponía de los resultados brutos de una carrera de secuenciación realizada en un pirosecuenciador 454 GS FLX situado en el servicio de Biología Molecular del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Para ello se extrajo ADN de un individuo de la especie *Phlomis lychnitis* ($\approx 5 \mu\text{g}$) con el que se construyó una librería siguiendo las pautas del fabricante para su secuenciación en un cuarto de placa Picotiter. Como resultado de la carrera se obtuvieron 91704 lecturas de ADN que se sometieron al análisis bioinformático con la plataforma QDD 2.1 (Meglec et al., 2010). Este software busca secuencias que contengan regiones con microsatélites y diseña los *primers* necesarios para su posterior amplificación. Al final del proceso, esquematizado en la figura 3, se obtuvieron 38 secuencias con microsatélites que fueron apropiadas para el diseño de *primers* y que fueron las seleccionadas para probar su amplificación y variabilidad.



Figura 3. Esquema de procesamiento de las lecturas de ADN con el software QDD 2.1. Las lecturas brutas de ADN provenientes del secuenciador se filtran eliminando aquellas de baja calidad y se alinean por similitud para elaborar secuencias más largas (*contigs*). Se filtran los *contigs* seleccionando solo aquellos que contienen microsatélites en su secuencia. Se eliminan las secuencias redundantes y por último se seleccionan aquellas secuencias para las cuales se pueden diseñar *primers* para su amplificación. Por último, manualmente se descartaron aquellos marcadores que proporcionarían un producto de amplificación esperado menor de 100 pares de base.

ESPECIES DE ESTUDIO:

El género *Phlomis* L. (Lamiaceae) se compone de más de 100 especies distribuidas en Eurasia y el Norte de África (Albaladejo et al., 2004). Consta de muchas especies endémicas de distribución restringida, muchas de las cuales han sido utilizadas a lo largo de siglos en medicina popular, cuyas propiedades farmacológicas están siendo corroboradas por estudios recientes (Amor et al., 2009). Por citar sólo unos ejemplos, *Ph. orientalis* Mill, una especie endémica de Irán, ha mostrado actividad antimelanogénica por lo que puede considerarse un buen candidato en la terapia contra el melanoma (Sarkhail et al., 2017). Recientemente se han demostrado también los efectos antiinflamatorios de *Ph. lanceolata* Boiss. & Hohen. (Mohajer et al, 2006) y de *Ph. purpurea* L. (Algieri et al., 2013), esta última especie siendo un endemismo ibero-norte africano.

Este estudio se centra en dos especies endémicas del género *Phlomis*: *Ph. lychnitis* L. y *Ph. crinita* Cav. subsp. *malacitana* (Pau) Cabezudo, Nieto Caldera & F.B. Navarro. Estas dos especies son caméfitos sufruticosos con tallos erectos y pelosos, con pelos simples, estrellados y glandulosos. Las hojas son basales y caulinares y pecioladas. Las inflorescencias se presentan en verticilastros separados. El cáliz es actinomorfo, con cinco dientes lineares y pelosos. La corola es bilabiada con un tubo cónico. El labio superior es galeado, en forma de casco, cóncavo hacia abajo; y el labio inferior es trilobulado, con un lóbulo central amplio y convexo

hacia arriba en disposición más o menos horizontal. Presenta cuatro estambres con filamentos curvados hacia abajo y anteras con tecas soldadas. El estigma es bífido, con ramas desiguales. Los frutos, núculas, son ovoides, subtrígonas y de color pardo o negruzco (Morales, 2010).

Phlomis lychnitis es una especie que se localiza en la Península Ibérica y en el Sur de Francia (Figura 4). Es un matorral que se localiza en baldíos y lugares nitrificados, preferentemente en pedregales calizos. Vulgarmente, esta especie se conoce como candelaria, cola de gato, matagallo amarillo u oreja de liebre, entre otras.



Figura 4. Área de distribución de *P. lychnitis* basada en datos de presencia según la aplicación GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*; <https://www.gbif.org>).

Este sufrutice se caracteriza por sus hojas lineares o estrechamente elípticas atenuadas en la base con un pecíolo casi indiferenciado. Sus tallos suelen estar erguidos y no ramificados (Figura 5). Presentan una inflorescencia formada por 4-6 verticilastros con seis flores cada uno. Las brácteas son sésiles, anchas en la base y agudas en el ápice y forman una copa cerrada alrededor del verticilastro. Las bractéolas son lineares, con pelos plumosos y largos. La corola es de color amarillo intenso, y el tubo glabro está incluido en el cáliz. El labio superior está cubierto por fuera de pelos estrellados y en su interior se localizan los estambres (Morales, 2010).



Figura 5. *Phlomis lychnitis*. A: Habito. B: Detalle de los verticilastros y flores. Imágenes de Wikipedia (A) y de Rafael G. Albaladejo (B)

Phlomis crinita subsp. *malacitana* es un matorral heliófilo de distribución mucho más restringida que la anterior ya que crece a 1000-2000 m exclusivamente en las montañas del Sur de España, principalmente en Almería, Cádiz, Granada y Málaga (Figura 6). Vulgarmente son conocidas como barbas de pastor, orejas de burro o hierba mechera, entre otras.



