

EVOLUCIÓN DEL ADN SATÉLITE EN LA PLANTA DIOICA *RUMEX HASTATULUS* (POLYGONACEAE)

Quesada del Bosque M.E.¹, Navajas-Pérez R.¹, Panero J.L.², Fernández-González A.¹ & Garrido-Ramos M. A.¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, España.

²Section of Integrative Biology, 1 University Station, A6700, 141 Patterson Building, University of Texas, Austin, TX 78712, USA.



Las especies dioicas del género *Rumex* forman un grupo monofilético en el que se distinguen dos grupos. Uno, compuesto por especies cuya determinación sexual depende de un sistema cromosómico del tipo XX/XY (estas especies presentan un mecanismo de determinación basado en la presencia de un cromosoma Y activo), entre las que se encuentran especies como *R. acetosella*, *R. graminifolius*, *R. suffruticosus*, *R. paucifolius* y *R. hastatulus*. El otro grupo está compuesto por especies que, como *R. acetosa* y especies afines como *R. papillaris*, *R. intermedius* o *R. thyrsoides*, presentan un sistema de determinación cromosómica del tipo XX/XY₁Y₂ (estas especies tienen un mecanismo de determinación sexual basado en la relación X/A). Mientras que las especies XX/XY presentan cromosomas sexuales escasamente diferenciados, las especies XX/XY₁Y₂ tienen cromosomas sexuales en un estadio evolutivo más avanzado con heteromorfía y diferenciación. Los cromosomas Y de estas especies son heterocromáticos habiendo acumulado un conjunto de secuencias repetidas del tipo ADN satélite y elementos móviles. En concreto, las familias de ADN satélite presentes en los Ys de estas especies son la familia RAYSI, compuesta por repeticiones de unos 930 pares de bases (pb), y la familia RAE180, compuesta por repeticiones de unos 183 pb. Ésta última está presente además en un pequeño locus autosómico. La familia RAYSI es específica de los cromosomas Y, siendo exclusiva de las especies XX/XY₁Y₂, mientras que la familia RAE180 es común a todas las especies dioicas. Sin embargo, RAE180 es una familia repetitiva poco representada en el clado de las especies XX/XY donde, además, ocupa una localización autosómica.

R. hastatulus es una especie americana que presenta dos razas cromosómicas genéticamente —aunque no morfológicamente— diferenciadas. Estas dos razas difieren en el mecanismo de determinación sexual y en el sistema de cromosomas sexuales. Así, la llamada raza de Texas presenta un sistema de cromosomas sexuales XX/XY (y un mecanismo de determinación basado en la presencia de un Y activo), mientras que la raza de Carolina del Norte tiene un sistema de cromosomas sexuales del tipo XX/XY₁Y₂ (mecanismo de determinación sexual basado en la relación X/A). Independientemente de esto, de acuerdo a datos citogenéticos y moleculares, la raza de Carolina del Norte se clasifica dentro del clado de especies XX/XY, habiéndose originado de forma secundaria mediante un cambio evolutivo desde un sistema XX/XY a un sistema XX/XY₁Y₂. Así pues, este hecho ha ocurrido dos veces en la evolución del género *Rumex* de manera independiente: una, en el ancestral que dio origen al clado de especies dioicas del tipo XX/XY₁Y₂; y otra, en la especie *R. hastatulus*.

En este contexto, nosotros nos hemos propuesto analizar la presencia de secuencias RAE180 en *R. hastatulus* y usarlas como marcadores evolutivos tratando de dilucidar: a) si la aparición del sistema XX/XY₁Y₂ en *R. hastatulus* ha ido acompañada de heterocromatinización y/o degeneración de los cromosomas Y como en el linaje de *R. acetosa* y especies afines; b) si las secuencias RAE180 se han amplificado diferencialmente en alguna de las dos razas de *R. hastatulus*, especialmente en la raza de Carolina del Norte; c) si existe un patrón de evolución concertada en dichas secuencias RAE180; d) si las secuencias RAE180 constituyen un buen marcador evolutivo del proceso de diferenciación acaecido entre las dos razas de *R. hastatulus*; e) si la comparación de las secuencias RAE180 de *R. hastatulus* con las de otras especies dioicas del género *Rumex* puede esclarecer algo acerca de la evolución de estas secuencias en particular y del ADN satélite en general.

