



VIII Congresso Ibérico
de Geoquímica
XVII Semana
de Geoquímica

PROCURANDO LOCI ASSOCIADOS A VARIÁVEIS DO SOLO ATRAVÉS DE UM VARRIMENTO MOLECULAR EXPLORATÓRIO DO GENOMA NO PSEUDOMETALÓFITO *CISTUS LADANIFER* L.

TRACKING LOCI ASSOCIATED TO SOIL VARIABLES USING AN EXPLORATORY GENOME SCAN IN THE PSEUDOMETALLOPHYTE *CISTUS LADANIFER* L.

Celestino Quintela-Sabaris^{1*}, Maria Margarida Ribeiro², Rita Costa³, M. Isabel Fraga¹

¹ Departamento de Botânica, Faculdade de Biologia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Espanha
tino.quintela.sabaris@gmail.com

² Departamento de Recursos Naturais e Desenvolvimento Sustentável, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, 6001-909, Castelo Branco, Portugal

³ INRB L-INIA Molecular Biology Laboratory, Av. da República Quinta do Marquês, 2780-159 Oeiras, Portugal

Resumo

O uso do varrimento molecular do genoma juntamente com dados ambientais dá-nos a possibilidade de identificar marcadores moleculares com relevância ambiental. Neste trabalho foram analisadas 33 populações do pseudometalófito Mediterrâneo *Cistus ladanifer* L. (Cistaceae) com marcadores moleculares AFLP. Aplicámos Equações de Estimação Generalizadas (GEE) para estudar a correlação entre a distribuição de alelos AFLP e as diferentes características dos solos (pH, razão Ca:Mg e teores totais dos elementos vestigiais Mn, Ni, Pb, Sb e Zn). A análise GEE incluiu informação prévia das linhagens cloroplastidiais para eliminar o efeito da filogeografia. Eliminámos, também, os falsos positivos através do teste de Mann-Whitney e da observação da distribuição geográfica dos alelos. Os resultados mostraram que os teores totais de Mn têm influência na distribuição de alelos de *C. ladanifer* e que esse efeito foi o mais elevado relativamente a todas as outras variáveis do solo. Pelo contrário, a razão Ca:Mg parece não ter nenhum efeito selectivo em *C. ladanifer*, o que é confirmado pelo conhecimento relativo às suas necessidades em cálcio. Finalmente, detectámos um alelo possivelmente relacionado com a tolerância de *C. ladanifer* a solos com elevadas concentrações de Mn. Esta informação pode ser usada na selecção de indivíduos tolerantes a elevadas concentrações de metais tóxicos, Mn em particular, para uso na fitorremediação de solos contaminados.

Palavras-chave: *Cistus ladanifer*, AFLP, Equações de Estimação Generalizadas (GEE), Elementos vestigiais

Abstract

The use of genome scans in parallel with environmental data provides the opportunity to identify molecular markers with environmental relevance. In this work we have analysed 33 populations of the Mediterranean pseudometallophyte *Cistus ladanifer* L. with AFLP markers. Afterwards we have applied Generalized Estimating Equations (GEE) models in order to test the correlation between the AFLP-allele distribution and the different soil properties (pH, Ca:Mg ratio and total soil contents of trace elements Mn, Ni, Pb, Sb and Zn). We included previous chloroplast lineages information in order to remove the influence of phylogeography in the GEE analysis. Moreover, we pruned false positives through Mann-Whitney analyses and the observation of alleles geographic distribution. Our analyses showed that the Mn total soil content had an important effect over the *C. ladanifer* allele distribution, the strongest in relation to the other soil variables considered. In contrast, the Ca:Mg ratio seems to have no selective effect on *C. ladanifer*, which is congruent with previous information about this species Ca requirements. Finally, we report the detection of a particular allele with a possible role over *C. ladanifer* tolerance to high soil Mn concentrations. This information can be used to select individuals tolerant to high concentrations of toxic metals, Mn in particular, which can be used in contaminated soils phytoremediation.