Figura 6. Área de distribución de *Ph. crinita* subsp. *malacitana* basada en datos de presencia según la aplicación GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*; <https://www.gbif.org>).

Esta especie se diferencia de *Ph. lychnitis* principalmente en las hojas que son mucho más anchas, ovadas y cordadas en la base. Sus tallos suelen ser ramificados y las brácteas de los verticilastros más cortas y anchas que en *Ph. lychnitis* y en disposición abierta alrededor de los verticilastros. La corola es amarillenta frecuentemente con el labio superior de color pardo-rojizo (Morales, 2010) (Figura 7).

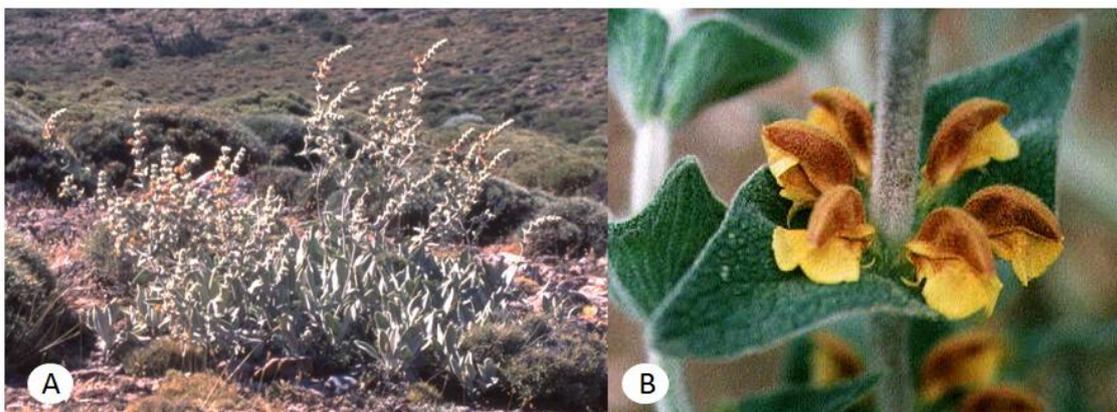


Figura 7. *Phlomis crinita* subsp. *malacitana*. A: Hábito. B: Detalle de los verticilastros y flores. Imágenes de Rafael G. Albaladejo (A y B)

Ambas especies son diploides ($2n = 20$) y filogenéticamente próximas y cuando ambas especies conviven la hibridación es muy frecuente dando lugar a un complejo de híbrido con plantas de morfología intermedia cuyas formas se han denominado como complejo *Phlomis x composita* Pau (Albaladejo et al., 2004, 2005, 2007). El disponer de un conjunto de marcadores de microsatélites supondría un avance cuantitativo y cualitativo en el estudio de estos fenómenos evolutivos tan importantes como son la hibridación y la introgresión.

OBJETIVOS DEL TFG:

Los objetivos que se quieren conseguir con este trabajo se pueden resumir en tres puntos:

- Comprobar la amplificación de las regiones con microsatélites seleccionadas para las cuales se disponía de *primers*.
- Determinar la variabilidad de las regiones amplificables en las dos especies de estudio.
- Calcular parámetros de básicos de diversidad genética y determinar el potencial de estos marcadores para futuros estudios en el complejo hibridógeno entre estas dos especies.

METODOLOGÍA:

MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE ADN

Se recolectaron dos poblaciones para el estudio. Una población de *Ph.lychnitis* situada en la Sierra de Cazorla, Jaén (37°56'13"N; 2°54'16"O) y una población de *Ph. crinita* subsp. *malacitana* en la Sierra de Grazalema, Cádiz (36°44'48"N; 5°23'39"O). En cada una de ellas se recolectaron hojas jóvenes de 20 individuos separados al menos cinco metros que se dispusieron en gel de sílice para su desecación y posterior proceso en el laboratorio.

Para la extracción del ADN se trituraron 20 mg de hojas desecadas de cada individuo en un molino de bolas (Retsch MM200). El polvo resultante se usó como material de partida utilizando el kit de aislamiento de ADN para plantas Invisorb Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular, Berlín, Alemania) siguiendo el protocolo ofrecido por el fabricante con ligeras modificaciones. Para comprobar el éxito de la extracción se cuantificó la concentración de ADN final en 6 muestras mediante fluorimetría con un Qubit Fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NY).

