

## Un helecho diminuto desafía los límites de la expansión genómica en eucariotas

### A tiny fern defies the limits of genome expansion in eukaryotes

A medida que la actividad humana impacta negativamente los ecosistemas, acelerando la pérdida de hábitats y, por ende, de especies, somos más y más conscientes de la necesidad acuciante de conocer la diversidad que nos rodea a escala global. Es por ello que en las últimas décadas hemos sido testigos del lanzamiento de grandes iniciativas y consorcios, por ejemplo, el Proyecto del Biogenoma de la Tierra (Earth Biogenome Project, EBP, <https://www.earthbiogenome.org>), que buscan documentar la biodiversidad de eucariotas en el planeta desde una perspectiva genómica. Sin duda, el desarrollo continuo de técnicas de biología molecular y citogenéticas nos está permitiendo ampliar aceleradamente nuestro conocimiento sobre la biodiversidad, en general, y sobre los atributos más íntimos de los genomas, en particular. Ello está haciendo posible la caracterización de las especies desde una perspectiva holística a múltiples niveles, que parten de su tamaño genómico hasta el desciframiento de la secuencia completa de su ADN y su organización cromosómica.

Es indudable el papel fundamental que las plantas (Viridiplantae) tienen en la dinámica de los ecosistemas y su influencia directa en el bienestar de la humanidad, por ejemplo, a través de su impacto en la economía global (Schaal, 2019). Es por ello que, además de conocer su identidad a través de la información crítica que guardan en sus genomas, necesitamos identificar qué atributos de dichos genomas contribuyen e influyen en la evolución y en la resiliencia de las especies en un contexto de cambio global. En este sentido, el contenido de ADN nuclear, es decir, el tamaño del genoma, más allá de proporcionarnos información básica y aplicada sobre los costos aproximados que tendremos que afrontar para secuenciar genomas completos, es un carácter extremadamente diverso en los organismos eucarióticos. El tamaño genómico, especialmente el de las plantas terrestres, puede multiplicarse más de 2.400 veces dentro del rango de variación conocido, y desempeña un papel muy relevante en su evolución (Pellicer *et al.*, 2018), que incluye cómo y dónde pueden vivir y las implicaciones directas e indirectas que tiene en su probabilidad de extinción (Soto Gómez *et al.*, 2023).

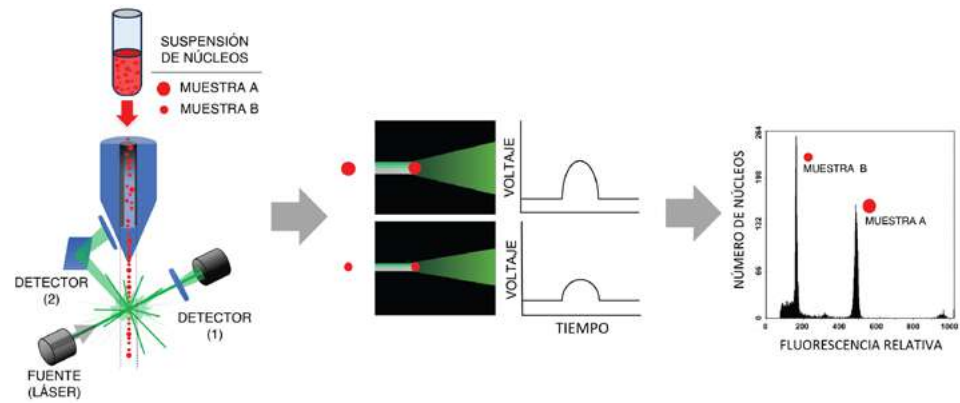
Nótese que el último lanzamiento (versión 7.1) de la base de datos de valores-C de plantas (Plant DNA C-values Database, <https://cvalues.science.kew.org>), repositorio que en su última actualización incluye los datos sobre el tamaño del genoma de alrededor de 12.000 especies pertenecientes a los grandes linajes de plantas terrestres (angiospermas, briófitos, gimnospermas y pteridófitos) y de algas, ha acumulado más de 250 citas en menos de cuatro años (Pellicer & Leitch, 2020), lo que es un claro indicador del interés que la comunidad científica tiene en el análisis de este parámetro y sus múltiples implicaciones en la evolución de las plantas en general. A pesar de los esfuerzos que supone compilar y mantener este repositorio, no hay duda alguna sobre la cantidad de trabajo que aún queda por realizar, ya que los datos disponibles tan solo representan un pequeño porcentaje del total de la biodiversidad vegetal que conocemos. Hasta la fecha, el menor genoma vegetal conocido pertenece a una pequeña planta carnívora de la familia de las Lentibulariaceae, *Genlisea aurea*, con un genoma de apenas 64 Mb (Fleischmann *et al.*, 2014). En el extremo opuesto, y hasta hace muy poco, el récord lo ostentaba el genoma gigantesco, de unos 149 Gb, descubierto en *Paris japonica*, una especie perteneciente a la familia de