Keywords: *Cistus ladanifer*, AFLP, Generalized Estimating Equations (GEE), Trace elements

Introdução

Os solos com elevadas concentrações em metais (solos metalíferos) são tóxicos para a maior parte das plantas e outros organismos vivos (Shaw et al., 2004). Além disso, os solos poluídos devido às actividades humanas, especialmente as relacionadas com a produção de metais (resíduos de minas e áreas de fundição, entre outras), constituem uma ameaça para o ambiente e para a saúde pública. Estes solos têm normalmente uma escassa (ou mesmo ausente) cobertura vegetal, cujo aumento e tipo de composição pode favorecer a diminuição da lixiviação dos metais e assim diminuir a contaminação das águas subterrâneas ou, então, o solo poluído pode ser arrastado pelo vento e afectar terrenos agrícolas produtivos ou reservas naturais (Ruttens et al., 2006).

No entanto, as zonas metalíferas também podem ser consideradas ilhas ecológicas onde se encontram diferentes espécies de plantas tolerantes a metais. Entre essas espécies, podemos distinguir entre as metalófitas estritas (ou eumetalófitas), cujas populações só crescem em solos metálicos, e as pseudometalófitas (ou metalófitas facultativas), que têm populações metalícolas (M, que crescem em solos metálicos) e populações não-metalícolas (NM, que crescem em solos não metálicos) (Pollard et al., 2002).

Os pseudometalófitos são organismos interessantes visto que possuem normalmente associada à tolerância a metais, outras características (alta adaptabilidade às condições adversas do solo, alta produção de biomassa e boa competitividade, entre outras), que podem torná-las úteis para fitorremediação (Poschenrieder et al., 2001).

O uso de varrimentos do genoma juntamente com dados ambientais possibilita a detecção de marcadores potencialmente ligados a loci adaptativos (Holderegger et al., 2008), como aqueles relacionados com a tolerância aos solos com elevados teores em elementos metálicos.

Os marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995) podem ser utilizados em todos os organismos sem conhecimento prévio de sequências específicas do DNA, produzindo geralmente um elevado número de bandas e considerável polimorfismo (Meudt e Clarke 2007). Por isso, este marcador molecular permite fazer varrimentos do genoma em organismos não-modelo (Bonin et al., 2007). Podemos, por isso, referir que loci AFLP com potencial ecológico relevante foram identificados em *Arabis alpina* (Poncet et al., 2010) e Meyer et al. (2009) encontraram loci supostamente envolvidos na tolerância a metais pesados na espécie pseudometalófita *Arabidopsis halleri*.

Porém, uma das limitações dos varrimentos do genoma é a possível influência de factores históricos e demográficos das populações não relacionados directamente com factores de selecção ambiental (Holderegger et al., 2008). É por isso interessante complementar os AFLP com a informação filogeográfica fornecida por marcadores moleculares baseados no ADN de cloroplasto de herança materna (tais como os microsatélites de cloroplasto \square cpSSR) (Staton et al., 2001).

A espécie *Cistus ladanifer* (Cistaceae) é um arbusto pseudometalófita nativo da região do Mediterrâneo Ocidental (do Sul de França até ao Norte de Marrocos e da Argélia; Demoly e Montserrat, 1993). Além de uma elevada capacidade de adaptação às perturbações nas zonas mediterrânicas, principalmente incêndios (Pérez-García, 1997) e de estresses hídricos e de luz (Núñez-Oliveira et al., 1996), esta espécie tem sido descrita como interessantes na fitoestabilização de solos e na fitoextração de Zn em solos com baixos teores médios deste metal (Díez-Lázaro, 2008).

Num trabalho anterior analisamos 33 populações NM e M (serpentina e minas) de *Cistus ladanifer* com marcadores cpSSR (microsatélites do cloroplasto) provenientes de quase toda a área de distribuição desta espécie (Quintela-Sabarís et al. 2010). Concluímos que as populações M evoluíram em paralelo dentro de duas linhagens do DNA do cloroplasto que se mantiveram isoladas, uma da outra, desde o período glacial.