Para amplificar las 38 regiones potenciales con microsatélites se hicieron reacciones de PCR siguiendo la reacción de PCR anidada de Schuelke (2000). Este método permite reducir costes de amplificación y posterior análisis en el secuenciador mediante el uso de tres *primers*, un *primer* directo al que se le añade en el extremo 5' la secuencia del *primer* universal M13 (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'), el *primer* M13 marcado en el extremo 5' con un fluoróforo (que permitirá su detección en el secuenciador automático) y el *primer* reverso. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 10 µl conteniendo agua estéril (5,86 µl), MyTaq Red DNA Polymerase buffer (2 µl), MyTaq Red DNA polymerase (0,2 µl) (Bioline, Londres, Reino Unido), *primer* universal M13 y *primer* reverso (0,4 µl de cada uno a 10 µM), *primer* directo (0,14 µl a 10 µM) y 1 µl de la elución de ADN de cada muestra. El *primer* M13 se marcó con los fluoróforos FAM, NED, VIC o PET.

El ciclo de la PCR constó de un primer paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 seg, anillamiento a 65°C durante 15 seg y extensión a 72°C durante 10 seg, por último terminando con un paso de extensión final de 72°C durante 3 min. En aquellas muestras en las que no se obtuvo un amplificado se repitió la PCR de forma sucesiva rebajando la temperatura de anillamiento desde 62°C hasta 55°C. Para verificar la amplificación de ADN se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Los productos amplificados y marcados con fluorescencia se analizaron en un secuenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en la Unidad de Genómica (Universidad Complutense, Madrid). El análisis y puntuación de los fragmentos amplificados se realizó con el software Peak Scanner Software v1.0 (PE Applied Biosystems). Con este programa se visualizan los fragmentos amplificados de ADN separados en función del fluoróforo y de su tamaño, permitiendo así calcular con precisión el tamaño en pares de base de los fragmentos amplificados.

Una vez puntuados los fragmentos se calcularon parámetros básicos de diversidad genética para cada especie con Genalex v.6.5 (Peakall y Smouse, 2012) incluyendo para cada marcador o *locus* el número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) e índice de fijación (F). El número efectivo de alelos se calculó como $N_e = \frac{1}{1-H_e}$ y proporciona información acerca de la frecuencia de los diferentes alelos en la población. Para la heterocigosidad esperada se utilizó el estimador no sesgado, $H_e = \frac{2n}{2n-1} (1 - \sum p_i^2)$ donde n es el tamaño de muestra, y p_i es la frecuencia del alelo i en la población. Por su parte, el índice de fijación se calcula como $F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$ y proporciona información sobre los apareamientos en una población; valores cercanos a cero indican reproducción aleatoria, valores positivos son indicativos de la existencia de endogamia (*inbreeding*) en la población y valores negativos indican un exceso de heterocigotos debido a una reproducción no aleatoria dirigida (*negative assortative mating*) o a la existencia de hibridación (Hartl, 2000).

Para probar la capacidad diagnóstica de los marcadores resueltos se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para ordenar los genotipos multilocus de cada individuo en un espacio multidimensional. Este análisis se realizó también en Genalex v6.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN:

La concentración medida de ADN en las extracciones fue muy elevada en las muestras seleccionadas ($> 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$), por lo que no se plantearon problemas derivados de un escaso rendimiento en la extracción.

De los 38 marcadores de microsatélites disponibles que se probaron se obtuvo un producto amplificado mediante PCR en 24 de ellos (63%) (Figura 8). El análisis de los fragmentos amplificados y marcados con fluorescencia de estos 24 microsatélites revelaron los siguientes resultados; dos de ellos produjeron patrones poco claros difícilmente interpretables, 12 produjeron un único producto amplificado homogéneo en todas las muestras analizadas (i.e. presentaban un único alelo en la población por lo que no mostraron variabilidad y fueron considerados monomórficos), 10 loci presentaron patrones de amplificación claros y variables (i.e. mostraron diferentes alelos en las poblaciones y se consideraron polimórficos). Las características de los 22 marcadores monomórficos y polimórficos se recogen en la Tabla 1.

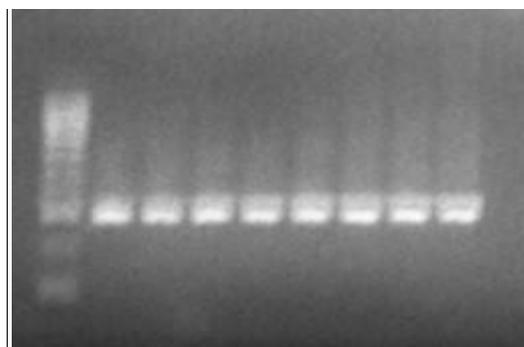


Figura 8. Amplificación de ADN en gel de agarosa al 1,5% del marcador *Phlomis 11*. La primera calle corresponde al marcador de peso molecular (100 bp), las calles 2 a 5 se corresponden con cuatro individuos de *Ph. lychnitis* y las calles 6 a 9 se corresponden con cuatro individuos de *Ph. crinita* subsp. *malacitana*.

Tabla 1. Características de los 22 marcadores de microsatélites desarrollados para especies del género *Phlomis*.

