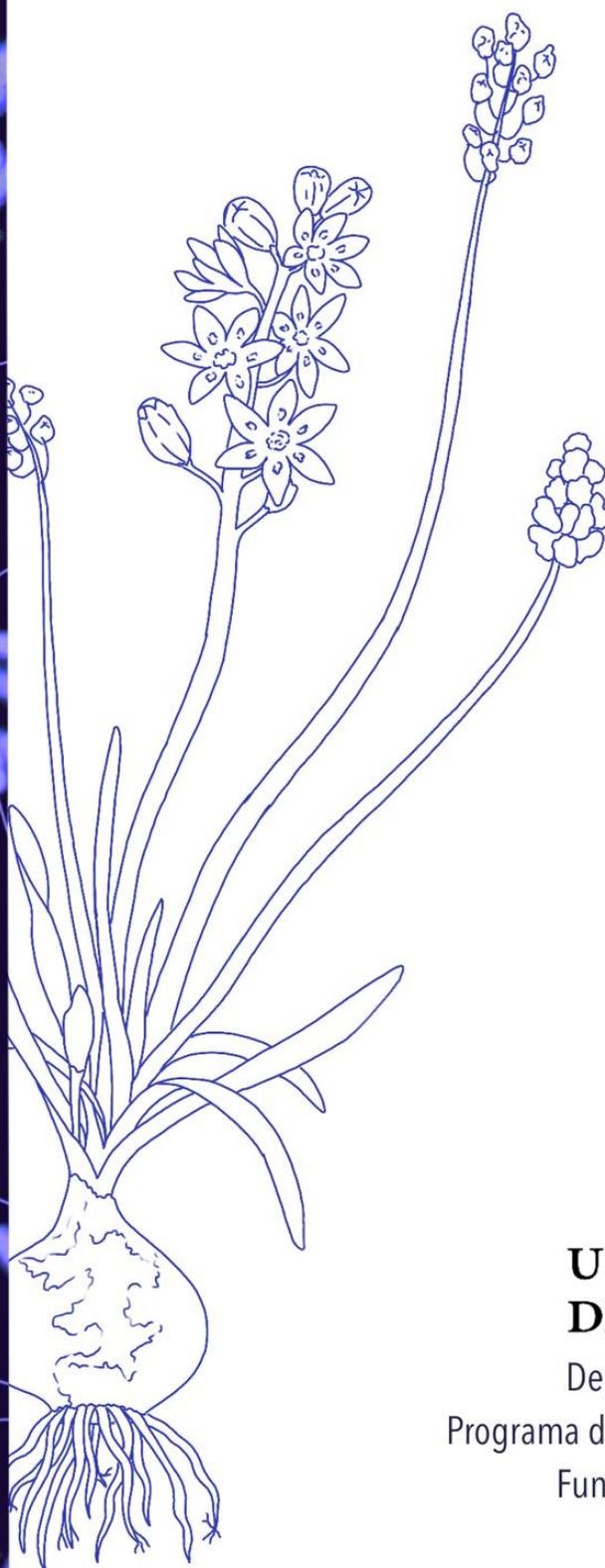


GENÉTICA MOLECULAR Y EVOLUTIVA  
DE LOS CROMOSOMAS B DE  
*Prospero autumnale*

Pedro Emilio Lanzas Quintana



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

Departamento de Genética  
Programa de Doctorado de Biología  
Fundamental y de Sistemas

TESIS DOCTORAL

**GENÉTICA MOLECULAR Y EVOLUTIVA DE  
LOS CROMOSOMAS B DE *Prospero  
autumnale***

Pedro Emilio Lanzas Quintana



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

Departamento de Genética  
Programa de Doctorado de  
Biología Fundamental y de Sistemas

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Pedro Emilio Lanzas Quintana  
ISBN: 978-84-1117-170-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72042>

GENÉTICA MOLECULAR Y EVOLUTIVA DE LOS CROMOSOMAS B DE  
*Prospero autumnale*.

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada presentada por el Licenciado Pedro Emilio Lanzas Quintana,

Dirigida por los doctores:

Dr. Juan Pedro Martínez Camacho

Dr. Francisco Perfectti Álvarez.

Granada, 5 de septiembre de 2021

# Contenido

Resumen.....	1
Summary .....	4
Introducción .....	6
Los cromosomas B.....	6
Efectos de los cromosomas B sobre los individuos portadores.....	6
Distribución geográfica de los cromosomas B .....	7
Mantenimiento de los cromosomas B en las poblaciones naturales .....	8
Composición molecular de los cromosomas B.....	10
DNA repetitivo.....	10
Genes.....	12
Biología de <i>Prospero autumnale</i> .....	14
Descripción y clasificación taxonómica.....	14
Distribución geográfica y hábitats.....	14
Ciclo vital .....	15
Citogenética .....	17
Los cromosomas B en <i>P. autumnale</i> (Figura I.3) .....	21
Objetivos .....	24
Referencias.....	25
Material y métodos.....	35
Material colectado para el estudio .....	35
Determinación del número de cromosomas B en cada individuo.....	36
Determinación de caracteres fenotípicos .....	36
Extracción de ácidos nucleicos.....	37
Extracción de DNA.....	37
Extracción de RNA .....	37
Secuenciación Illumina.....	37
Herramientas bioinformáticas .....	38
Estimas de abundancia de DNA repetitivo.....	38
Análisis bioinformático del satelitoma.....	38
Ensamblaje de novo del transcriptoma, anotación, mapeo y selección de genes del B ....	38
Herramientas bioestadísticas.....	40

Referencias.....	40
Capítulo 1 .....	42
Long-term monitoring of B-chromosome invasion and neutralization in a population of <i>Prospero autumnale</i> (Asparagaceae).....	42
Introduction .....	43
Materials and methods .....	44
The Species.....	44
Plant sampling.....	46
Determination of B chromosome number.....	46
Parameters measuring B chromosome frequency.....	46
B chromosome transmission at population level.....	46
Analysis of pollen fertility.....	47
Vigour and fertility-related traits .....	47
Statistical procedures.....	47
Results .....	48
Evolution of B chromosome frequency across a 34-year period.....	48
B chromosome transmission at population level.....	49
No effects of B chromosomes on vigour and fertility-related traits .....	50
Discussion.....	51
References.....	54
Supporting information.....	59
Capítulo 2 .....	70
La distribución geográfica de los cromosomas B no parece estar relacionada con las características fenotípicas, pero si con la capacidad reproductiva en <i>Prospero autumnale</i> .....	70
Introducción .....	70
Material y métodos .....	74
La especie .....	74
Las poblaciones .....	75
Determinación del número de cromosomas B por individuo .....	76
Caracteres fenotípicos.....	76
Análisis de las medias fenotípicas .....	77
Relaciones fenotípicas entre poblaciones.....	77
Matrices de correlación e índice de integración fenotípica.....	77
Relación entre frecuencia de cromosomas B y rasgos vegetativos y reproductivos .....	78
Relación entre distancias geográficas y distancias fenotípicas.....	78
Análisis estadístico .....	78

Resultados .....	79
Distribución geográfica de los cromosomas B en la zona. ....	79
Variación fenotípica .....	81
Análisis multivariante del fenotipo. ....	84
Matriz de correlaciones e índice de integración fenotípica .....	85
Relación entre la frecuencia de cromosomas B y los caracteres fenotípicos .....	89
Relación morfológica entre poblaciones.....	89
Relación entre caracteres fenotípicos y variables geográficas .....	89
Relación entre distancias fenotípicas y distancias geográficas.....	90
Discusión .....	90
Referencias.....	94
Material suplementario .....	101
Capítulo 3 .....	108
Los cromosomas B del citotipo AA de la planta <i>Prospero autumnale</i> están enriquecidos en algunas familias de DNA satélite y transposones, cuya abundancia sugiere que el B llegó por introgresión desde el citotipo B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> .....	108
Introducción .....	109
Material y Métodos.....	111
Material vegetal .....	111
Extracción y secuenciación del DNA.....	112
Análisis bioinformático del satelitoma de <i>P. autumnale</i> .....	113
Estimas generales de abundancia de DNA repetitivo .....	115
Cuantificación de la abundancia de DNA repetitivo en el cromosoma B .....	117
Análisis estadístico .....	118
Resultados .....	118
Análisis del satelitoma de <i>P. autumnale</i> en individuos con y sin cromosomas B .....	118
Cuantificación de la abundancia de DNA repetitivo en el cromosoma B .....	129
Origen de los cromosomas B.....	134
Discusión .....	136
El contenido en DNA repetitivo del genoma de <i>P. autumnale</i> no explica las diferencias en tamaño genómico entre los tres citotipos diploides .....	136
Acumulación de elementos repetitivos en los cromosomas B .....	139
Origen del cromosoma B del citotipo AA.....	142
Referencias.....	145
Material Suplementario .....	154
Capítulo 4 .....	155

El cromosoma B de <i>Prospero autumnale</i> está enriquecido en genes del ciclo celular que se transcriben con preferencia a los que tienen otras funciones .....	155
Resumen.....	155
Introducción .....	156
Material y Métodos.....	158
Material colectado para el estudio .....	158
Determinación del número de cromosomas B en cada individuo .....	158
Extracción de ácidos nucleicos.....	158
Secuenciación Illumina .....	159
Ensamblaje de novo del transcriptoma, anotación, mapeo y selección de genes del B ..	159
Resultados .....	161
Funciones putativas de los 45 genes del B.....	170
Variación nucleotídica en los genes del B que es específica de los individuos con B .....	173
Transcripción de los genes del cromosoma B .....	174
Discusión .....	176
El cromosoma B de <i>P. autumnale</i> está enriquecido en genes del ciclo celular .....	176
Significado de la transcripción de los genes del cromosoma B .....	177
Referencias.....	179
Material suplementario .....	183
Discusión general .....	185
Referencias.....	190
Conclusiones .....	194
Conclusions .....	195
Agradecimientos .....	196

# Resumen

*Prospero autumnale* (Asparagaceae) es una planta herbácea bulbosa perenne distribuida por toda la región circunmediterránea. Constituye un complejo de especies crípticas con diferentes números cromosómicos y contenido de DNA genómico. Además de esta variabilidad genómica canónica, se han descrito cromosomas B en tres de sus cuatro citotipos diploides. Estos cromosomas son supernumerarios, prescindibles y no se recombinan con los cromosomas estándar (A). Por lo tanto, siguen su propia vía evolutiva, mostrando los mecanismos de impulso en la línea germinal de los individuos que los contienen.