Neste trabalho, vamos analisar as mesmas 33 populações com marcadores AFLP para identificar nesta espécie loci AFLP potencialmente associados à tolerância a solos metalíferos. Verificámos a correlação entre a distribuição de marcadores AFLP e conteúdo total de metais em solos e aplicámos equações de estimação generalizadas (GEE) para corrigir autocorrelações filogeográficas entre indivíduos dentro das linhagens do cloroplasto.

Material e Métodos

Recolha de amostras de plantas e solos

Foram amostradas trinta e três populações de *C. ladanifer* cobrindo quase toda a área natural geográfica desta espécie. Foram incluídas populações de afloramentos ultramáficos (teores elevados de Co, Cr, Ni, Mn) do N de Marrocos, SE de Espanha e NE Portugal, de áreas afectadas pela actividade humana (minaria, emissões do tráfego- teores elevados de As, Cu, Pb, Sb ou Zn), para além de populações não metalícolas. As populações amostradas são descritas em Quintela-Sabarís et al. (2010).

Para amostrar o material vegetal foi estabelecido um transepto longitudinal em cada população. Foram seleccionadas dez plantas ao

longo de um transecto separadas, pelo menos, de 5 m e foram colhidos frutos maduros em cada uma. As sementes foram semeadas em condições de laboratório. Foi seleccionada uma plântula, por planta mãe, para análises posteriores. As plantas jovens foram congeladas em azoto líquido e mantidas a -20 ° C até à extracção de ADN.

Além disso, em cada local, foram recolhidas uma ou duas amostras de solo com 5-15 cm de profundidade. Cada amostra de solo foi seca ao ar e peneirada com uma malha de 2 mm.

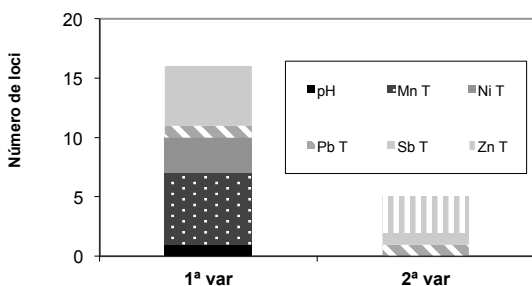


Fig. 1 – Número de *loci* AFLP significativamente correlacionados com as variáveis de solo explicadas através da análise GEE. No caso de *loci* relacionados com 2 variáveis indica-se a de maior peso (1ª var) e a de menor peso (2ª var).

Análise e variáveis do solo

Considerámos inicialmente dezanove variáveis de solo: pH do solo, razão Ca:Mg totais, razão Ca:Mg extraíveis, conteúdo total de As e Sb e teores totais e extraíveis de Co, Cr, Mn, Cu, Ni, Pb e Zn. Empregamos uma solução extratante (Acetato de Amónio 0.5M + EDTA 0.02M + Ácido Acético 0.5M, com pH 4.65, Lakanen e Erviö, 1971) com uma razão solo:extratante de 1:5.

As concentrações totais de Ca e do metalóide As foram quantificadas em sub-amostras sólidas do solo com Espectrometria de Fluorescência de raios X por Energia Dispersiva (EDXRF), enquanto outras sub-amostras foram digeridas com HNO₃ para a quantificação dos teores de Mg através de Plasma Acoplado Indutivamente-Espectrometria de Emissão Óptica (ICP-OES) e para a quantificação de Sb pseudo-total com ICP-Espectrometria de Massas (ICP-MS). Os extractivos de Ca e Mg foram quantificados com Espectrometria de Absorção Atómica em extractos líquidos de solo obtidos de acordo com Quintela-Sabarís *et al.* (2010). Os dados relativos ao pH e teores totais e extraíveis dos outros metais tinham sido publicados anteriormente (Quintela-Sabarís *et al.*, 2010).

Extracção do ADN

O ADN foi extraído a partir de 100 mg de folhas congeladas usando o Plant Mini Kit Dneasy ®

(Qiagen) seguindo as indicações do fabricante. Nalguns casos, foi feita uma lavagem adicional com 500 µl de etanol absoluto para remoção de compostos secundários dos extractos de ADN.