Nombre del Locus	Secuencia del Primer (5'-3')	Motivo de repetición	Tª de anillamiento	Fluoróforo primer M13*
<i>Phlomis 1</i>	F: AACTCCACAGCCAATTCCC R: AGGGCCCATATGTTTACGCT	(CT) ₅	65	FAM
<i>Phlomis 2</i>	F: CAAATGAGTGGCCTGTCCTC R: GCATAAAGGAATAAAGAAAGGAAA	(TTTTC) ₅	55	NED
<i>Phlomis 3</i>	F: TTCCAACATCCAAAGCACAA R: GGATTGAAGCATTATTGAAGCTC	(AG) ₅	65	VIC
<i>Phlomis 4</i>	F: AAACCAATATCCACAAGTAATGC R: CACCAATGCATGTGAGCATC	(AC) ₅	65	FAM
<i>Phlomis 5</i>	F: TTCCTAAATTATGGGTGTCCC R: ACGTGACGTCCGACTGAAAC	(CT) ₅	65	NED
<i>Phlomis 6</i>	F: CGCCATTGACTTGTTACCGT R: TGCTTCTATGGGTTTCGATAACT	(TA) ₅	65	VIC
<i>Phlomis 7</i>	F: GAATGTCCCTGCTCCTACCC R: CCCATCCGACATAGGACAAA	(TC) ₅	65	PET
<i>Phlomis 8</i>	F: CTTGAACCACCTTGGCCTTT R: TCTTACCAATAGTTCCTTGTAGCA	(AC) ₅	65	FAM
<i>Phlomis 9</i>	F: CCTCGAAATTGTTTGGCTTGG R: CGTGGCATAGCACCTCTACC	(CT) ₅	65	NED
<i>Phlomis 10</i>	F: CCTATCGATACCGTGCTTGC R: AAACAAAGAAAGAAAGATCAAATCAAA	(CT) ₅	55	VIC
<i>Phlomis 11</i>	F: TTCCACGACATCGTCTTCCT R: AAAGACTGGTCCCGTCACAA	(TCA) ₅	65	PET
<i>Phlomis 12</i>	F: CAGTGAGATGTGTTTGCCCA R: AGTGGGAGTAAGGGACCTGG	(TTC) ₅	65	FAM
<i>Phlomis 13</i>	F: TGTTGCACTGTGGAATCACC R: GTTCGTGAATCTCCGTCAGG	(TTC) ₅	60	NED
<i>Phlomis 14</i>	F: TGTCAAGGTGCACTGACCAA R: AGAAGGCACTCCAAACCACA	(CTT) ₅	65	VIC
<i>Phlomis 15</i>	F: ACCGTTCAATCGTCACGTCT R: CCATTCAAGCACCTCCAAAG	(TC) ₆	62	PET
<i>Phlomis 16</i>	F: AATTCAAATTGAGAGCCCGC R: TGCTTCTTGCTTGAATCTGC	(AC) ₅	65	FAM
<i>Phlomis 17</i>	F: TGAGTCGAGAATCAGAACCACA R: AGCCTCTCCCGTGGATGTAG	(AC) ₅	65	NED
<i>Phlomis 18</i>	F: TAGGCGTGCGGTGTAAACT R: AGTGGTCGTCCAAGCACAGT	(TC) ₅	62	VIC
<i>Phlomis 19</i>	F: GAAGCCTCAACAGCAGGAGA R: ACGATCCTACATCATTCCGC	(AT) ₅	65	PET
<i>Phlomis 20</i>	F: TTCGAGAAGAGACGAACCAGA R: TGGTTTGCCACTTAGCAAGAA	(AG) ₅	62	FAM
<i>Phlomis 21</i>	F: CTTCACCTGAACTCCAAAGTCA R: AAAGTGTGACTTCTTATGACCAAA	(ATT) ₆	60	NED
<i>Phlomis 22</i>	F: ATCAAAAATTTCCGGCACGAT R: GCTGGGTTAGGTCGGATTTT	(TA) ₁₂	60	VIC

A modo ilustrativo en la figura 9 se muestra la resolución del secuenciador de un marcador monomórfico (*Phlomis 3*) en cuatro individuos, dos de la especie *Ph. lychnitis* y dos de *Ph. crinita* subsp. *malacitana*.