En la Cuesta de la Palma (Granada, España), Ruiz-Rejón et al. encontraron en los años 80 del siglo pasado una población de *P. autumnale* que albergaba cromosomas B que afectaban la expresión de una enzima esterasa. Sin embargo, aún quedaban por conocer muchos aspectos de este sistema de cromosomas B. Hemos realizado una serie de análisis en esta población para abordar algunos temas fundamentales de la investigación del cromosoma B (por ejemplo, evolución y transmisión de frecuencia). Aprovechando el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación de DNA, también hemos analizado el contenido de DNA de estos cromosomas B.

En el capítulo 1 analizamos la evolución de la frecuencia del cromosoma B en Cuesta de la Palma durante un período de 34 años. Descubrimos que la frecuencia de B aumentó rápidamente durante la década de 1980. Aun así, mostró solo pequeñas fluctuaciones entre 2005 y 2015, lo que sugiere que el polimorfismo del cromosoma B ya se encontraba en la etapa casi neutral en el siglo actual. El análisis de progenies (madre-descendencia) reveló que, a nivel de población, el cromosoma B mostró impulso a través del gametofito masculino ( $k_B = 0,65$ ) pero una transmisión reducida a través del gametofito femenino ( $k_B = 0,33$ ), con una tasa de transmisión promedio de 0,49, es decir, muy cercana al mendeliano (0,5). También analizamos los posibles efectos del cromosoma B en varios rasgos relacionados con el vigor y la fertilidad sin encontrar efectos significativos. Estos resultados indican que el impulso de estos cromosomas B en el lado masculino fue la principal fuerza para la invasión de La Palma, mientras que la mala transmisión de B en el lado femenino podría ser la principal manifestación de resistencia por parte del genoma del huésped.

En el capítulo 2, avanzamos en la comprensión del polimorfismo B al muestrear 14 poblaciones cercanas a La Palma para analizar la frecuencia del cromosoma B y probar posibles patrones geográficos o espaciales. Los cromosomas B estaban presentes solo en otras tres poblaciones, dos de ellas cerca de La Palma. La baja frecuencia de B en estas dos poblaciones sugirió la reciente llegada de los cromosomas B de La Palma. El análisis multivariado de varios rasgos relacionados con el vigor y la fertilidad, junto con los índices de integración fenotípica, no reveló ninguna relación entre las variables cuantitativas estudiadas y la frecuencia de cromosomas Bs encontrados en diferentes

poblaciones. Tampoco observamos un patrón claro en la distribución de Bs para variables geográficas como longitud, latitud o altitud. Sin embargo, las poblaciones con cromosomas B produjeron un número promedio de semillas más alto que las que carecen de ellos, lo que sugiere una mayor conectividad entre los individuos a través del polen en poblaciones portadoras de B. Si esto está relacionado con el hecho de que el cromosoma B se transmite mejor por el gametofito masculino es una cuestión interesante que queda por investigar en el futuro en esta especie.

En *P. autumnale* se han descrito cuatro citotipos diploides y cuatro tetraploides. Se han encontrado cromosomas B en tres (AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>) de los citotipos diploides. En el capítulo 3 analizamos la composición molecular de los cromosomas B presentes en el citotipo AA ya que esta información podría ser determinante para determinar el origen de este cromosoma B. Hemos realizado un análisis cuantitativo del contenido de DNA repetitivo en estos cromosomas B, determinando la abundancia relativa de diferentes tipos de familias de DNA repetitivo en individuos portadores y sin B del citotipo AA y en los cromosomas estándar (A) de los tres citotipos diploides. Para ello, realizamos la secuenciación Illumina del DNA genómico obtenido de 6 individuos: cuatro del citotipo AA (dos 0B y dos con B), uno del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y otro del citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>. Encontramos 42 familias de DNA satélite, y una de ellas es específica de B. La presencia de este satélite en los cromosomas A de los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> sugiere que el cromosoma B surgió de uno de estos citotipos y que alcanzó el citotipo AA por hibridación. Además, las abundancias de cuatro familias de satélites que mostraban homología entre sí y que, juntas, constituían la superfamilia SF6, apuntaban en la dirección en la que el cromosoma B llegaba al citotipo AA desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. También realizamos un análisis cuantitativo de la abundancia de todos los tipos de DNA repetitivo en las seis bibliotecas. Mostramos que los cromosomas B del citotipo AA están enriquecidos en unas pocas familias de elementos repetitivos correspondientes a los satélites mencionados anteriormente más algunos elementos transponibles, principalmente del tipo LTR, tanto Copia como Gypsy. En conjunto, la abundancia de elementos repetitivos sugiere orígenes independientes para el citotipo AA y su cromosoma B, ambos de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, en diferentes momentos durante el Pleistoceno.

Además, realizamos análisis genómicos para detectar la presencia de genes que codifican proteínas en los cromosomas B de *P. autumnale*. En el capítulo 4, analizamos el contenido génico de los cromosomas B de nuestra especie de estudio, utilizando las seis bibliotecas genómicas mencionadas anteriormente y dos bibliotecas de RNA construidas a partir de hojas de un individuo 0B y un 2B. Los resultados revelaron 45 genes codificadores de proteínas en el cromosoma B, 10 de los cuales codificaban proteínas con funciones relacionadas con el ciclo celular, como el movimiento cromosómico a través de microtúbulos, la recombinación meiótica y la segregación cromosómica, es decir, procesos que pueden ser clave para la transmisión ventajosa del B. Sin embargo, los 35 genes restantes codificaban proteínas que estaban involucradas en una gran variedad de funciones no relacionadas, que juntas podrían ser un reflejo del contenido génico del cromosoma A que dio lugar al cromosoma B. Además, la mayoría de estos genes (27) mostraron CDS truncado, lo que indica que las copias del gen en B

están pseudogeneizadas. Este hecho también se observó en 4 de los 10 genes para las funciones del ciclo celular. Los genes B tendían a mostrar muchas copias, normalmente truncadas, en el cromosoma B. Encontramos un gran número de SNP específicos de B, lo que nos permitió cuantificar la tasa de transcripción de los genes B en el individuo AA-2B. Este análisis mostró una transcripción preferencial de genes B involucrados en las funciones del ciclo celular, lo que sugiere un sesgo en el perfil transcripcional de los cromosomas B hacia aquellos genes que pueden ser útiles para su transmisión eficiente durante las divisiones celulares.

# Summary

*Prospero autumnale* (Asparagaceae) is a perennial bulbous herbaceous plant distributed throughout the circum-Mediterranean region. It constitutes a complex of cryptic species with different chromosomal numbers and genomic DNA content. In addition to this canonical genomic variability, B chromosomes have been described in three of their four diploid cytotypes. These chromosomes are supernumerary, dispensable, and do not recombine with the standard (A) chromosomes. Therefore, they follow their own evolutionary pathway, showing drive mechanisms in the germline of the individuals containing them.

At Cuesta de la Palma (Granada, Spain), Ruiz-Rejón et al. found in the 80s of the last century a natural population of *P. autumnale* harbouring B chromosomes that affected the expression of an esterase enzyme. However, many aspects of this B chromosome system yet remained to be known. We have performed a series of analyses in this population to address some fundamental topics of B chromosome research (e.g., frequency evolution and transmission). Taking advantage of the development of new DNA sequencing technologies, we have also analyzed the DNA content of these B chromosomes.

In chapter 1, we analyzed the evolution of B chromosome frequency in Cuesta de la Palma for a period of 34 years. We found that B frequency rapidly increased during the 1980s. Still, it showed only small fluctuations between 2005 and 2015, suggesting that the B chromosome polymorphism was already in the near-neutral stage in the present century. Mother-offspring analysis revealed that at the population level, the B chromosome showed drive through the male gametophyte ( $k_B = 0.65$ ) but reduced transmission through the female gametophyte ( $K_B = 0.33$ ), with an average transmission rate of 0.49, i.e., very close to the Mendelian one (0.5). We also analyzed possible B chromosome effects on several traits related to vigour and fertility without finding significant effects. These results indicate that the drive of these B chromosomes on the male side was the main force for the invasion of La Palma, whereas the poor B transmission on the female side could be the main manifestation of resistance by the host genome.

In chapter 2, we further the comprehension of the B polymorphism by sampling 14 populations near La Palma to analyze B chromosome frequency and test for possible geographical or spatial patterns. B chromosomes were present in only three other populations, two of them nearby La Palma. The low B frequency in these two populations suggested the recent arrival of B chromosomes from La Palma. Multivariate analysis of several traits related to vigour and fertility, together with phenotypic integration indices, did not reveal any relationship between the quantitative variables studied and the frequency of Bs chromosomes found at different populations. Nor did we observe a clear pattern in Bs distribution for geographic variables such as longitude, latitude or altitude. However, populations with B chromosomes yielded a higher average number of seeds than those lacking them, suggesting higher connectivity between

individuals through pollen in B-carrying populations. Whether this is related to the fact that the B chromosome is transmitted better by the male gametophyte is an interesting question remaining for future research in this species.