Mediante PCR se han aislado repeticiones RAE180 de varios individuos de ambos sexos de cada una de las dos razas de *R. hastatulus*. Se clonaron los amplificados y se secuenciaron un conjunto representativo de clones de las diferentes genotecas RAE180. En total, se analizaron las secuencias de 76 monómeros RAE180 de la raza de Texas y de 58 monómeros de la de Carolina del Norte (Tabla 1).

	Número de monómeros analizados			Variabilidad			
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Hembras-Machos	Total
Texas	33	43	76	0.13	0.07	0.11	0.10
Carolina del Norte	34	24	58	0.12	0.15	0.13	0.13

Tabla 1. Número de repeticiones RAE180 secuenciadas y variabilidad intraespecífica para cada raza de *R. hastatulus*.

En el caso de la raza de Texas el porcentaje medio de variación fue del 10% (Tabla 1). En la Figura 1 se muestra el árbol filogenético de las secuencias RAE180 de Texas en el que se puede observar que dichas secuencias no se agrupan de forma independiente por sexo de procedencia ni por individuo, pero sí que lo hacen de acuerdo a la existencia de 3 grupos diferenciados o subfamilias de RAE180 denominadas TX1 (la más abundante, 82% de las secuencias), TX2 (4%) y TX3 (14%). La variación dentro de cada subfamilia es baja pero la divergencia entre ellas es considerable (Tabla 2). La mayor parte de la variación en la subfamilia TX1 fue debida a secuencias muy divergentes como TXF215 y TXF230 que aparecen en el árbol filogenético como un conjunto de secuencias separadas del resto de secuencias TX1 (Figura 1).

La variación media entre las secuencias de la raza de Carolina del Norte es de un 13% (Tabla 1). En este caso, también se agrupan los monómeros RAE180 en tres grupos filogenéticos (Figura 2) que constituyen las subfamilias NC2 (ortóloga a TX2; en este caso, la más abundante con un 85% de las secuencias), NC1 (ortóloga a TX1, 10%) y NC3 (ortóloga a TX3, 5%). La variación dentro de cada subfamilia y entre subfamilias se muestra en la Tabla 3.

Raza cromosómica	Variación por subfamilias		
	NC1	NC2	NC3
Carolina del Norte	0.181	0.069	0.200

Divergencia entre subfamilias	
NC-1/NC-2	0.256
NC-1/NC-3	0.343
NC-2/NC-3	0.339

Tabla 3. Análisis de la variación dentro de cada subfamilia RAE180 y divergencia entre ellas en la raza de Carolina del Norte de *Rumex hastatulus*.

Divergencia entre secuencias ortólogas	
TX-1/NC-1	0.252
TX-2/NC-2	0.050
TX-3/NC-3	0.179

Divergencia entre los dos tipos de secuencias más comunes en cada raza	
TX-1/NC-2	0.190

Tabla 4. Divergencia entre secuencias RAE180 de las dos razas de *R. hastatulus*.

La Figura 3 muestra las relaciones de ortología y parología entre las distintos tipos de secuencias RAE180 aisladas de cada raza de *R. hastatulus*. Las secuencias NC1 se parecen más a las secuencias divergentes de TX1 (TXF215 y TXF230; Figura 1) y, por eso, aparecen en este árbol asociadas. La divergencia global entre las secuencias RAE180 de ambas razas es de un 21%. La Tabla 4 muestra la divergencia existente entre secuencias ortólogas de ambas razas. En el árbol filogenético de la Figura 3 destacan dos grandes clados de secuencias que diferencian las dos razas de *R. hastatulus* dado que más del 80% de las repeticiones RAE180 en cada raza pertenecen a una de dos subfamilias: TX1 en el caso de Texas y NC2 en el caso de Carolina del Norte. La distancia genética entre TX1 y NC2 es de 0.19 (Tabla 4).

Hemos estimado que la familia de ADN satélite RAE180 representaría aproximadamente el 2x10⁻⁴ del genoma de *R. hastatulus* en ambas razas sin que existan diferencias entre machos y hembras. Esto quiere decir que en cada raza, tanto en machos como en hembras, existen unas pocas decenas de secuencias RAE180. Mediante FISH no hemos sido capaces de detectar este tipo de secuencias en los cromosomas de *R. hastatulus*. Además, no existen regiones de heterocromatina DAPI+ ni en los cromosomas sexuales ni en autosomas de ninguna de las dos razas de esta especie (Figura 4).