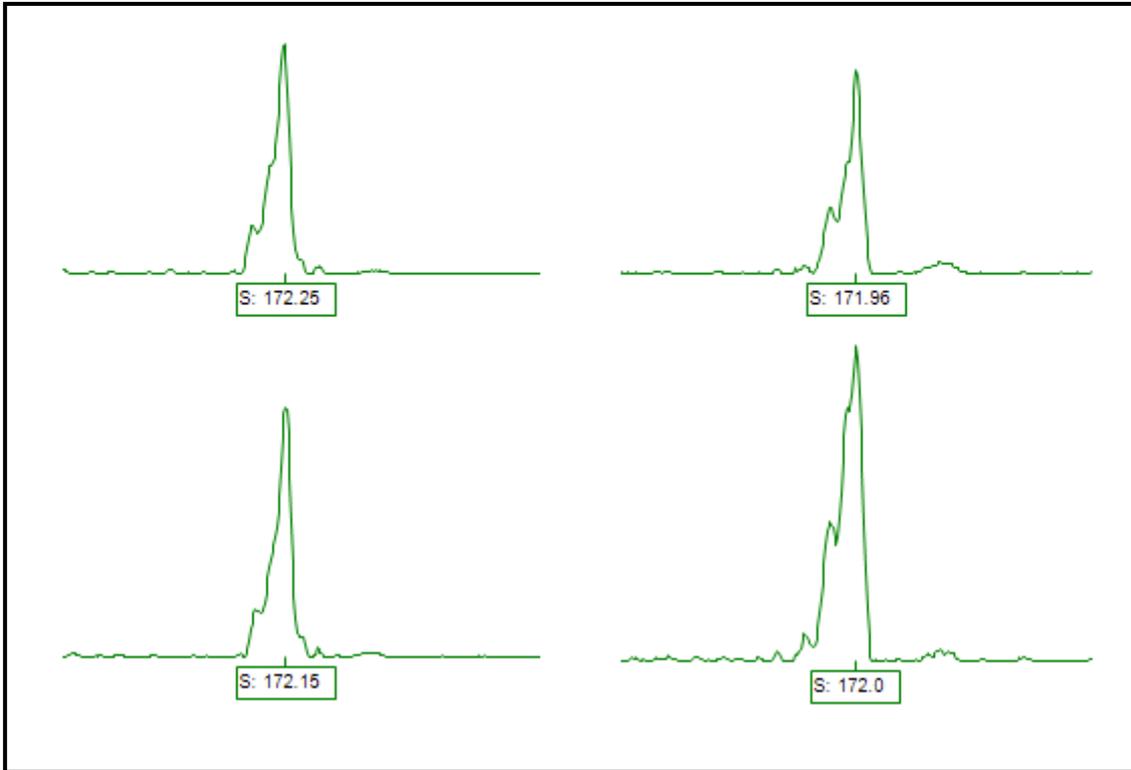


Figura 9. Captura del software Peak Scanner mostrando el microsatélites *Phlomis 3*. Los dos paneles de la izquierda se corresponden con muestras de *Phlomis lychnitis* y los dos paneles de la derecha con *Phlomis crinita* subsp. *malacitana*. En este ejemplo todas las muestras amplificaron un único producto de 172 bp.

Los 10 marcadores polimórficos (aquellos con más de un alelo en la población) fueron los correspondientes a *Phlomis 1*, *Phlomis 2*, *Phlomis 5*, *Phlomis 6*, *Phlomis 9*, *Phlomis 13*, *Phlomis 15*, *Phlomis 17*, *Phlomis 21* y *Phlomis 22*. Hay que destacar que dos de estos marcadores (*Phlomis 1* y *Phlomis 15*) no mostraron variabilidad en la población de *Ph. crinita* subsp. *malacitana*.

En la figura 10 se muestra la salida del secuenciador para el marcador *Phlomis 9* que presenta varios alelos en las dos especies de *Phlomis* estudiadas.