Protocolo dos AFLP e recolha de dados

Realizamos um processo de optimização das condições iniciais de AFLP utilizando AFLP Plant Mapping Kit (Applied Biosystems). Após o procedimento de optimização, foram seleccionadas duas combinações de 'primers' seletivos que originaram padrões de bandas polimórficas de confiança: A combinação A (EcoRI-ACT/MseI-CTG) e a combinação B (EcoRI-AGG/MseI-GAC).

Os produtos selectivos PCR marcados com fluorescência foram separados através de um analisador de ADN ABI 3130 xl (Applied Biosystems). Os ficheiros com os eletroferogramas ABI foram visualizadas e, subsequentemente registados com o programa Genographer v 2.0 (Benham 2001, modificado por Travis Banks e disponível no sítio <http://sourceforge.net/projects/genographer/>).

Os marcadores AFLP têm 2 alelos e foram classificados de acordo com a presença da banda (1) ou ausência de banda (0). As plantas que apresentavam perfis fracos ou muito estranhos foram retiradas da análise. O ADN de 20 plantas (6,5% dos indivíduos analisados) foi reextraído e amplificado, de forma independente. Foi calculada uma taxa de erro de acordo com Bonin *et al.* (2004) e as bandas com uma taxa de erro igual ou superior a 0.2 foram retiradas da análise. Consideramos para a análise todos os fragmentos entre 150 e 500 pb.

Análise estatística

Foi efectuada uma Análise de Componentes Principais com todas as variáveis e só se mantiveram as variáveis menos correlacionadas: pH do solo, razão de Ca:Mg totais e conteúdo total de Mn, Ni, Pb, Sb e Zn. Estas sete variáveis foram utilizadas como variáveis explicativas do solo na identificação de *loci* sob selecção direccional.

Foram utilizadas equações (GEE) a fim de detectar alelos que pudessem estar correlacionados com as variáveis de solo. As GEE são uma extensão dos modelos lineares generalizados (Carl e Kuhn, 2007), que podem considerar a autocorrelação entre as amostras, incluindo uma componente de variância adicional directamente no modelo, independente de estimação dos dados, para acomodar os dados correlacionados. Este método considera que indivíduos mais próximos dentro de cada linhagem do cloroplasto deverão ser, também, geneticamente mais próximos, do que indivíduos pertencentes a linhagens cloroplastidiais diferentes. No trabalho de

Quintela-Sabarís et al. (2010) pudémos inferir que diferentes linhagens podem ter ficado isoladas umas das outras, pelo menos a partir do Último Máximo Glacial.

Como lidamos com dados binários, usámos um logit-link e uma distribuição de erro binomial para correlacionar a ocorrência de alelos de cada *locus* AFLP, por local de amostragem, com polinômios quadráticos das variáveis ambientais. Foram utilizados polinômios quadráticos para se poder ter em consideração a diversidade de curvas resposta com outras formas para além da linear (Legendre e Legendre, 1998). Foi utilizado o critério de informação da quasi-verossimilhança (QIC) adaptado por Pan (2001) para seleção dos melhores modelos GEE: aqueles com o menor QIC. Todas as combinações de variáveis (um total de 128 GEE) foram investigadas para cada *locus*. Todos os modelos GEE foram calculados utilizando o software R *geepack* (Yan e Fine, 2004) e uma aplicação desenvolvida em Poncet et al. (2010) para o cálculo do QIC, elaborada em R (R Development Core Team, 2007). Para cada modelo seleccionado testamos, também, cada coeficiente de regressão utilizando o teste de Wald. Para evitar uma alta taxa de falsos positivos, devido à multiplicidade de testes, os níveis de significância foram calculados através da minimização da taxa de falsos positivos (FDR; Storey, 2002). Os valores P limite para rejeição foram ajustados de maneira a haver menos de um *locus* falso positivo por conjunto de dados que foram estimados usando o software R *q value*.