Adicionalmente, hemos comparado las secuencias RAE180 de *R. hastatulus* con las secuencias RAE180 de otras especies dioicas de *Rumex*: especies con sistema cromosómico del tipo XX/XY₁Y₂ como *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*, y especies con sistema XX/XY (*R. acetosella* y *R. suffruticosus*). El árbol filogenético resultante se muestra en la Figura 5. Existen dos clados principales de secuencias RAE180. Uno de ellos incluye a las secuencias RAE180 de *R. hastatulus* con las de *R. acetosella*. Se observan en este grupo de secuencias, dos subgrupos: uno compuesto por secuencias de *R. acetosella* mezcladas con secuencias del tipo TX1/NC1 de *R. hastatulus* y otro en el que se engloban las secuencias TX2/NC2 por un lado y las secuencias TX3/NC3 por otro. El segundo clado está compuesto por las secuencias RAE180 de *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*, que no se agrupan por afinidad taxonómica. Además, las repeticiones de *R. suffruticosus* también aparecen en este clado pero asociadas aparte de las del resto de especies. Este árbol filogenético de secuencias no se ajusta a la filogenia del género *Rumex* sino que vendría a explicar más bien la evolución de las secuencias RAE180 siguiendo un patrón que se ajustaría perfectamente a la hipótesis de la "biblioteca". Según esta hipótesis, en el ancestral común a todas las especies dioicas del género *Rumex* existiría una "biblioteca" de diferentes variantes de la secuencia RAE180, cada una de las cuales se habría amplificado diferencialmente en linajes diferentes: a) la variante TX1/NC1, relacionada con la variante existente en *R. acetosella*, en la raza de Texas de *R. hastatulus*; b) la variante TX2/NC2 en la raza de Carolina del Norte de *R. hastatulus*; c) una variante específica en *R. suffruticosus*; y d) una variante específica del clado XX/XY₁Y₂. Esta última se amplificaría masivamente en los cromosomas Y del ancestral de estas especies y, dada la ausencia de recombinación que afecta a dichos cromosomas, se generó una gran variabilidad que se ha mantenido en todas las especies de este grupo (Navajas-Pérez et al. 2009; Mol. Gen. Genomics, en prensa)