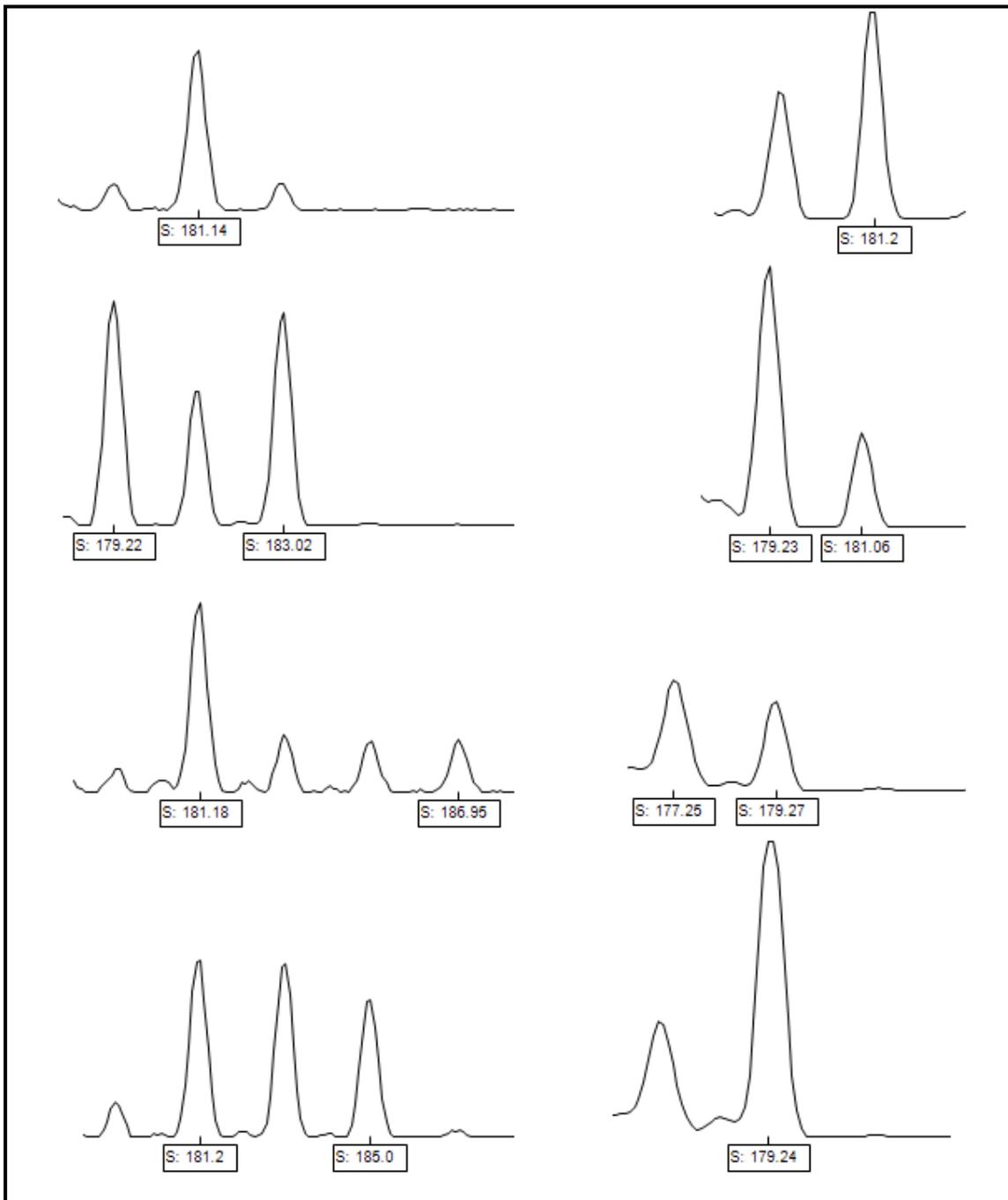


Figura 10. Captura del software Peak Scanner mostrando el microsatélite *Phlomis 9*. Los cuatro paneles de la derecha se corresponden con muestras de *Phlomis lychnitis* y los cuatro paneles de la izquierda con *Phlomis crinita* subsp. *malacitana*. En este ejemplo se muestran cinco alelos diferentes del locus (177-179-181-183-185 bp).

Estos marcadores permitieron calcular parámetros básicos de diversidad genética para cada especie con Genalex v.6.5. Estos valores se encuentran reflejados en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de diversidad genética para las poblaciones de *Phlomis lychnitis* y *Phlomis crinita* subsp. *malacitana* usando el conjunto de marcadores de microsatélites polimórficos.

Nombre del Locus	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	Tamaño de los alelos (bp)	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>F</i>
<i>Phlomis lychnitis</i>						
<i>Phlomis 1</i>	2	1,923	174-176	0,492	0,800	-0,667
<i>Phlomis 2</i>	2	1,882	222-227	0,481	0,750	-0,600
<i>Phlomis 5</i>	2	1,536	150-152	0,358	0,450	-0,290
<i>Phlomis 6</i>	2	1,995	140-142	0,512	0,950	-0,905
<i>Phlomis 9</i>	6	3,137	177-187	0,699	0,450	0,339
<i>Phlomis 13</i>	3	1,946	229-256	0,499	0,650	-0,337
<i>Phlomis 15</i>	4	2,623	192-242	0,635	0,650	-0,051
<i>Phlomis 17</i>	2	1,600	235-238	0,385	0,500	-0,333
<i>Phlomis 21</i>	2	1,980	426-429	0,508	0,700	-0,414
<i>Phlomis 22</i>	2	1,819	199-201	0,462	0,684	-0,520
Media ± SD	2,70±1,34	2,044±0,482		0,503±0,102	0,658±0,159	-0,378±0,344
<i>Phlomis crinita</i> subsp. <i>malacitana</i>						
<i>Phlomis 2</i>	2	1,105	222-227	0,097	0,100	-0,053
<i>Phlomis 5</i>	2	1,406	150-152	0,296	0,350	-0,212
<i>Phlomis 6</i>	2	2,000	140-142	0,513	1,000	-1,000
<i>Phlomis 9</i>	4	1,957	177-187	0,502	0,211	0,569
<i>Phlomis 13</i>	2	1,205	229-256	0,175	0,188	-0,103
<i>Phlomis 17</i>	2	1,430	235-238	0,309	0,368	-0,226
<i>Phlomis 21</i>	2	1,724	426-429	0,431	0,600	-0,429
<i>Phlomis 22</i>	2	1,051	199-201	0,050	0,050	-0,026
Media ± SD	2,25±0,71	1,485±0,371		0,297±0,178	0,358±0,312	-0,185±0,438

Los resultados obtenidos de diversidad genética muestran que la mayoría de los marcadores utilizados no son extremadamente variables, ya que la mayoría de los locus resueltos presentaron solo dos alelos. Estos valores son bajos si se comparan con datos obtenidos en otros estudios en los que se emplearon marcadores de microsatélites. Por ejemplo, en una compilación de estudios de microsatélites en plantas (Nybom, 2004) el número medio de alelos por *locus* reportado por estudio fue de 9.9 alelos/*locus*, bastante superior a los 2,7 alelos/*locus* mostrados aquí para *Ph. lychnitis* y los 2,25 para *Ph. crinita* subsp. *malacitana*.