Resultados

Com as duas combinações de 'primers' A e B foram amplificados um total de 109 e de 112 fragmentos, respectivamente. No entanto, após o processo de filtragem (taxas de erro e limite de leitura em pb) foram tidos em conta 110 marcadores (50 obtidos com a combinação A e 60 com a combinação B). A taxa de erro total para duas combinações foi de 0,055.

Foram usadas as GEE para correlacionar as frequências alélicas com as variáveis de solo tendo em conta as linhagens do cloroplasto. O valor do limiar para a significância que minimiza a taxa de falsos positivos foi estimado em 0,0031. Dezasseis loci (14,5% do total) foram significativamente correlacionados com uma ou duas variáveis do solo, originando um total de 21 relações significativas (Figura 1). MnT e o SbT foram as variáveis de solo com maior influência, pois cada uma delas é responsável por 28,6% das correlações significativas detectadas. O NiT e o ZnT representaram 14% cada. Nenhum *locus* foi significativamente relacionado com a razão Ca:Mg.

A fim de eliminar possíveis falsos positivos, destas 21 relações, foram ainda i) realizados testes de Mann-Whitney U separados para detectar diferenças significativas nas variáveis

do solo, entre o grupo de plantas onde uma certa banda estava ausente e o grupo onde estava presente e ii) observadas as distribuições geográficas das presenças / ausências de banda em cada *locus*.

Os testes de Mann-Whitney U evidenciaram diferenças significativas em apenas 8 *loci* (cinco delas relacionadas com o MnT) (Tabela 1).

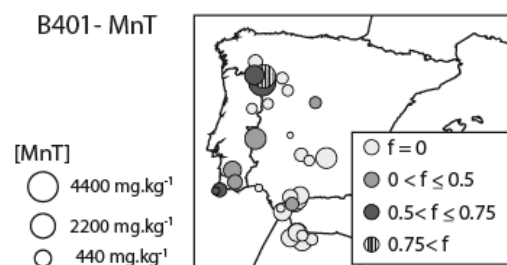


Fig. 2– Distribuição geográfica do locus B401 potencialmente relacionado com o MnT. O diâmetro de cada círculo é proporcional ao valor do MnT em cada população. A cor do círculo representa para cada população, a frequência (f) das plantas em que o AFLP fragmento está presente.

Os mapas de distribuição de presenças da banda em relação às variáveis do solo mostram que várias bandas aparecem, em particular, em populações com baixos teores de metais e, assim, essas bandas podem não estar de facto relacionadas com a presença de metais no solo. No entanto, duas bandas (B401 e B485) estão presentes sobretudo em populações com os teores mais elevados de manganês do solo. O mapa de presenças do *locus* B401 é apresentado na Figura 2.

Discussão

Neste trabalho aplicámos GEE aos dados que obtivémos a fim de revelar *loci* potencialmente relacionados com variáveis do solo (pH, Ca e Mg e metais pesados dos solos, em especial). Contrariamente a outros métodos para a detecção de *loci* sob seleção, as GEE são insensíveis a erros causados pela reduzida dimensão da amostra (Holderegger et al., 2008). Esta questão era particularmente importante no nosso estudo, atendendo ao baixo número médio de plantas por população. Além disso, corrigimos os resultados relativamente ao efeito de filogeografia. Como não observamos qualquer efeito das condições climáticas nas análises efectuadas (análises de PCA em variáveis climáticas, dados não apresentados), podemos concluir que os modelos de distribuição do alelo refletem principalmente a influência das variáveis de solo.

Em relação às variáveis do solo, é de realçar que não foram detectados quaisquer loci relacionados com a relação Ca:Mg, o que parece indicar uma ausência de efeito selectivo desta variável do solo em *C. ladanifer*. Níveis de Mg superiores aos de Ca são considerados um

dos principais fatores de estresse para o crescimento das plantas em solos serpentínicos (Brady et al., 2005). Este resultado inesperado é congruente com a informação prévia relativa aos requisitos de baixos teores de Ca ou de exigências elevadas de Mg em *C. ladanifer* como traços competitivos, que permitem que esta planta cresça em solos de serpentina no SE de Espanha (Alados et al., 1999) e no N de Marrocos (Ater et al., 2000), respectivamente.