las *Melanthiaceae* (Pellicer *et al.*, 2010). Sin embargo, el reciente hallazgo de un genoma de más de 160 Gb en la especie *Tmesipteris oblancoolata*, un pequeño helecho horquilla (*Psilotaceae*) de la isla de Grande Terre en Nueva Caledonia y otros archipiélagos del Pacífico Sur, ha pulverizado esta marca (Figura 1) (Fernández *et al.*, 2024). Este hallazgo plantea nuevas preguntas sobre dónde está el límite en la expansión de los genomas, una cuestión para nada trivial, sobre todo si tenemos en cuenta las múltiples consecuencias biológicas y los ingentes costos energéticos y metabólicos asociados al mantenimiento de estos impresionantes (giga)genomas.

En el estudio de Fernández y colaboradores, los autores utilizan la técnica de la citometría de flujo, la cual permite analizar miles de núcleos del tejido vegetal de la muestra de estudio, que, una vez aislados junto a los de la muestra de control en una suspensión, son teñidos con un fluorocromo que se adhiere al ADN nuclear (ioduro de propidio en el caso que nos ocupa) para ser finalmente irradiados con un láser. El instrumento consta de dos detectores de fluorescencia que captan la luz emitida por estos núcleos y representan la intensidad de la luz captada en un histograma de fluorescencia relativa (Figura 2) (Doležal *et al.*, 2017). Cuanto mayor sea el tamaño de los núcleos, mayor cantidad de fluorocromo se habrá adherido y mayor será la intensidad de la fluorescencia. Esta es una técnica que, además de ser efectiva y muy asequible para estimar el contenido de ADN nuclear, solamente requiere de una pequeña muestra de tejido fresco y es altamente reproducible. Una posible alternativa, el cálculo del tamaño del genoma mediante el análisis de k-meros, necesita de la secuenciación de alto rendimiento y resulta mucho más costosa, aunque es un método válido utilizado en genomas pequeños. Para un genoma de las dimensiones del de *T. oblancoolata*, la profundidad de secuenciación que permite obtener la cobertura mínima requerida para una estimación robusta de su tamaño genómico mediante el análisis de k-meros, conllevaría una inversión económica varios órdenes de magnitud mayor al costo de la citometría de flujo. Además, la citometría de flujo permite el análisis simultáneo de varias especies en una única muestra, una aproximación que hemos aplicado con el



**Figura 1.** Población del helecho horquilla *Tmesipteris oblancoolata* del S de Grande Terre, Nueva Caledonia. Imagen: Jaime Pellicer



**Figura 2.** Esquema representativo del proceso de análisis del contenido de ADN de núcleos en suspensión con citometría de flujo

fin de eliminar cualquier tipo de duda sobre la magnitud del tamaño del genoma de *T. oblancoolata* y confirmar que es aproximadamente un 7 % mayor que el de *P. japonica* (poseedora del récord durante más de una década, 2010-2024), reduciendo al mínimo cualquier error o limitación que pudiera atribuirse a la técnica empleada.

Si bien nuestro estudio se centra únicamente en el hallazgo y en lo que representa la magnitud del genoma descubierto en *T. oblancoolata*, también se explora en él la forma en que algunos linajes de plantas han evolucionado hasta alcanzar genomas de un calibre notable, algo que es realmente extraordinario si tenemos en cuenta que la mayoría de los helechos presentan genomas pequeños o medianos (media de 12,3 Gb; valor modal de 5,8 Gb) (Fujiwara *et al.*, 2023). En el caso que nos ocupa y, con base en los estudios anteriores del género *Tmesipteris* (Fernández *et al.*, 2023), el efecto combinado de la poliploidía (*T. oblancoolata* es un octoploide con 416 cromosomas) y de la acumulación de secuencias de ADN altamente repetidas podrían haber desempeñado un papel crítico en la expansión extrema de su genoma.

Estas secuencias repetidas se encuentran presentes de forma generalizada en múltiples copias en los genomas eucariotas y los elementos transponibles son especialmente conocidos por su capacidad de replicación y movilización en los genomas (Wicker *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de las especies que conocemos poseen genomas relativamente pequeños, ya que presentan sistemas de control de la expansión sin límite de dichos elementos repetidos, los cuales son eliminados a través de mecanismos como la recombinación, entre otros. Gracias al avance en las técnicas de secuenciación y al desarrollo de diversas herramientas bioinformáticas, los análisis de genomas gigantes en plantas comienzan a ser una realidad y apuntan a que dichos genomas exhiben una composición muy variada de elementos repetidos, presentes en frecuencias relativamente bajas y con una elevada tasa de heterogeneidad entre copias (p.ej., *Fritillaria*) (Kelly *et al.*, 2015). Esto, muy probablemente, no representa un escenario en el que se contemple una amplificación explosiva y generalizada del ADN repetido, si no que, muy posiblemente, sea el resultado de la incapacidad de estos organismos de eliminar de forma eficiente ese ADN repetitivo, que acaba por acumularse en zonas del genoma altamente condensadas donde se fosilizan, mutan y se degradan durante largos períodos de tiempo.