Four diploid and four tetraploid cytotypes have been described in *P. autumnale*. B chromosomes have been found in three (AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> and B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>) of the diploid cytotypes. In chapter 3, we analyze the molecular composition of the B chromosomes present in the AA cytotype since this information could be decisive in determining the origin of this B chromosome. We have carried out a quantitative analysis of the repetitive DNA content in these B chromosomes, determining the relative abundance of different types of repetitive DNA families in B-carrying and B-lacking individuals of the AA cytotype and in the standard chromosomes (A) of the three diploid cytotypes. To do this, we performed Illumina sequencing of genomic DNA obtained from 6 individuals: four from the AA cytotype (two OB and two with B), one from the B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> cytotype and another from the B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> cytotype. We found 42 families of satellite DNA, with one of them being B-specific. The presence of this satellite on the A chromosomes of cytotypes B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> and B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> suggests that the B chromosome arose from one of these cytotypes and that it reached the AA cytotype by hybridization. In addition, the abundances of four families of satellites that showed homology to each other and that, together, constituted the SF6 superfamily pointed in the direction that the B chromosome arrived to the AA cytotype from the B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> cytotype. We also performed a quantitative analysis of the abundance of all the types of repetitive DNA in the six libraries. We show that the B chromosomes of the AA cytotype are enriched in a few families of repetitive elements corresponding to the satellites mentioned above plus a few transposable elements, mainly of the LTR type, both Copia and Gypsy. Taken together, the abundances of repetitive elements suggest independent origins for the AA cytotype and its B chromosome, both from B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, at different times during the Pleistocene.

In addition, we performed genomic analyses to detect the presence of protein-coding genes on the B chromosomes of *P. autumnale*. In chapter 4, we analyze the genic content of the B chromosomes of our study species, using the six genomic libraries mentioned above and two RNA libraries built from leaves from one OB and one 2B individual. The results revealed 45 protein-coding genes on the B chromosome, 10 of which encoded proteins with functions related to the cell cycle, such as chromosomal movement through microtubules, meiotic recombination and chromosomal segregation, i.e., processes that may be key to the advantageous B transmission. The remaining 35 genes, however, encoded proteins that were involved in a great variety of unrelated functions, which, together, could be a reflection of the gene content of the A chromosome that gave rise to the B chromosome. In addition, most of these genes (27) showed truncated CDS, indicating that the gene copies on the B are pseudogenized. This fact was also observed in 4 out of the 10 genes for cell cycle functions. The B genes tended to show many copies, usually truncated, on the B chromosome. We found a high number of B-specific SNPs, which allowed us to quantify the transcription rate of the B genes in the AA-2B individual. This analysis showed preferential transcription of B-genes involved in cell cycle functions, suggesting a bias in the transcriptional profile of B chromosomes towards those genes that may be useful for their efficient transmission during cell divisions.

# Introducción

## Los cromosomas B

El 15 % de los organismos eucariotas contienen cromosomas supernumerarios (denominados cromosomas B) en su genoma, que son dispensables, no recombinan con los cromosomas normales (A) y se transmiten a tasas superiores a la mendeliana, acumulándose así en la línea germinal. Esto supone un incremento de su frecuencia en la población, contrarrestado por los efectos negativos sobre la eficacia biológica del organismo hospedador asociados a la presencia de Bs (Jones and Rees 1982, Jones 1991, 2018; Camacho 2005). Su frecuencia en las poblaciones naturales es variable y está relacionada con el sistema reproductivo, el tamaño del genoma y el número de cromosomas A que presenta la especie hospedadora. En aquellas especies en las que están presentes, sólo algunos individuos de algunas poblaciones son portadores. Se consideran elementos parásitos del genoma hospedador y su origen más probable parece ser a partir de los cromosomas A de la misma especie, aunque también se han encontrado casos de cromosomas B originados por hibridación intra o interespecífica (Sapre and Deshpande 1987, Camacho et al. 2000, Perfectti and Werren 2001, Camacho 2005, Jones et al. 2007, Ruban et al. 2017). En las fanerógamas, se han encontrado cromosomas B en más de 1200 especies de plantas, que constituyen el 8 % de las monocotiledóneas y en el 4 % de las dicotiledóneas (Trivers et al. 2004).

## Efectos de los cromosomas B sobre los individuos portadores

Uno de los aspectos más estudiados de la biología de los cromosomas B ha sido el efecto que éstos producen sobre diversos caracteres fenotípicos de los individuos portadores (ver revisión en Jones and Rees 1982, Bougourd and Jones 1999, Camacho 2005). Estos pueden suceder sobre caracteres endofenotípicos como el aumento en la frecuencia de quiasmas durante la meiosis (Ayonoadu and Rees 1968, Hewitt and Brown 1971, Brown and Jones 1976, Ghaffari and Bidmeshkipoor 2002, Camacho et al. 2002), la disminución del apareamiento entre los cromosomas A homólogos en híbridos de *Lolium* (Evans and Macefield 1973), la expresión de una enzima esterasa extra en individuos portadores del B en *P. autumnale* (Ruiz-Rejón et al. 1980, Oliver et al. 1982), la resistencia al estrés térmico en meiocitos de *Secale cereale* (Pereira et al. 2017) o la resistencia al antibiótico pisatina en el hongo *Nectria haematococca* (Miao et al. 1991), por citar sólo algunos ejemplos. Asimismo, también se ha reportado la influencia de los cromosomas B sobre caracteres exofenotípicos, como la aparición de líneas de color verde en hojas en el maíz (Staub 1987) o el cambio de color de los aquenios en la compuesta *Haplopappus gracilis* (Jackson and Newman 1960).

Sin embargo, los efectos fenotípicos más generalizados se han observado sobre rasgos relacionados con el vigor, la fertilidad y la fecundidad de los organismos (Östergren 1947, Jones and Rees 1982, Camacho 2005, Jones et al. 2008), siendo estos más patentes en aquellos individuos con mayor número de Bs. Así, las plantas de maíz con un número alto de Bs (de 15 a 20 cromosomas) ven reducida su fertilidad y vigor, además de producir semillas defectuosas (Randolph 1941). Asimismo, la presencia de Bs produce un incremento en el tamaño celular y nuclear y un alto porcentaje de granos de polen abortados y pocas semillas maduras (Randolph 1941). En el centeno (*Secale cereale*), la fertilidad decrece progresivamente con el aumento del número de Bs (de 2 a 4), efectos que dependen del número de Bs en los individuos y no de la frecuencia de Bs en la población (Puertas et al. 1985).

### **Distribución geográfica de los cromosomas B**

La abundancia y frecuencia de los cromosomas B pueden estar relacionadas con algunos factores geográficos o ecológicos. Así, por ejemplo, la frecuencia de Bs en poblaciones del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* a lo largo del río Segura, en España, se encuentra negativamente correlacionada con la altitud (Cabrero et al. 1997), pero en el maíz se encontró la relación contraria en una clina altitudinal para el número medio de Bs por planta, ya que los cultivares que crecían a grandes altitudes presentaban un alto número de Bs (Lia et al. 2007). Igualmente, en el pez carácido *Astyanax scabripinnis* se encontraron cromosomas B en dos poblaciones localizadas a grandes altitudes en Brasil (1800, 1920 m s.n.m.), mientras que estaban ausentes en poblaciones situadas a 700 msnm (Néo et al. 2000). Por otra parte, en el saltamontes *Trimerotropus pallidipennis* se ha observado que la frecuencia de individuos portadores de Bs por población está asociada negativamente con la latitud y positivamente con la longitud (Confalonieri 1995).

En otras especies son los factores ecológicos los que influyen en la distribución geográfica de los cromosomas B. Es el caso de la planta *Phleum phleoides*, cuya frecuencia de Bs está correlacionada negativamente con el contenido en materia orgánica del sustrato en el que crecen (Bosemark 1967); o el de *Festuca pratensis*, donde la frecuencia de plantas portadoras de Bs se encuentra correlacionada positivamente con el contenido en arcilla del suelo (Bosemark 1956). En *Centaurea scabiosa*, la mayor frecuencia de Bs se observa en poblaciones que crecen en áreas con baja humedad ambiental y en condiciones climáticas más continentales (Fröst 1958). Por otra parte, las poblaciones de la orquídea *Listera ovata* que viven en zonas empantanadas muestran un 18 % más de Bs que las encontradas en otros hábitats (Vosa 1983). La temperatura ambiental es el factor ecológico que determina la distribución de los B en las poblaciones del saltamontes *Myrmeleotettix maculatus*, dándose la mayor frecuencia de Bs en las zonas más cálidas de Gran Bretaña (Hewitt and Ruscoe 1971). Igualmente, en *Dichroplis*

*elongatus*, la frecuencia de Bs esta correlacionada negativamente con la latitud y positivamente con la altitud y temperatura media anual (Rosetti et al. 2010). En otros casos, la distribución de los Bs depende de la calidad del hábitat, como es el caso del saltamontes *Acrida lata* en una zona del norte de Japón (Kayano et al. 1970), o de la compuesta *Crepis capillaris* (Parker et al. 1991) donde los Bs se encuentran excluidos de poblaciones que viven en condiciones subóptimas para la especie.

Sin embargo, también se han documentado casos en que la distribución de cromosomas B no parece estar asociada a ningún factor geográfico o ambiental. Como ejemplos tenemos al saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* en East Anglia (Shaw 1983), el ratón *Apodemus peninsulae* en Korea (Borisov and Zhigarev 2018), la planta compuesta *Xanthisma texanum* en el suroeste de Oklahoma y Texas (Semple 1989), *Aegylops mutica* (Ohta and Saruhashi 1999) o *Agropyron* (Chen et al. 1993), donde los Bs aparecen en la mayoría de las áreas de distribución de la especie. En el último caso, sin embargo, hay una clara relación entre la presencia de Bs y la poliploidía, ya que los Bs eran más frecuentes en las plantas diploides (63% de portadores) que en las tetraploides (5%), sugiriendo que los Bs son mejor tolerados en los genomas diploides (Chen et al. 1993), como ya indicaron Palestis et al. (2004) que encontraron una relación negativa entre presencia de Bs y poliploidía.