Los valores de diversidad genética en general fueron mayores en *Ph. lychnitis* que en *Ph. crinita* subsp. *malacitana* de acuerdo con las expectativas de que especies con distribuciones más restringidas presentan por lo general valores más reducidos de diversidad (p.e. Gitzandanner y Soltis, 2000). No obstante, para corroborar este resultado sería necesario un estudio que ampliara de manera significativa el número de poblaciones de cada especie.

Así mismo, es importante resaltar el valor del índice de fijación (F) obtenido. Este dato proporciona información sobre los apareamientos entre individuos en una población. Tal y como se ha comentado anteriormente, valores negativos como los reportados en este estudio, indican un exceso de heterocigosidad debido a una reproducción no aleatoria dirigida (*negative assortative mating*) o a la existencia de procesos de hibridación e introgresión entre especies ya que la mezcla de *pool* genéticos diferentes aumentan mucho la heterocigosidad observada. En este caso, los valores negativos se deben a la hibridación frecuente entre *Ph. lychnitis* y *Ph. crinita* subsp. *malacitana* ya que los valores negativos concuerdan con los valores negativos obtenidos anteriormente para este complejo de especies mediante el uso de otros marcadores moleculares (Albaladejo & Aparicio, 2007).

Sin embargo, a pesar de que los marcadores empleados no son excepcionalmente variables, han mostrado un gran poder para discriminar genéticamente entre las especies. El análisis de coordenadas principales (PCoA) permitió diferenciar los individuos de las dos especies claramente en un espacio multidimensional (Figura 11).

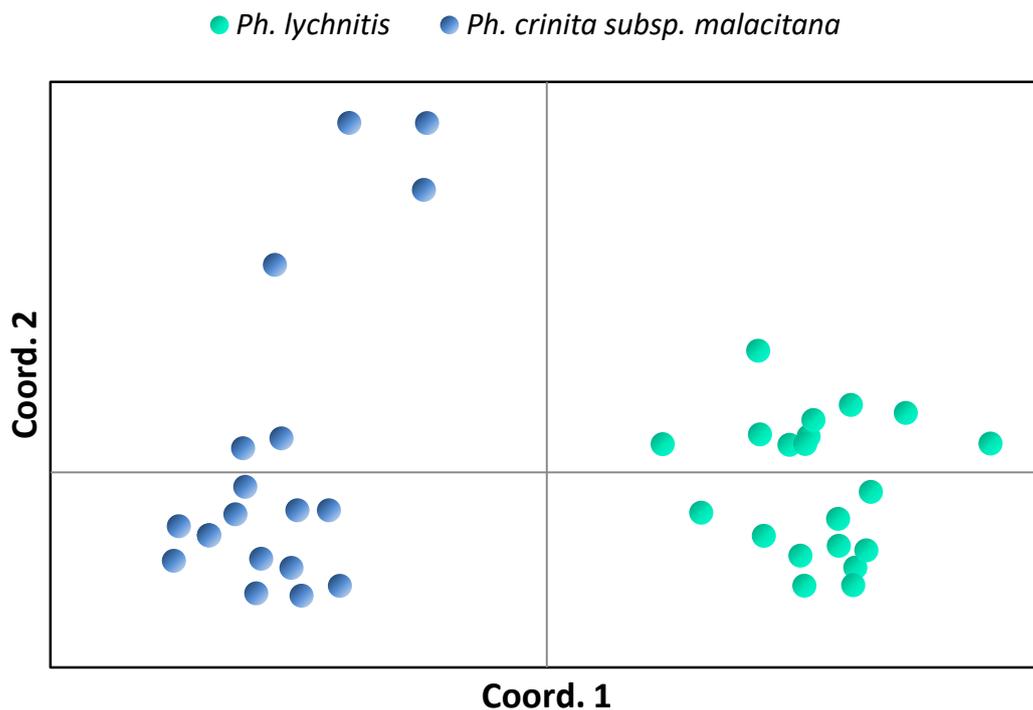


Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en 10 marcadores polimórficos para *Ph. lychnitis* y *Ph. crinita* subsp. *malacitana*.

Con los resultados de este análisis se puede afirmar que el conjunto de marcadores desarrollados serán de utilidad para futuros estudios sobre los patrones de hibridación entre estas especies.