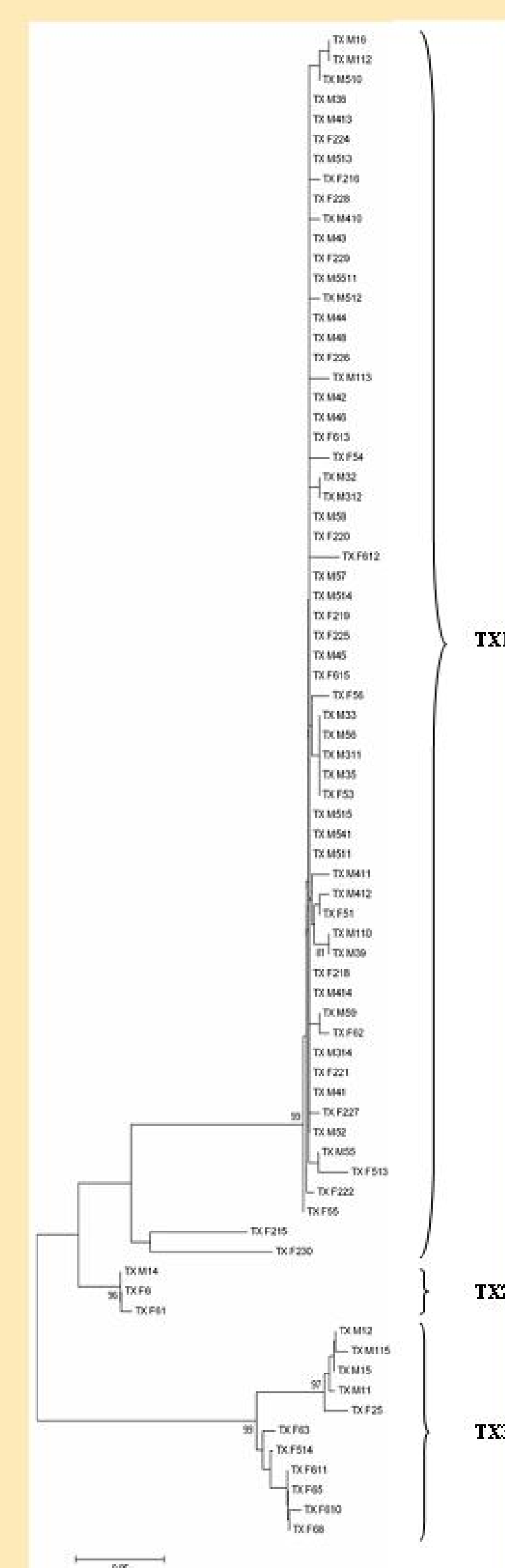


Figura 1. Árbol filogenético de las secuencias RAE180 de la raza de Texas de *R. hastatulus*. Código de las secuencias: TX, Texas; F, M, Hembra o Macho; Numeración: número de individuo y número de clon analizado.

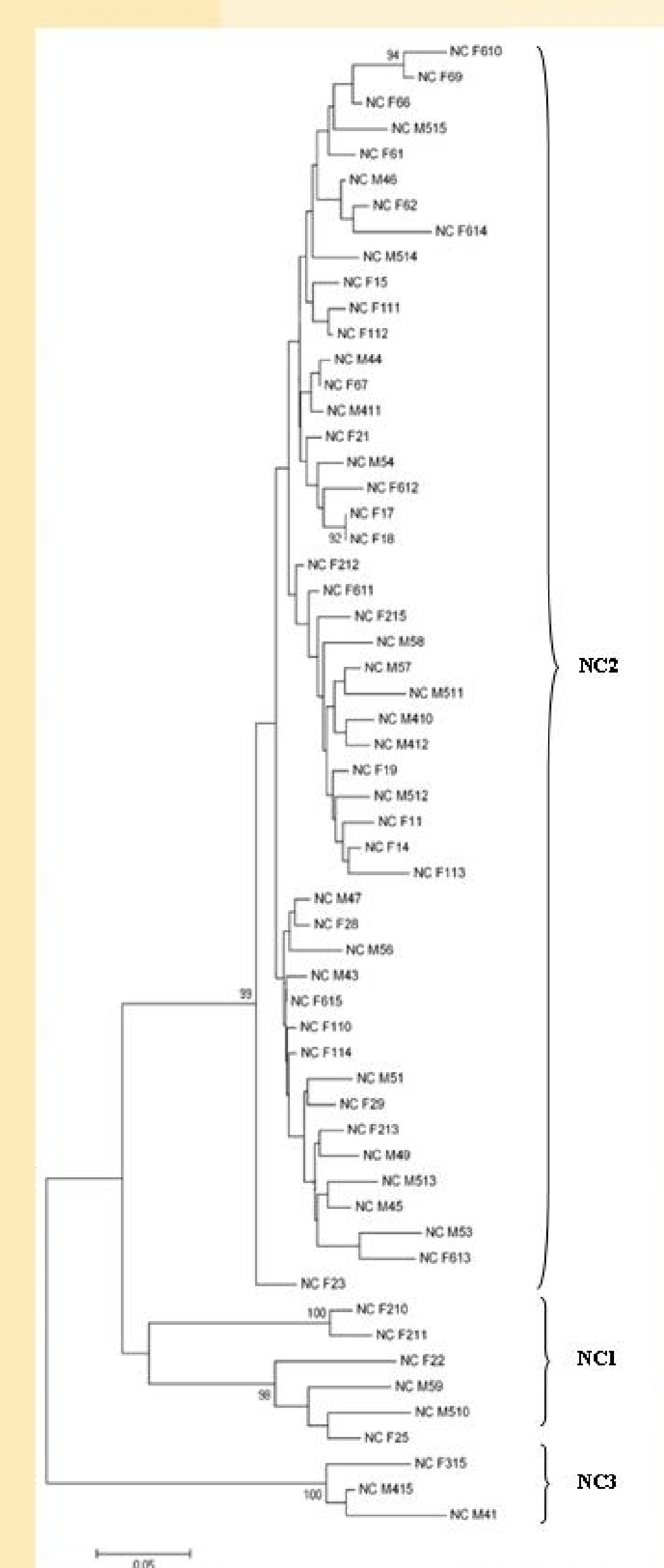


Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias RAE180 de la raza de Carolina del Norte de *R. hastatulus*. Código de las secuencias: NC, Carolina del Norte; F, M, Hembra o Macho; Numeración: número de individuo y número de clon analizado.