## **Mantenimiento de los cromosomas B en las poblaciones naturales**

Los dos primeros modelos que se propusieron sobre el mantenimiento de los cromosomas B en poblaciones naturales fueron el parasítico, planteado por Östergren (1945) y el heterótico propuesto por White (1973). Según el **modelo parasítico**, los cromosomas B se comportan como parásitos genómicos que imponen costes deletéreos a sus portadores y promueven su propia transmisión mediante diversos mecanismos no Mendelianos. Como consecuencia de la acción de estas dos fuerzas con efecto contrario sobre la frecuencia de los Bs, ésta puede alcanzar un equilibrio en algunas poblaciones y mantenerse constante a lo largo de las generaciones. Cuando los Bs invaden nuevas poblaciones, se suele observar un rápido incremento en su frecuencia en el transcurso de unas pocas decenas de generaciones, tal como se ha demostrado en el saltamontes *Eyrepocnemis plorans* (Zurita et al. 1998; Riera et al. 2004; Camacho et al. 2015), el pez *Prochilodus lineatus* (Cavallaro et al. 2000) y la avispa *Trypoxylon albitarse* (Aráujo et al. 2001, 2002). El **modelo heterótico** también asume que la frecuencia de Bs puede alcanzar un equilibrio estable, pero, en este caso, las dos fuerzas opuestas son la ventaja en fitness que proporciona tener bajo número de Bs y la desventaja al tener altos números de Bs.

Como una extensión del modelo parasítico, Camacho et al. (1997) propusieron el **modelo casi-neutro**, que considera que los cromosomas B atraviesan diferentes

etapas en su coevolución con el genoma A, de forma que los Bs comienzan siendo parasíticos porque muestran algún tipo de acumulación o impulso en la transmisión a la vez que efectos deletéreos sobre el fitness de los individuos portadores. Posteriormente, el impulso es suprimido por el genoma A y los Bs son neutralizados. Esto puede llevarlos, a largo plazo, a su eliminación de la población, a menos que el polimorfismo se regenere si el B recupera su impulso en la transmisión.

En angiospermas, un mecanismo frecuente de impulso en la transmisión es la no disyunción mitótica durante la formación del gametofito (Jones et al. 2008). En el maíz, la no disyunción tiene lugar durante la segunda mitosis de la formación del grano de polen (Roman 1947, 1948), mientras que en *Aegilops speltoides* esto ocurre durante la primera mitosis (Mendelson and Zohary 1972). En el centeno, la acumulación se produce en la primera mitosis de los gametofitos tanto femenino como masculino (Hasegawa 1934, Hakansson 1948), pero los Bs son perjudiciales para los portadores por disminuir su fertilidad (Jiménez et al. 1994), siendo éste un excelente ejemplo de cromosoma B parásito (Puertas 2002).

Asimismo, los cromosomas B del maíz son también perjudiciales cuando aparecen en números elevados (Staub 1987). Sin embargo, en el cebollino *Allium schoenoprasum*, se han encontrado más de 20 cromosomas B en un mismo individuo, en algunas poblaciones naturales. Éste es un B polimórfico con más de 12 tipos diferentes, que muestra una transmisión promedio más baja (0.39) que la mendeliana (0.5), que es compensada por la alta supervivencia que presentan las plantas portadoras de B entre las etapas de semilla y plántula (Plowman and Bougourd 1994). De hecho, éste es uno de los pocos sistemas bien estudiados de Bs que proporciona beneficios para el éxito reproductivo de la planta, siendo uno de los mejores ejemplos de B heterótico.

De lo expuesto anteriormente podemos distinguir tres tipos de cromosomas B en plantas: a) altamente parasíticos, que muestran más de un mecanismo de acumulación y cuyo ejemplo típico es el centeno; b) moderadamente parasíticos, que muestran un único mecanismo de acumulación, como ocurre en el maíz y en *A. speltoides* y c) heteróticos, que no muestran acumulación, pero tienen efectos beneficiosos para los portadores, como es el caso de *A. schoenoprasum* (para revisión, ver Puertas, 2002). Además, la coevolución entre los cromosomas A y B, puede conducir a adaptaciones para el ataque y defensa en ambas partes (Frank 2000), de modo que la frecuencia de Bs no tiene por qué alcanzar un equilibrio en las poblaciones naturales. Esto es predicho por el ya citado modelo casi-neutro de la evolución de los cromosomas B (Camacho et al. 1997), que fue desarrollado utilizando el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* como modelo de estudio y, por el cual, el impulso del B es suprimido por los A, con los consiguientes cambios temporales en la frecuencia de Bs, de mayor o menor magnitud dependiendo de si la población se encuentra en las etapas de invasión, supresión del impulso o casi neutra. Este modelo arrojó nueva luz sobre los cromosomas

parásitos de plantas, como los del centeno y el maíz, donde se ha demostrado también evidencia del control de los cromosomas A en la transmisión de los B (Puertas 2002).

## **Composición molecular de los cromosomas B**

Uno de los aspectos más enigmáticos y difíciles de estudiar de la biología de los cromosomas B ha sido su composición molecular, debido a la carencia de métodos de estudio apropiados. Hasta hace poco tiempo, el conocimiento del contenido de los cromosomas B era muy limitado, prácticamente restringido a unos pocos tipos de DNA repetitivo. En las últimas décadas, sin embargo, el desarrollo de nuevas y más eficientes herramientas de secuenciación masiva del DNA, unido al desarrollo de potentes programas bioinformáticos, ha permitido descubrir que los cromosomas B contienen, además, muchos genes que codifican para proteínas, algunos de los cuales incluso se transcriben activamente, como veremos a continuación.

### ***DNA repetitivo***

Los estudios realizados a lo largo del siglo XX mediante métodos moleculares clásicos (hibridación de DNA, centrifugación en gradiente de densidad, digestión por endonucleasas de restricción, FISH, PCR, RAPDs) demostraron que los cromosomas B suelen ser heterocromáticos (por su mayor condensación y contenido en bandas C que los cromosomas A) y constituidos principalmente por secuencias de DNA repetitivo de distintos tipos: principalmente DNA ribosómico, DNA telomérico y elementos móviles (para revisión, ver Camacho 2005).

Pero el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) (Egan et al. 2012, Goodwin et al. 2016, Ruban et al. 2017) y de herramientas bioinformáticas para el estudio a fondo del DNA repetitivo, tales como RepeatExplorer (Novák et al. 2010), han permitido realizar estudios genómicos detallados en organismos no modelo, y así comenzar a abrir la caja negra del contenido en DNA de los cromosomas B, incluso cuantitativamente. Por ejemplo, en la planta *Plantago lagopus* se ha estimado que el DNA satélite PlsatB, que sólo es visible citológicamente en el B, representa, él solo, el 3.3% del genoma en individuos con 1B y sólo el 0.09% en individuos 0B (Kumke et al. 2016), sugiriendo que este DNA satélite es un componente mayoritario del B. Este hecho fue patente en el caso del DNA satélite LmiSat02-176 de la langosta *Locusta migratoria*, que representa el 55% del contenido en DNA del cromosoma B de esta especie (Ruiz-Ruano et al. 2018).

Otros ejemplos de análisis recientes usando la tecnología NGS se han reportado en especies animales como *Abraxis flavolineata* (Bueno et al. 2013), *Astyanax paraneae* (Silva et al. 2014), *Astatotilapia latifasciata* (Valente et al. 2014, Coan and Martis 2018), *Moenkhausia costae* (Utsonomia et al. 2016), *Eumigus monticola* (Ruiz-Ruano et al.

2017) y *Drosophila melanogaster* (Hanlon et al. 2018); y en plantas como *Secale cereale* (Martis et al. 2012), *Prospero autumnale* (Emazdade et al. 2014), *Plantago lagopus* (Kour et al. 2014, Kumke et al. 2016, Dhar et al. 2019), maíz (Huang et al. 2016) y *Aegilops speltoides* (Ruban et al. 2014). Estos trabajos han revelado una gran diversidad y cantidad de elementos repetidos en los cromosomas B, sobre todo DNA satélite, transposones, retrotransposones LTR, DNA ribosómico, genes de histonas e incluso genes transcripcionalmente activos (Navarro-Domínguez et al. 2017a, b, Ma et al. 2016).

En algunas especies se han observado secuencias repetitivas de DNA que parecen ser exclusivas de los cromosomas B, ya que no dan señal de FISH en los cromosomas A de la misma especie. Los primeros casos fueron descritos en centeno para los DNAs satélites D1100 y E3900 (Sandery et al. 1990, Blunden et al. 1993). También se han encontrado satélites específicos de los cromosomas B en la compuesta *Brachycome dichrosomatica*, denominados Bd49, Bdm29 y Bdm54 (Houben et al. 1997), y en el maíz, tales como CL-1 (Cheng and Lin 2004), ZmBs (Lamb et al. 2005) y Stark B (Lamb et al. 2007), éste último derivado de retrotransposones al igual que los elementos D1100 y E3900 del centeno.