Contrariamente à razão Ca: Mg, o conteúdo total de manganês nos solos (MnT) mostrou ser a mais influente das variáveis do solo. O seu efeito, maior do que o de outras variáveis (NiT e PbT) com uma faixa de variação similar (até vários milhares de mg kg⁻¹ no solo), pode estar relacionado com a maior mobilidade deste elemento no solo em comparação com o Ni e o Pb (Friedland, 1990).

O manganês é um micronutriente essencial para o metabolismo da planta (Epstein e Bloom, 2005), mas pode ser tóxico em concentrações elevadas. Assim, as plantas têm de desenvolver mecanismos para regular a absorção e translocação deste elemento no corpo da planta a fim de satisfazer as necessidades da planta, mas mantendo os níveis de Mn abaixo do limiar de segurança deste metal (Wenzel et al., 2004).

Tabela 1 - Resumo dos testes de Mann-Whitney U efectuados nos loci detectados pelas GEE. Apenas os loci com resultados significativos ($P < 0,05$) são apresentados.

Locus	Related Variable	U	P (2-tailed)
A183	SbT	5302.0	< 0.001
A189	pH	1101.5	< 0.001
A339	NiT	2626.5	0.016
B293	MnT	1273.0	0.013
B320	MnT	2677.0	0.026
B391	MnT	742.5	0.001
B401	MnT	2614.5	0.001
B485	MnT	1065.0	0.002
B485	PbT	997.0	0.001

Isso é importante para a *C. ladanifer*, que tem sido descrita na literatura como um acumulador de Mn (por exemplo: de la Fuente et al., 2010), especialmente em algumas populações que crescem em áreas onde os teores de Mn são especialmente elevados (como as áreas de serpentina no NE de Portugal ou de resíduos de minas no Centro da Península Ibérica).

Entre os loci cuja distribuição foi significativamente relacionada com MnT, podemos indicar o locus B401 como estando ligado a genes envolvidos na tolerância a níveis crescentes de Mn. Apoiamos essa afirmação no seguinte: i) o alelo 'presente' é mais frequente em populações com altos valores de MnT e ii) essas populações estão distribuídas numa ampla área geográfica, não sofrendo, por isso, de efeitos demográficos locais. Curiosamente, a

maioria das populações onde B401 está presente pertencem à linhagem do cloroplasto 'Norte', que acumula maiores teores de Mn do que a linhagem 'Sul' (resultados não publicados).

No entanto, estamos conscientes de que são necessários mais testes (por exemplo, experiências de transplante recíprocas, Holderegger et al., 2008) a fim de provar a vantagem adaptativa ou seletiva da banda B401 em relação ao Mn.

Em resumo, provámos as potencialidades da análise de GEE, uma vez que permitiu estimar quais as variáveis de solo que explicaram melhor as distribuições de alelos em *C. ladanifer* e forneceram-nos indicações úteis para seleccionar os indivíduos tolerantes a altas concentrações de metais potencialmente tóxicos, Mn em particular, que podem ser usados na fitorremediação de solos contaminados.

Agradecimentos

À Dr.^a Isabel Evaristo (INRB L-INIA) que colaborou na optimização do protocolo AFLP.

Referências Bibliográficas

- Alados, C.L., Navarro, T., Cabezudo, B., 1999. Tolerance assessment of *Cistus ladanifer* to serpentine soils by developmental stability analysis. *Plant Ecol.* 143, 51- 66.
- Ater, M., Lefèbvre, C., Gruber, W., Meerts, P., 2000. A phytogeochemical survey of the flora of ultramafic and adjacent normal soils in North Morocco. *Plant Soil* 218, 127- 135.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P.B., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261– 3273.
- Bonin, A., Ehrich, D., Manel, S., 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionist. *Mol. Ecol.* 16, 3737– 3758.
- Brady, K.U., Kruckeberg, A.R., Bradshaw, H.D., 2005. Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Ann. Rev. Ecol. Evol.* S. 36, 243– 266.
- Carl, G., Kuhn, I., 2007. Analyzing spatial autocorrelation in species distribution using Gaussian and logit models. *Ecol. Model.* 207, 159- 170.
- Demoly, J.P., Montserrat, P., 1993. *Cistus* L. In: Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (Eds.), *Flora Iberica*, vol. 3. Real Jardín Botánico. CSIC, Madrid, pp. 319– 337.