Raza cromosómica	Variación por subfamilias		
	TX1	TX2	TX3
Texas	0.019	0.004	0.036

Divergencia entre subfamilias	
TX-1/TX-2	0.159
TX-1/TX-3	0.353
TX-2/TX-3	0.246

Tabla 2. Análisis de la variación dentro de cada subfamilia RAE180 y divergencia entre ellas en la raza de Texas de *Rumex hastatulus*.

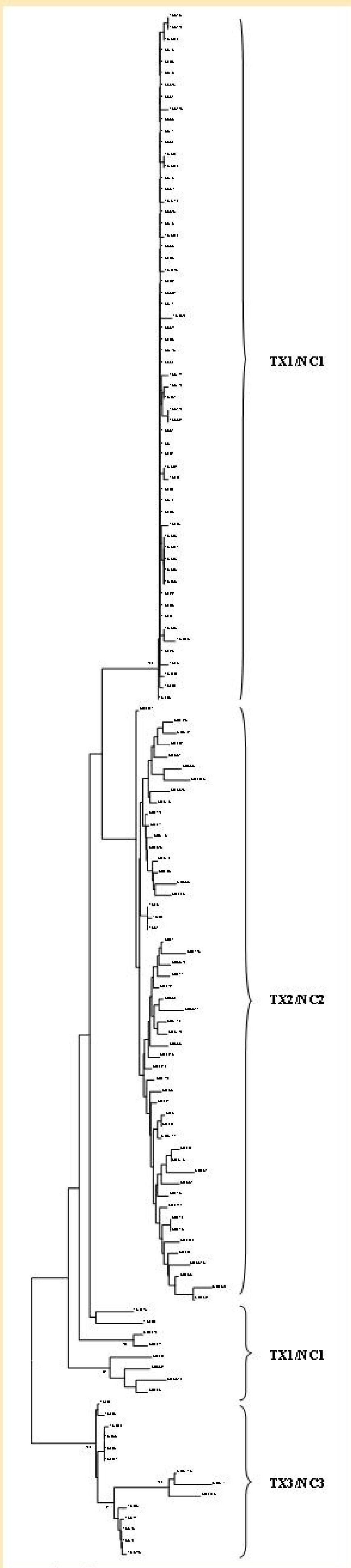


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias RAE180 de las dos razas de *R. hastatulus*. Código de las secuencias: como en las Figuras 1 y 2.