En la mayoría de los casos, sin embargo, los elementos repetitivos se localizan tanto en los cromosomas B como en los A, y estos casos pueden ser informativos sobre los cromosomas A que pudieron dar origen al cromosoma B, en el caso del origen intraespecífico de los Bs. Así, por ejemplo, en el saltamontes *Eumigus monticola* se ha observado que el autosoma S8 comparte cuatro familias de DNA satélite con el cromosoma B, dos de las cuales son exclusivas de ambos cromosomas, sugiriendo así el posible origen del B a partir del S8 (Ruiz-Ruano et al. 2017). Igualmente, en *Locusta migratoria* se han propuesto los autosomas 8 y 9 como ancestros del B debido a que los genes para histonas se encuentran solamente en el cromosoma B y en el autosoma 8, y el satélite LmiSat53-47 se encuentra sólo en el B y en el autosoma 9 (Ruiz-Ruano et al. 2018). En el pez *Moenkhausia sanctaefilomenae* se han encontrado dos tipos de cromosomas B que contienen las mismas secuencias de DNA repetido compartidas con una región de la pareja de autosomas número 6 de la misma especie, sugiriendo que éste pudo ser el que dio origen a estos Bs (Utsunomia et al. 2016). Sin embargo, en el pez *Characidium gomesi* se ha propuesto que los Bs derivaron de los cromosomas sexuales (Serrano-Freitas et al. 2020).

En otras especies se han observado indicios del origen de los cromosomas B mediante hibridación interespecífica (Camacho 2005). Este es el caso de los cromosomas B de la avispa *Nasonia vitripennis*, que parecen haberse originado como resultado de hibridación con una especie del género *Trichomalopsis* (McAllister and Werren 1997). También en la abeja *Partamona helleri*, un marcador SCAR específico del B sugiere la posibilidad de un origen interespecífico (Tosta et al. 2014), y Perfectti and Werren (2001) demostraron el origen de un cromosoma supernumerario durante un

experimento de hibridación interespecífica. Asimismo, en plantas del género *Coix* se han descrito ejemplos de cromosomas B posiblemente originados mediante hibridación interespecífica (Sapre and Deshpande 1987), y también en especies de solanáceas del género *Cestrum*, donde se ha encontrado gran variedad de familias de DNA repetitivo, y se han descrito cromosomas B en varias especies, así como en un híbrido interespecífico (Vanzela et al. 2017). Algunos de estos DNA repetitivos, como el elemento AR-richSSR, han sido identificados y anotados en cromosomas A y B de *Cestrum strigilatum* y especies relacionadas.

### **Genes**

Debido a sus características y a su composición heterocromática, los cromosomas B fueron considerados durante mucho tiempo como elementos genéticamente inertes, pobres en genes (Melander 1950). Sin embargo, los recientes análisis NGS de algunos cromosomas B de varias especies de animales y plantas han revelado la presencia de genes codificadores de proteínas, completos o fragmentados, en los cromosomas B de varias especies, como veremos a continuación.

Los primeros resultados se obtuvieron en el cromosoma B del centeno (*Secale cereale*), donde Martis et al. (2012) encontraron muchas secuencias derivadas de genes de proteínas, pseudogenes y una variedad de elementos repetitivos incluyendo DNA satélite, elementos móviles y secuencias derivadas del DNA de orgánulos. Uno de los genes del B codifica para una proteína tipo Argonauta (implicada en el silenciamiento génico mediante RNA de interferencia) que muestra una funcionalidad similar a la de los cromosomas A (Ma et al. 2016). En el maíz, mediante análisis comparativo de transcriptomas ensamblados *de novo*, entre individuos 0B y 2B, se pudo detectar la presencia de 32 secuencias con actividad transcripcional. Mediante análisis genómico por PCR se confirmó que 20 de ellas están localizadas en el B, y 19 de éstas fueron mapeadas en varias posiciones a lo largo del cromosoma B (Hong et al. 2019).

También en los cromosomas B de algunas especies animales se han detectado genes o fragmentos de éstos. Así, en el pez *Astatotilapia latifasciata*, los cromosomas B contienen cientos de secuencias semejantes a genes, la mayoría fragmentadas, aunque se han encontrado algunos genes completos y al menos tres estaban transcripcionalmente activos (Valente et al. 2014). En el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* se han detectado, mediante NGS, 10 genes de proteínas (Navarro-Domínguez et al. 2017a), y en los cromosomas B de *Locusta migratoria* se han identificado 26 genes de proteínas, 15 de los cuales mostraban una región codificadora completa. Los individuos +B mostraron alta cantidad de transcritos, expresados en el cromosoma B, que codificaban para la proteína APC1, que induce la transición desde metafase hasta anafase durante la división celular, y este hecho podría estar involucrado en el origen de los impulsos mitótico y meiótico de este cromosoma B (Ruiz-Ruano et al. 2019).

Por otra parte, en mamíferos, el contenido genético de los Bs es altamente heterogéneo, y algunos Bs contienen múltiples duplicaciones grandes, derivadas de varios cromosomas del cariotipo estándar. Existen evidencias de que algunas regiones genómicas son más probables de encontrarse en los cromosomas Bs. El descubrimiento de múltiples genes autosómicos en los Bs ha abierto nuevas vías de discusión sobre sus posibles efectos, que pueden ir desde la determinación sexual, la eficacia biológica, la adaptación de sus complejas interacciones con el genoma hospedador, su papel evolutivo, etc. (Makunin et al. 2018).

Pero el hecho de que los cromosomas B contengan genes o fragmentos de genes no necesariamente significa que éstos sean funcionales, es decir que se transcriban, ya que la presencia de Bs no está asociada con fenotipos obvios en numerosas especies, de aquí la conclusión de que los Bs no contienen genes funcionales (Banaei-Moghaddam et al. 2014). Sin embargo, en centeno, transcritos derivados del Bs con ORF fueron expresados en distintos tejidos de la planta. De éstos, un alto porcentaje no poseían similitud detectable a proteínas conocidas (Ma et al. 2016).

En el caso de los cromosomas B del centeno, en donde el 18 % de los fragmentos similares a pseudogenes se transcriben en algún tipo de tejido, éstos pueden causar efectos fenotípicos en el hospedador como reducir su fertilidad (Ma et al. 2016). Asimismo, se ha propuesto que las secuencias localizadas en los Bs pueden interferir en la regulación de la traducción de transcritos codificados por los cromosomas A, y que esto podría explicar algunos de los efectos asociados a la presencia de Bs (Banaei-Moghaddam et al. 2014; Huang et al. 2016). En el saltamontes *E. plorans* se ha observado que los transcritos de un pseudogen para CAP-G (una subunidad de la condensina), localizado en el cromosoma B, no afectan a la transcripción de los genes para las otras subunidades de la condensina (Navarro-Domínguez et al. 2017b), aunque esto no impide su posible papel como RNA de interferencia. En esta misma especie, se ha observado que los transcriptomas con cromosomas B experimentan cambios de expresión asociados a la presencia del cromosoma B que son congruentes con los efectos de estos B reportados previamente (Navarro-Domínguez et al. 2019). Igualmente, los Bs del maíz influyen en la transcripción de los A con fuertes efectos asociados a un incremento del número de copias de los Bs (Huang et al. 2016). Estos autores detectaron 130 genes expresados diferencialmente en comparación entre líneas +B y 0B. Estos genes están principalmente involucrados en el metabolismo celular y unión a nucleótidos. No obstante, a pesar del conocimiento adquirido, todavía no se conoce bien cómo funcionan estos genes y cuál es su papel dentro del contexto genético de los cromosomas B y del genoma hospedador, así como de la interacción entre ambos (Benetta et al. 2019). El caso más próximo a la demostración de una relación causa efecto entre los transcritos de los cromosomas B se ha reportado recientemente para el cromosoma B de la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis*, donde mediante RNA de interferencia se ha demostrado que la inactivación de un gen del B (*haploidizer*) anula sus efectos de convertir los cigotos hembra en macho, y el consiguiente impulso de transmisión del B (Benetta et al. 2020).

## **Biología de *Prospero autumnale***

### ***Descripción y clasificación taxonómica***

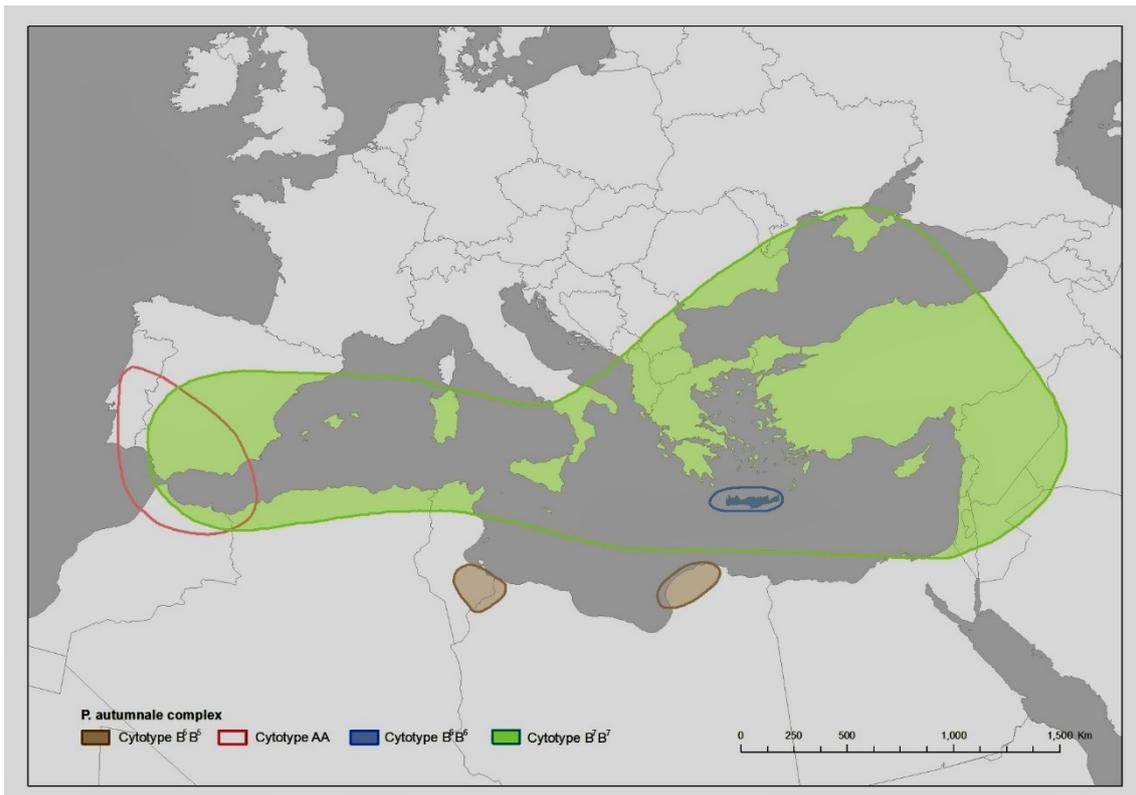
*Prospero autumnale* (= *Scilla autumnalis*) es una especie vegetal bulbosa histeranta, herbácea perenne, con hojas que aparecen después de la floración en un número variable (de 5 a 10 por bulbo), generalmente más cortas que el escapo. Las flores estrelladas en la antesis son hermafroditas, con tépalos pequeños de color que varía desde el blanco hasta el violeta, pasando por el rosa azulado o lila. Estas tienen seis estambres, con filamentos triangulares y anteras de color púrpura oscuro. De ovario súpero, con dos rudimentos seminales por lóculo. El fruto forma una cápsula globosa que alberga hasta seis semillas pequeñas. Las flores se disponen en una inflorescencia en forma de racimo. Normalmente se desarrollan uno o dos escapos por bulbo, raramente tres (Almeida da Silva and Crespi 2013)