En resumen, la extraordinaria diversidad de tamaños genómicos encontrados en los organismos eucariotas, su significado biológico, o la aparente desconexión entre la complejidad de los organismos y el tamaño de sus genomas, ha planteado multitud de cuestiones para las que todavía no tenemos respuesta. Sin duda, tal como lo señalan los autores de este estudio, el descubrimiento de un genoma de tamaño récord en este diminuto helecho representa un hito en este campo de investigación y, en general, una aportación muy significativa a la biología, ya que refuerza la necesidad de abordar aspectos de la genómica de

la biodiversidad desde una perspectiva holística. Por ello es fundamental que reforcemos la investigación y el análisis profundo de estas rarezas de la naturaleza, más aún si pretendemos profundizar y materializar el conocimiento sobre las consecuencias ecológicas y evolutivas de la diversidad de tamaños genómicos y de la arquitectura del genoma a lo largo del árbol de la vida. Entender dichas consecuencias es vital, especialmente si tenemos en cuenta el impacto del cambio climático y, como ya apuntan diversos estudios, la influencia que el tamaño del genoma tiene en la resiliencia de las especies (Bureš *et al.*, 2024).

● Lisa Pokorny<sup>1,3</sup>, ● Jaime Pellicer<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Real Jardín Botánico (RJB-CSIC), Madrid, España

<sup>2</sup> Institut Botànic de Barcelona (IBB), CSIC-CMNCB, Barcelona, España

<sup>3</sup> Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Reino Unido

## Referencias

- Bureš, P., Elliott, T.L., Veselý, P., Šmarda, P., Forest, F., Leitch, I.J., Lughadha, E.N., Soto Gómez, M., Pironon, S., Brown, M.J.M., Šmerda, J., Zedek, F. (2024). The global distribution of angiosperm genome size is shaped by climate. *New Phytologist*, 242(2), 744-759. <https://doi.org/10.1111/nph.19544>
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J.J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2, 2233-2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- Fernández, P., Leitch, I.J., Leitch, A.R., Hidalgo, O., Christenhusz, M.J.M., Pokorny, L., Pellicer, J. (2023). Giant Fern Genomes Show Complex Evolution Patterns: A Comparative Analysis in Two Species of *Tmesipteris* (Psilotaceae). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2708. <https://doi.org/10.3390/ijms24032708>
- Fernández, P., Amice, R., Bruy, D., Christenhusz, M.J.M., Leitch, I.J., Leitch, A.R., Pokorny, L., Hidalgo, O., Pellicer, J. (2024). A 160 Gbp fork fern genome shatters size record for eukaryotes. *iScience*, 109889. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109889>
- Fleischmann, A., Michael, T.P., Rivadavia, F., Sousa, A., Wang, W., Temsch, E.V., Greilhuber, J., Müller, K.F., Heubl, G. (2014). Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Annals of Botany*, 114(8), 1651-1663. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu189>
- Fujiwara, T., Liu, H., Meza-Torres, E.I., Morero, R.E., Vega, A.J., Liang, Z., Ebihara, A., Leitch, I.J., Schneider, H. (2023). Evolution of genome space occupation in ferns: linking genome diversity and species richness. *Annals of Botany*, 131(1), 59-70. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab094>
- Kelly, L. J., Renny-Byfield, S., Pellicer, J., Macas, J., Novák, P., Neumann, P., Lysak, M.A., Day, P.D., Berger, M., Fay, M.F., Nichols, R.A., Leitch, A.R., Leitch, I.J. (2015). Analysis of the giant genomes of *Fritillaria* (Liliaceae) indicates that a lack of DNA removal characterizes extreme expansions in genome size. *New Phytologist*, 208, 596-607. <https://doi.org/10.1111/nph.13471>
- Pellicer, J., Fay, M.F., Leitch, I.J. (2010). The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(1), 10-15. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01072.x>
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S., Leitch, I.J. (2018). Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9(2): 88. <https://doi.org/10.3390/genes9020088>
- Pellicer, J. & Leitch, I.J. (2020). The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. *New Phytologist*, 226(2), 301-305. <https://doi.org/10.1111/nph.16261>
- Schaal, B. (2019). Plants and people: Our shared history and future. *Plants, People, Planet*, 1(1), 14-19. <https://doi.org/10.1002/ppp3.12>
- Soto-Gómez, M., Brown, M.J.M., Pironon, S., Veselý, P., Bureš, P., Elliott, T.L., Zedek, F., Pellicer, J., Forest, F., Lughadha, E.N., Leitch, I.J. (2023). Genome size is positively correlated with extinction risk in herbaceous angiosperms. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.09.10.557053>
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., Schulman, A.H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973-982.