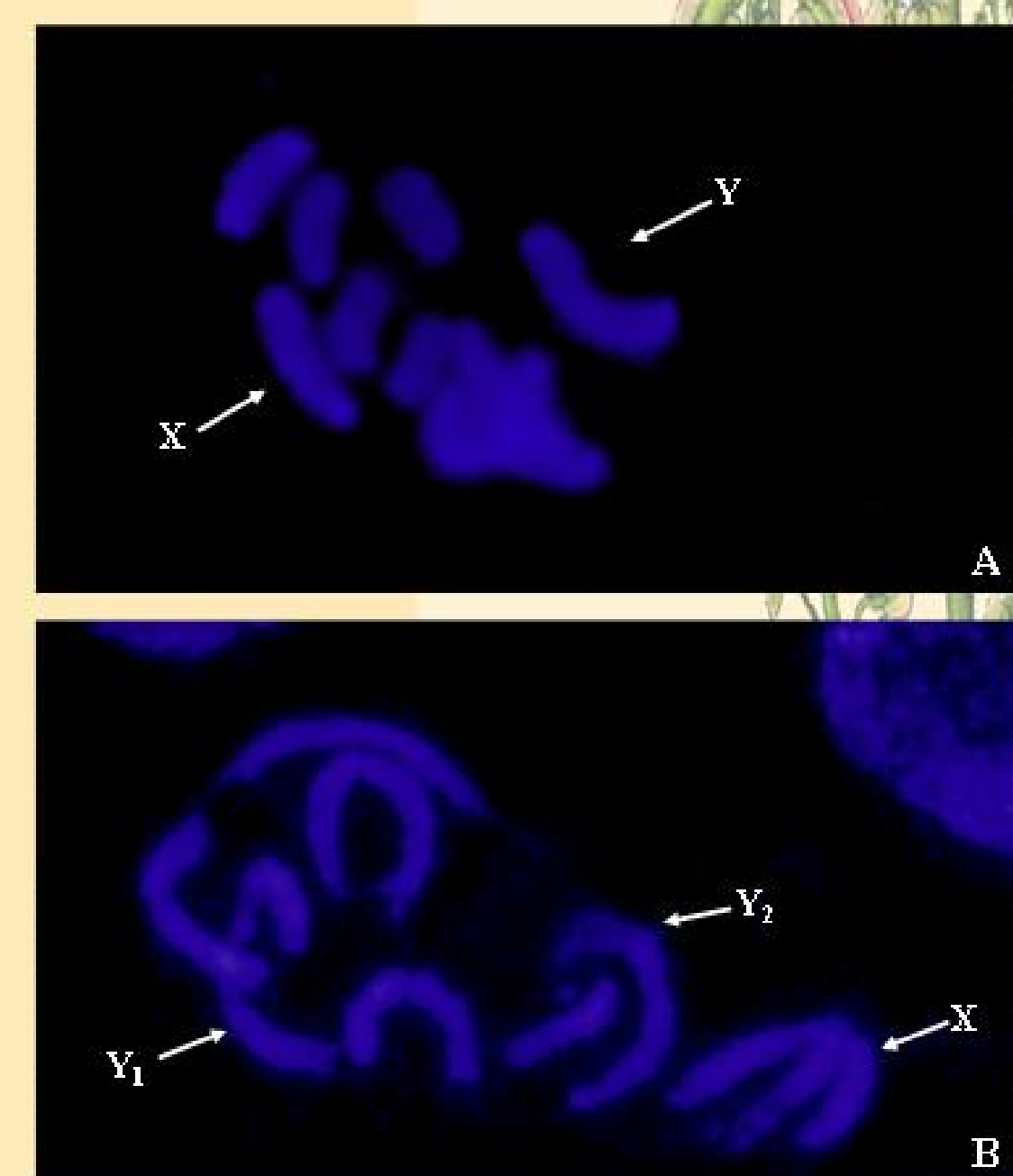


Figura 4. Tinción con DAPI de cromosomas obtenidos a partir de machos de *R. hastatulus*. A. Metafase de un macho de la raza de Texas. B. Profase de un macho de la raza de Carolina del Norte.

CONCLUSIONES

- El sistema cromosómico complejo XX/XY₁Y₂ ha aparecido independientemente en dos linajes diferentes del género *Rumex* (Navajas-Pérez et al., 2005; Mol. Biol. Evol. 22: 1929–1939): uno, el que dio origen a las especies emparentadas con *R. acetosa* (hace entre 12-13 millones de años) y otro, el linaje de *R. hastatulus*, especie en la que se han diferenciado dos razas a través de la evolución de un sistema XX/XY a un sistema XX/XY₁Y₂, hace unos 600.000 años. En este segundo caso, el proceso aún no se acompaña de una heterocromatinización ni de una acumulación de secuencias de ADN satélite en los cromosomas Y, tal como ha ocurrido en el primer caso.
- La "hipótesis de la biblioteca" explicaría por qué en *R. hastatulus* se han diferenciado tres subfamilias de RAE180 que se han amplificado, ligeramente, de manera diferencial en cada raza de esta especie (la subfamilia TX1/NC1 en la raza de Texas y la subfamilia TX2/NC2 en la de Carolina del Norte; la subfamilia TX3/NC3 está pobremente representada en ambas razas). Esta hipótesis explicaría igualmente el patrón evolutivo de las secuencias RAE180 en las especies dioicas del género *Rumex* y podría ser integrada en un modelo general que explicaría parte del proceso de evolución del ADN satélite en general.
- El proceso evolutivo seguido por las secuencias RAE180 en *R. hastatulus* ha dado lugar a un patrón de evolución concertada y a una divergencia global de estas secuencias repetitivas entre las dos razas de *R. hastatulus*, dato éste que puede ser útil como referencia para propósitos taxonómicos.