La taxonomía de *Prospero autumnale* ha sido históricamente muy compleja, habiendo sido incluida sucesivamente en varios géneros y familias (Hyacinthus, Scilla, Prospero; Liliaceae, Hyacinthaceae, Asparagaceae) (Speta 1998). Speta clasificó a la especie en el género *Prospero* Salibs en 1998, conjuntamente con *Scilla obtusifolia*, otra especie de afiliación cercana. La sinapomorfía que sustenta esta decisión es cierta forma del micrópilo (Ebert et al. 1996) no encontrada en otros taxones relacionados. De acuerdo con Speta (1985), el grupo más estrechamente relacionado con *Prospero* es un conjunto de especies del este de Asia conocido como agregado *Scilla scilloides*, y otro que es similar cromosómicamente, *S. numídica*, del norte de África, Ibiza y Formentera.

Sin embargo, autores mediterráneos que estudiaron desde un punto de vista morfofuncional y geográfico a las especies ibéricas de *Scilla* (Almeida da Silva et al. 2014) no encontraron razones o evidencias significativas para la inclusión de *Scilla autumnalis* y *Scilla obtusifolia* en el género *Prospero* tal como propuso Speta en 1982 (Valdés 2004). En este estudio, se establecen dos grupos morfofuncionales de similitudes entre: *S. ramburii*, *S. verna* y *S. monophyllos* y otro con *S. autumnalis*, *S. numídica* y *S. obtusifolia*, siendo *S. autumnalis* de floración otoñal.

### ***Distribución geográfica y hábitats***

Como se observa en la Figura I.1, *P. autumnale* se extiende desde la costa atlántica en el oeste desde el Sur de Inglaterra, Portugal y España hasta la región caucásica en el este incluyendo el Mediterráneo, la mayoría de Francia, parte norte de los Balcanes y la región Pontina, Norte de África (Marruecos, Argelia y Libia), Turquía, Palestina, Israel y Costa de Anatolia (Ainsworth 1980, Hong 1982, Hamouche et al. 2010, Jang et al. 2013, Almeida da Silva et al. 2013, Almeida da Silva et al. 2014, Ebert et al. 1996). Es una especie común en casi toda la Península Ibérica (Almeida da Silva et al. 2013, Almeida da Silva et al. 2014, Ruiz-Rejón et al. 1980, Parker et al. 1991b, Vaughan et al. 1997, Battaglia 1964).



**Figura I.1.** Mapa de distribución de los citotipos diploides de *Prospero autumnale*. Obsérvese cómo el citotipo AA queda restringido a la península Ibérica y al norte de África. El citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> es el que tiene una mayor distribución geográfica en toda la cuenca mediterránea (modificado de Jang et al. 2013).

La especie se puede encontrar en una gran diversidad de hábitats. En estudios realizados en el norte de África (Hamouche et al. 2010), la especie se encuentra en pendientes calcáreas, laderas silíceo-margosas, colinas margosas y suelos limoso-arenosos, apareciendo en formaciones vegetales abiertas, bosques mixtos de *Pinus halepensis* y *Quercus coccifera*, garrigas, matorrales de *Olea europea*, *Pistacia lentiscus*, bosquetes aclarados de *Cedrus atlántica*, lindes de campos de cultivo de plantas herbáceas, pastos inundados de bordes de lagos y dunas costeras arenosas con *Juniperus phoenicea*. En Israel, Palestina y Libia ocupa lugares casi desérticos, y en España los hábitats que ocupa la especie se caracterizan por ser terrenos herbosos, secos, brezales, matorrales ralos y lugares incultos, y en ocasiones ruderalizados, estando presente en todo el rango completo de precipitaciones (Almeida da Silva y Crespi 2013, Almeida da Silva et al. 2014).

### **Ciclo vital**

Los geófitos son plantas con forma vital en que la yema perenne nace de un órgano subterráneo de almacenamiento (Figura I.2). Viven y están adaptados a clima estacional. Su ciclo anual incluye el desarrollo de órganos de almacenamiento, hojas, flores y semillas (Dafni et al.1981a).

*P. autumnale* es un geófito histeranto perenne, en donde las hojas y flores aparecen y se desarrollan en estaciones distintas; florece durante la estación otoñal (septiembre/octubre) cuando todavía no han aparecido las hojas, que suelen salir después de las primeras lluvias (noviembre/diciembre). Este tipo de plantas suelen vivir en climas áridos impredecibles, en donde los órganos de almacenamiento juegan un papel muy importante en el desarrollo de su ciclo vital (Dafni et al. 1981a).

Entre los geófitos histerantos, se pueden distinguir dos patrones, en base del tipo de órganos de almacenamiento, ciclos vitales y otras características: patrón "*Urginea*" y patrón "*Crocus*". *P. autumnale* sigue el patrón "*Urginea*" que se caracteriza por ovario situado sobre el nivel del suelo, dispersión de semillas antes de las primeras lluvias invernales y germinación de semillas inmediatamente después de la dispersión, sin periodo de dormancia (Dafni et al. 1981a). En este tipo de plantas, una acumulación de sustancias nutritivas en los órganos de almacenamiento es un prerrequisito para la floración, puesto que después de la acumulación de una masa crítica inicial, ésta puede ocurrir casi cada año. De este modo el número de flores no muestra muchas diferencias entre años (Dafni et al. 1981a).

Los órganos de almacenamiento, como los bulbos, son capaces de disponer de reservas de alimento para el crecimiento rápido de las hojas al principio de la estación. Estas reservas se utilizan en períodos donde la producción neta es reducida. Por ejemplo, el almacén de nutrientes en bulbos permite hacer crecer rápidamente las hojas después de inviernos fríos y/o veranos secos. En las plantas histerantas perennes (caso de *P. autumnale*), existe lo que se denomina "reserva de fondos" (store walls) que permite que, en un buen año, el excedente es añadido a la reserva de fondos y en un mal año, el déficit es tomado de esta misma reserva. Por ello la producción de hojas puede ser la misma en años buenos y malos, donde la floración es independiente de las condiciones climáticas simultáneas (Dafni et al. 1981b).

Estudios realizados en Israel (Dafni et al. 1981a) sobre el ciclo vital de *P. autumnale* establecieron que la floración se producía primero en poblaciones situadas en zonas con temperaturas más bajas, siendo este factor, la temperatura, y no el fotoperiodo el más importante para la estimulación de la floración (se ha demostrado experimentalmente que cuando la temperatura es constante no hay reacción a la floración). En experimentos con suplemento de agua, desde junio en adelante, no se detectaron efectos sobre la aparición de flores y hojas. Una vez producidas las flores, se produce la polinización de éstas. Las plantas que florecen en otoño muestran varias adaptaciones morfológicas, fisiológicas, de desarrollo y químicas que pueden estar relacionadas con posibles daños de las lluvias otoñales, por un lado, y con la atracción a polinizadores, por otro (Dafni 1996).

Entre las plantas que florecen en otoño, los geófitos ocupan un lugar importante. En esta estación aparecen relativamente pocos insectos activos; principalmente se pueden observar abejas solitarias, con escaso número de individuos y especies. Por ejemplo, en un único hábitat, solo pueden verse 2-4 especies de abejas solitarias y 1-3

de dípteros sírfidos, mientras que en el pico de floración primaveral, en ese mismo hábitat, pueden aparecer 100-200 y 5-30 especies, respectivamente (Dafni 1996).

Varias posibles ventajas se han enumerado para la polinización fuera de la época primaveral: 1) la menor competencia por polinizadores hace que la frecuencia de visitas por flor es alta cuando las flores escasean, 2) las pocas especies que florecen simultáneamente y el pequeño número de polinizadores puede aumentar el tipo de visitas “no-mezcladas” en el mismo episodio de búsqueda de comida. Esto conducirá a altos grados de constancia en los polinizadores y en una baja tasa de transferencia de polen impropio. (Dafni 1996).

La dispersión de las semillas en la especie se produce de forma autócora, siendo muy poco eficiente. También se ha documentado la dispersión por hormigas de la especie *Messor barbarus* en pastizales castellanos (Azcárate et al. 2005).