- Díez-Lázaro, J., 2008. *Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas*. Unpublished PhD thesis, Fac. of Biology, Univ. de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 336 pp.
- Epstein, E., Bloom, A.J., 2005. *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*, 2^a ed. Sinauer Associated Press, Sunderland, 380 pp.
- Friedland, A.J., 1990. The movement of metals through soils and ecosystems. In: Shaw, A.J., (Ed.) *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press, Boca Raton, pp 7- 19.
- de la Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Zuluaga, J., 2010. Metal accumulation screening of the Río Tinto flora (Huelva, Spain). *Biol. Trace Elem. Res.* 134, 318-341.
- Holderegger, R., Herrmann, D., Poncet, B., Gugerli, F., Thuiller, W., Taberlet, P., Gielly, L., Rioux, D., Brodbeck, S., Aubert, S., Manel, S., 2008. Land ahead: using genome scans to identify molecular markers of adaptive relevance. *Plant Ecol. Divers.* 1, 273- 283.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*, 2nd English ed. Elsevier, Amsterdam, 870 pp.
- Meudt, H.M., Clarke, A.C., 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12, 106- 117.
- Meyer, C.L., Vitalis, R., Saumitou-Laprade, P., Castric, V., 2009. Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Mol. Ecol.* 18, 2050- 2062.
- Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J., Escudero, J.C., 1996. Adaptability of leaves of *Cistus ladanifer* to widely varying environmental conditions. *Funct. Ecol.* 10, 636- 646.
- Pan, W., 2001. Model selection in estimating equations. *Biometrics* 57, 529- 534.
- Pérez-García, F., 1997. Germination of *Cistus ladanifer* seeds in relation to parent material. *Plant Ecol.* 133, 57- 62.
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A.C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Cr. Rev. Plant Sci.* 21, 539- 566.
- Poncet, B., Herrmann, D., Gugerli, F., Taberlet, P., Holderegger, R., Gielly, L., Rioux, D., Thuiller, W., Aubert, S., Manel, S., 2010. Tracking genes of ecological relevance using a genome scan in two independent regional population samples of *Arabis alpina*. *Mol. Ecol.* 19, 2896- 2907.
- Poschenrieder, C., Bech, J., Llugany, M., Pace, A., Fenés, E., Barceló, J., 2001. Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant Soil* 230, 247- 256.
- Quintela-Sabarís, C., Vendramin, G.G., Castro-Fernández, D., Fraga, M.I., 2010. Chloroplast microsatellites reveal that metalicolous populations of the Mediterranean shrub *Cistus ladanifer* have multiple origins. *Plant Soil* 334, 161- 174.
- R Development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Ruttens, A., Mench, M., Colpaert, J.V., Boisson, J., Carleer, R., Vangronsveld, J., 2006. Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environ. Pollut.* 144, 524- 532.
- Shaw, B.P., Sahu, S.K., Mishra, R.K., 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds). *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin, pp 84-126.
- Staton, J.L., Schizas, N.V., Chandler, G.T., Coull, B.C., Quattro, J.M., 2001. Ecotoxicology and population genetics: the emergence of "Phylogeographic and Evolutionary Ecotoxicology". *Ecotoxicology* 10, 217- 222.
- Storey, J.D., 2002. A direct approach to false discovery rates. *J. Roy. Stat. Soc. B.* 64, 479- 468.
- Vos, P., Hagers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- Wenzel, W.W., Lombi, E., Adriano, D., 2004. Root and rhizosphere processes in metal hyperaccumulation and phytoremediation technology. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.) *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin, pp 313-344.
- Yan, J., Fine, J.P., 2004. Estimating equations for association structures. *Stat. Med.* 23, 859- 880.