CONCLUSIONES:

En este trabajo se han desarrollado un conjunto de marcadores genéticos que permiten la amplificación de microsatélites específicos para las especies *Ph. lychnitis* y *Ph. crinita* subsp. *malacitana* a partir de técnicas de secuenciación masiva a un coste económico inferior a los métodos tradicionales. Estos marcadores han permitido estudiar la variabilidad genética existente en dos poblaciones de estas especies y servirán para el estudio de sus patrones de hibridación. Otra potencial utilidad de estos marcadores muy interesante sería probar la transferencia de estos marcadores a otras especies del género. Este conjunto de microsatélites es el primero desarrollado para el género. El género *Phlomis* es muy rico en especies endémicas interesantes desde el punto de vista de la genética de la conservación. Disponer de herramientas moleculares útiles es fundamental para asegurar la conservación de las especies, mantener la variabilidad genética de las especies y así garantizar su capacidad de adaptación a un medio cambiante.

BIBLIOGRAFÍA:

Albaladejo RG, Aparicio A, Silvestre S. Variation patterns in the *Phlomis x composita* (Lamiaceae) hybrid complex in the Iberian Peninsula. *Bot J Linn. Soc.* 2004; 145(1): 97–108.

Albaladejo RG, Aparicio A. Population Genetic Structure and Hybridization Patterns in the Mediterranean Endemics *Phlomis lychnitis* and *Ph. crinita* (Lamiaceae). *Ann Bot.* 2007; 100: 732–746.

Albaladejo RG, Sebastiani F, Aparicio A, Buonamici A, González-Martínez SC, Vendramin GG. Development and characterization of eight polymorphic microsatellite loci from *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Mol Ecol Resour.* 2008; 8(4): 904–906.

Albaladejo RG, Sebastiani F, González-Martínez SC, González-Varo JP, Vendramin GG, Aparicio A. Isolation of microsatellite markers for the common Mediterranean shrub *Myrtus communis* (Myrtaceae). *Am J Bot.* 2010; 97(5): e23–e25.

Algieri F, Zorrilla P, Rodríguez-Nogales A, Garrido-Mesa N, Bañuelos Ó, González-Tejero, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *J Ethnopharmacol.* 2013; 146(3): 750–759.

Amor IL-B, Boubaker J, Sgaier MB, Skandrani I, Bhourri W, et al. Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125: 183–202.

Brooker R. *Concepts of Genetics*. 1a ed. Nueva York: Mc Graw Hill; 2012. p. 411–413.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. *A primer of conservation genetics*. 1ª ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2004.

Gitzendanner MA, Soltis PS. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot.* 2000; 87: 783–792.

Hartl DL. *A primer of population genetics*. 3ª ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.; 2000.

Jarne, P, Lagoda PJ. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol.* 1996; 11(10): 424–9.

Kantartzi S. *Microsatellites: Methods and Protocols*. 1a ed. Nueva York: Humana Press; 2013.

Lowe A, Harris S, Ashton P. Ecological genetics: design, analysis and application. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell publishing; 2004.

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet. 2008; 24: 133–141.

Meglécz E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N, et al. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. Bioinformatics. 2010; 26(3): 403–4.

Mohajer M, Sarkhail P, Hajarolasvadi N, Zamani MJ, Khorasani R, Shafiee A et al. Antiinflammatory and Analgesic Effects of *Phlomis lanceolata* Boiss. and Hohen. Extract and Examination of their Components. IJP. 2005; 2 (1): 50–54.

Morales R. *Phlomis* L. En: Morales R, Quintanar A, Cabezas F, Pujadas AJ, Cirujano S, coordinadores. Flora Iberica, vol. XII, Verbenaceae – Labiatae – Callitrichaceae. 1ª ed. Madrid: Real Jardín Botánico CSIC; 2010. p. 206–214.

Myllykangas S, Buenrostro J, Ji HP. Overview of sequencing technology platforms. En: Rodríguez-Ezpeleta N, Hackenberg M, Aransay AM, eds. Bioinformatics for High-Throughput Sequencing. 1ª ed. New York: Springer; 2012. p. 11–25.

National Human Genome Research Institute. Glosario de términos genéticos. [Consultado en abril 2018].

Nelson D, Cox M. Lehninger. Principios de Bioquímica. 5a ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2009. p. 317–318.

Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol Ecol. 2004; 13: 1143–1155.

Peakall R, Smouse PE. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics. 2012; 28(19): 2537–2539.

Sarkhail P, Salimi M, Sarkheil P, Heidarneshad F, Saeidnia S. Evaluation of Anti-Melanogenic and Cytotoxic Activities of *Phlomis caucasica* on Human Melanoma SKMEL-3 Cells. IJC. 2017; 10 (3):e4633.

Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma. 2000; 109: 365–371.

Schoebel CN, Brodbeck S, Buehler D, Cornejo C, Gajurel J, Hartikainen H, et al. Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *J Evol Biol.* 2013; 26(3): 600–11.

Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol.* 2000; 18: 233–4.

Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett.* 2006; 9(5): 615–29.