### **Citogenética**

Fue Battaglia el primer autor que describió el cariotipo básico ( $2n= 14$ ) de *P. autumnale* (Battaglia 1952). En trabajos posteriores, el mismo autor recopila y establece más números cromosómicos de la especie y su distribución geográfica (Battaglia 1957, 1963, 1964a, 1964b). En 1963, en 19 plantas recogidas en Sicilia, fue también Battaglia el primero que describió un cariotipo con cromosomas B, concretamente una planta con  $2n = 14+3B$  (Battaglia 1963). En este trabajo ya se hace constar que no existen diferencias morfológicas apreciables entre ésta y otras plantas con cariotipo regular. En sucesivos estudios (Battaglia 1957, 1963, 1964a, 1964b) describe también cariotipos de plantas de Marruecos, Argelia, Túnez, Palestina, Turquía, España, Portugal, Francia, la Península Italiana y Sicilia, intentando establecer la distribución geográfica de la poliploidía en esta especie. Asimismo, descubre nuevas localidades con cromosomas B en Sicilia ( $2n = 14 + 3 B$ ) y Palestina ( $2n = 14 + 6-8 B$ ) (Battaglia 1964).

Los estudios llevados a cabo por Hong en 1982 añaden ocho citotipos nuevos a los seis ya descritos en la literatura, en donde también examina los patrones de distribución e intenta explicar el origen de los poliploides en la especie, encontrando tres niveles de ploidía y nuevas localidades con individuos portadores de cromosomas B. En los ocho nuevos citotipos encontrados, establece diferencias entre dos tipos de cromosomas con satélites (par 5), uno (tipo A) submetacéntrico y otro (tipo B) metacéntrico. Asimismo, también establece dos tipos estructurales de cromosomas B (uno acrocéntrico y otro telocéntrico). Además, establece un primer patrón de distribución geográfica entre cariotipos diploides y poliploides y una primera relación filogenética entre cariotipos.



**Figura 1.2.** Diferentes aspectos de la morfología externa de *Prospero autumnale*. a) Aspecto general de la planta, con cuatro escapos, y aparición incipiente de hojas. b) Bulbo y escapo florido; nótese que aún no dispone de hojas. c) Detalle de la inflorescencia en racimo. d) Detalle de la infrutescencia con frutos inmaduros. e) Detalle de las flores. f) Inicio de la emergencia del escapo; nótese cómo las flores ya están formadas y agrupadas. g) Detalle del bulbo con aparición incipiente de las hojas.

Por su parte, Ebert et al. (1996) hacen un amplio y profundo análisis citogenético utilizando diversas técnicas tales como Bando C, impregnación argéntica, CMA/DAPI y citometría de flujo, en una gran cantidad de individuos de muchas poblaciones de toda su área de distribución, estableciendo varias características citológicas y de tamaño de genoma. En primer lugar, se resalta de nuevo el amplio rango de variabilidad cromosómica y de tamaño de genoma de la especie, distinguiéndose cariotipos poliploides, diploides y diferencias cromosómicas estructurales, y además se documenta la presencia de cromosomas B en distintas poblaciones y se resalta la variación cariotípica intrapoblacional.

En su estudio (Ebert et al. 1996), encuentran diferentes números cromosómicos, estableciendo  $x=7$  como el número cromosómico básico, que se distribuye por la mayor parte de su área de distribución. También encuentran individuos con  $x=6$  en poblaciones de Creta y Milos, y  $x=5$  en poblaciones del norte de Libia. En este mismo trabajo establecen que el número cromosómico  $x=4$  corresponde a una especie distinta: *Prospero obtusifolium* (= *Scilla obtusifolium*), con un área de distribución restringida a la zona costera mediterránea del sur de España, norte de África e islas mediterráneas del oeste. Quizás lo más interesante de este trabajo es el registro de números cromosómicos distintos en las mismas poblaciones, como ocurre en individuos con  $2n=14$  y  $2n=12$  encontrados en la misma población, y la presencia de cromosomas B en 10 de las poblaciones estudiadas.

El tamaño del genoma se cuantificó inicialmente en cinco individuos (2 de Grecia continental, 2 de Creta y 1 de Chipre con cromosomas B) mediante citometría de flujo. Los valores (1C) variaron entre 4,26 pg de un individuo de Grecia y 5,25 pg (23 % más que los valores más bajos) del individuo de Chipre (con cromosoma B). De aquí se dedujo que el cromosoma B suponía el 18,4 % del cariotipo.

En Malta, Córcega y la Península Ibérica se encuentran cariotipos morfológicamente similares al básico, pero con un mayor contenido de DNA, siendo 5,72 pg el valor 1C del individuo de Malta, 5,58 pg el de Córcega y muy altos los contenidos de DNA de la Península Ibérica (6,85 pg, 7,34 pg y 7,49 pg). Aunque la morfología de los cariotipos es similar al tipo básico, se encuentran diferencias en tamaño de los cromosomas más grandes. En Turquía se registraron dos individuos con diferencias morfológicas en el cariotipo y en tamaño de genoma (Ebert et al. 1996). Por último, en Creta se encontraron cariotipos con  $2n=12$ , distinguibles del cariotipo básico por una morfología única, la más alta cantidad de heterocromatina en diploides y un mayor tamaño del genoma (1C= 5,94, 6,19 y 6,33 pg en tres individuos analizados) a pesar de su más bajo número de cromosomas. En una población de las estudiadas en Creta se encontraron conjuntamente individuos con  $2n=12$  y  $2n=14$ , y el bandedo C demostró claramente que las plantas con  $2n=14$  no eran miembros numéricamente alterados de  $2n=12$  y viceversa. También se encontraron cromosomas B en individuos de esta población (Ebert et al. 1996).

En la revisión realizada por Vaughan et al. en 1997, se establecen diez razas cromosómicas con los datos existentes de cariotipos y su distribución geográfica,

considerando a *P. autumnale* como un complejo de especies crípticas. Además, se describen los patrones de distribución de poblaciones diploides y poliploides del complejo de especies en Europa y Norte de África y se consideran los posibles patrones históricos de hibridación y colonización.

Estos autores describen seis genomas en el complejo de especies crípticas de *P. autumnale*, dentro de su área de distribución, y uno teórico. Éstos son: B<sup>7</sup>, A, C<sup>6</sup>, B<sup>5</sup>, B\* y D y el hipotético B<sup>6</sup>. A partir de estos genomas básicos se establecen cuatro razas diploides (B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, AA, C<sup>6</sup>C<sup>6</sup>, B<sup>5</sup>B<sup>5</sup>) y seis razas poliploides (B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, AAB<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B\*B\*, DDDD y AAB<sup>7</sup>B<sup>7</sup>) (Vaughan et al. 1997). Se establece la localidad de Creta como el área con más presencia de razas: B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, C<sup>6</sup>C<sup>6</sup>, diploides B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>B\*B\* alotetraploides y el tetraploide DDDD, así como híbridos B<sup>7</sup>C<sup>6</sup>, considerando esta zona como el centro de expansión de la especie y zona de refugio glacial durante la edad del Hielo (Vaughan et al. 1997).

Por otra parte, el genoma A sólo lo encuentran en el oeste de su área de distribución y plantean dos posibles hipótesis para su evolución: i) que su origen hubiera ocurrido en el oeste, o bien que ii) se hubiera aislado en un refugio suroeste (sur de España) durante la última glaciación, y que posteriormente plantas con este genoma se hubieran expandido a España, Portugal y Sark (en el oeste de Gran Bretaña) (Vaughan et al. 1997).

El último estudio sobre la diversificación cromosómica y evolución del cariotipo en diploides del género *Prospero* se ha realizado por Jang et al. en 2013. En este trabajo se emplean diversos marcadores moleculares tales como los rRNA 5s y 35s para estudiar su número y localización dentro del cariotipo, en todas las razas diploides y citotipos de *Prospero*. Se analiza la evolución de los loci rDNA y el tamaño del genoma en un contexto filogenético y se establece un modelo para la reordenación cromosómica dentro del género.

En el mismo estudio se establece la presencia de cuatro citotipos diploides (AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>5</sup>B<sup>5</sup>) en función de las diferencias en número cromosómico, estructura cromosómica (fusión/fisión) y tamaño del genoma. El citotipo AA se define por un número diploide  $2n = 2x = 14$ , con cuatro pares de cromosomas acrocéntricos (1-4), un par metacéntrico con un satélite intercalado (5) y dos pares más pequeños, uno de los cuales es acrocéntrico (6) y el otro metacéntrico (7) (Ruíz-Rejón et al. 1980) y un tamaño de genoma  $1C \text{ DNA} = 7,85 \pm 0,045 \text{ pg}$ . Existe un único organizador nucleolar (NOR) adyacente al centrómero en el brazo largo del cromosoma 3. En consistencia con este resultado, todos los citotipos de *P. autumnale* poseen un único locus intersticial de rDNA 35S, normalmente muy cercano al centrómero. Además, muestran uno o dos loci de rDNA 5S en diferentes citotipos. Por ejemplo, en el AA hay un único locus de rDNA 5S en la región pericentromérica del brazo corto del cromosoma 2 (Jang et al. 2013).