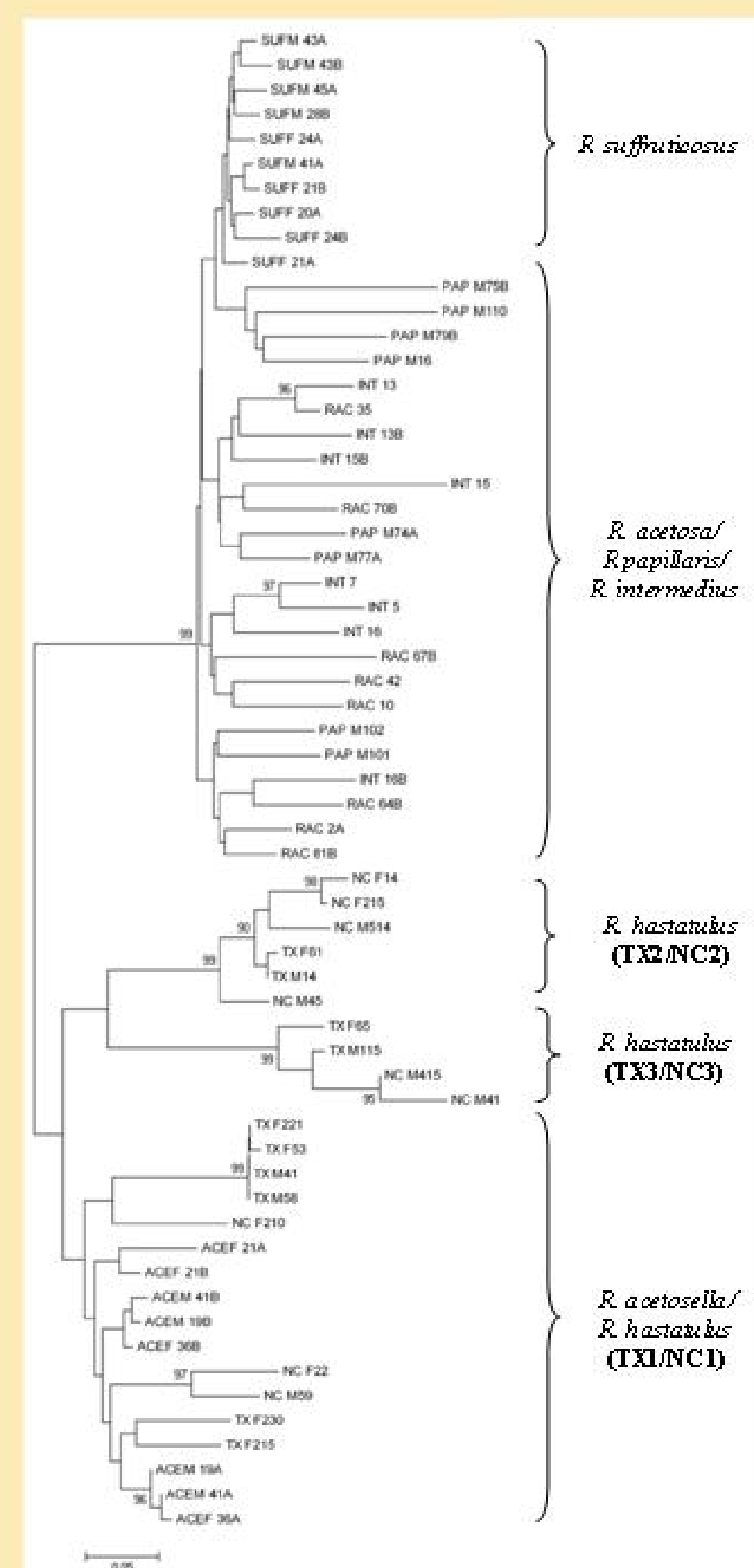


Figura 5. Árbol filogenético de secuencias RAE180 provenientes de las diferentes especies dioicas del género *Rumex*: RAC, *R. acetosa*; PAP, *R. papillaris*; INT, *R. intermedius*; ACE, *R. acetosella*; TX, *R. hastatulus*, raza de Texas; NC, *R. hastatulus*, raza de Carolina del Norte.