En la Península Ibérica, *P. autumnale* ha sido estudiada intensamente desde el punto de vista cariológico (Ruiz-Rejón et al. 1980, Parker et al. 1991, Guillén et al. 1984). De las razas descritas por Vaughan et al. (1997), sólo se han encontrado cuatro de ellas,

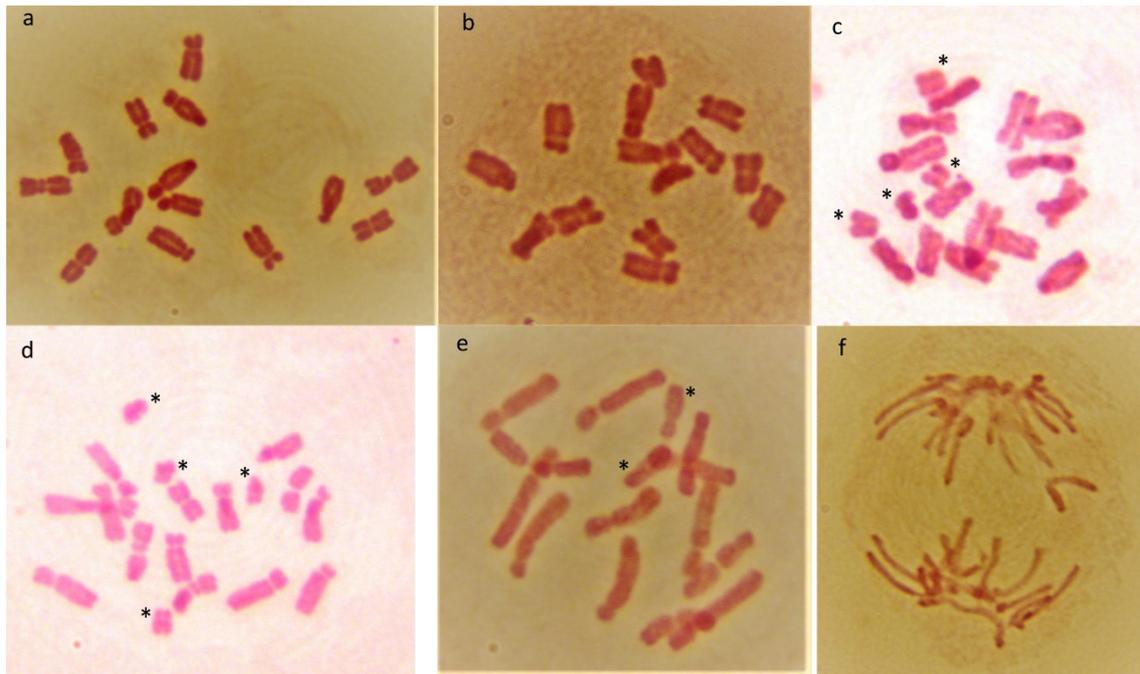
dos diploides, con  $2n=14$  (AA y  $B^7B^7$ ) y otras dos tetraploides,  $2n=28$  ( $B^7B^7B^7B^7$  y  $AAB^7B^7$ ). Las razas AA y  $AAB^7B^7$  sólo son conocidas en Iberia. También se han encontrado numerosas poblaciones, tanto diploides como tetraploides, portadoras de cromosomas B y de segmentos supernumerarios (Jamilena et al. 1995).

Las diferencias observadas entre genomas de *Prospero* podrían ser respuestas adaptativas a ambientes diferentes, o bien el resultado de una acumulación de cambios neutros en la cantidad de DNA y otras reordenaciones genómicas. Hay que destacar que los ambientes encontrados para la especie van desde zonas relativamente frías, zonas costeras a regiones áridas de Israel y Libia. Pero si la selección fuera la única causa de la variación, no deberíamos esperar tal masiva variedad de razas en Creta y tal diversidad de razas cromosómicas en ambientes similares (Vaughan et al. 1997).

### **Los cromosomas B en *P. autumnale* (Figura I.3)**

Como hemos mencionado arriba, el primer autor que descubrió los cromosomas B en *P. autumnale* fue Battaglia (1963). La descripción que hizo de ellos fue de cromosomas accesorios, provistos de centrómeros bien distinguibles y aspecto general eucromático con un tamaño inferior al de los otros cromosomas típicos. En este mismo trabajo hacía constar que las dimensiones del cromosoma accesorio eran prácticamente idénticas a las del satélite lineal del tipo cromosómico nucleolar Mns (cromosoma 5). En 1964 encontró plantas en Palestina con un número variable de Bs de entre 6 y 8 (Battaglia 1964).

En el estudio llevado a cabo por Ebert et al. (1996) anteriormente citado, se encontraron cromosomas B en individuos con  $2n=14$  de Creta (3B), Chipre (3 y 4 B) y Turquía (3B), además de en individuos con  $2n=12$  de Creta (1 y 4 B). En las poblaciones con  $2n=14$ , los cromosomas B resultaron morfológicamente uniformes y submetacéntricos, mientras que en las  $2n=12$  mostraron heterocromatina pericentromérica.



**Figura 1.3.** Metafasas de meristemo apical de raíz de *P. autumnale*. a) y b) cariotipo normal con  $2n = 14$ , c) y d) cariotipo con 4 cromosomas B,  $2n = 14 + 4B$ , e) cariotipo con 2 cromosomas B,  $2n = 14 + 2B$ , f) anafase. Todos los cariotipos pertenecen a individuos recolectados en la población de Cuesta La Palma. Los cromosomas B se señalan en cada fotografía con un asterisco.

En poblaciones españolas de *P. autumnale*, Ruiz-Rejón y Oliver estudiaron la correlación entre la presencia de cromosomas B y la expresión diferencial de ciertas enzimas esterases (Ruiz-Rejón et al. 1980b, Oliver et al. 1982). En Torre del Vinagre (Sierra de Cazorla) encontraron individuos con 2, 3 y 9 cromosomas B, que fueron uniformes en tamaño y morfología. En individuos en interfase apareció un número de cuerpos heteropícnóticos equivalente al número de Bs. El estudio sobre estereras reveló un total de 10 electromorfos mediante electroforesis en gel de almidón. Estas bandas se agrupaban en tres zonas de actividad esterasa: E-1, E-2 y E-3, con movilidad decreciente, con dos, cuatro y cuatro variantes alélicas, respectivamente. Las bandas de la zona E-1 aparecían exclusivamente en los 10 individuos portadores de cromosomas B. Las zonas E-2 y E-3 lo hacían en todos los individuos de la población, con o sin cromosomas B (Ruiz-Rejón et al. 1980b). La presencia de actividad enzimática E-1 en los individuos con cromosomas B sugería que la presencia de los cromosomas B estaba asociada a cambios reguladores en las células modificando la acción de ciertos genes. Los autores plantearon dos posibles hipótesis sobre el posible papel de los Bs en este cambio regulador del enzima E-1: i) el gen estructural específico de la E-1 está situado en el cromosoma B, o ii) el cromosoma B puede jugar un papel regulador de la expresión del gen estructural para el E-1. En un estudio posterior, incluyendo también individuos de la población Cuesta de La Palma, en la provincia de Granada, estos autores encontraron individuos que mostraban mosaicismos para la presencia de Bs y que ésta

estaba completamente asociada con la expresión de E-1. El mosaicismo se debía a la inestabilidad mitótica que presentaba el B en las raíces de estos bulbos. Analizando muchas raíces de varios bulbos heterocigotos para el locus Est-1, estos autores demostraron que el gen estructural para E-1 no estaba localizado en el cromosoma B, sino que la presencia del B ejercía una acción reguladora sobre la expresión del gen Est-1, localizado en uno de los cromosomas del complemento A (Oliver et al. 1982).

Jang et al. (2013) realizaron el mapeo cromosómico mediante FISH para el DNAr 35S y 5S, así como para el DNA satélite PaB6, con el objetivo de intentar determinar la composición y origen de los cromosomas B en el complejo *P. autumnale*. Estos autores observaron que el rDNA 5S está presente en la mayoría de los cromosomas B que analizaron, y se localiza principalmente en las regiones centroméricas y pericentroméricas de éstos. Por el contrario, sólo cinco cromosomas B de los estudiados mostraron señal para el rDNA 35S, que estaba localizado en el brazo corto y en parte del brazo largo. Estos cinco cromosomas B, sin embargo, no mostraron amplificación para el rDNA 5s (Jang, 2013). El DNA satélite PaB6 fue encontrado en los cromosomas B de diploides y poliploides, aunque la señal era más fuerte y variable en poliploides. En el citotipo AA, el número de copias y la distribución del PaB6 eran uniformes, tanto en estructura como en distribución, mientras que las señales de FISH se observaban consistentemente en las regiones subterminales de ambos brazos de los cromosomas B (Jang et al. 2013).

En un estudio más reciente, estos mismos autores plantearon varias hipótesis sobre la diversidad y origen de los cromosomas B en el complejo de especies de *P. autumnale* (Jang et al. 2015). Por una parte, propusieron el origen recurrente de los cromosomas B en diferentes citotipos del complejo, tales como AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>, y distinguieron 12 tipos de cromosomas B en todo el complejo, teniendo en cuenta los citotipos diploides y tetraploides, que se diferenciaban en la cantidad y localización de rDNA (5S y 35S) y el DNA satélite PaB6.

# Objetivos

El objetivo general de esta tesis es profundizar en el conocimiento de los cromosomas B, especialmente con respecto a su frecuencia en las poblaciones, modo de transmisión y composición molecular. Para ello, hemos centrado nuestro trabajo en el sistema de cromosomas B de la planta *Prospero autumnale*, sobre el que se iniciaron estudios muy interesantes en los años 80 del siglo XX por miembros del departamento de Genética de la Universidad de Granada, pero sobre el que quedaron muchas incógnitas por resolver, que hemos intentado aclarar con los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Realizar un seguimiento de la evolución temporal de la frecuencia del B en la población de La Palma, de la que existen registros desde los años 80 del siglo XX.
- 2.- Determinar el modo de herencia del cromosoma B y la posible existencia de algún mecanismo de impulso en su transmisión que explique los cambios intrapoblacionales en su frecuencia.
- 3.- Conocer la distribución y frecuencia del cromosoma B en poblaciones vecinas a la población focal de La Palma y analizar sus efectos sobre las características fenotípicas de los individuos portadores, especialmente sobre aquellos rasgos que pueden afectar al vigor y fertilidad.
- 4.- Cuantificar la abundancia de elementos repetitivos en los cromosomas B de *P. autumnale*, mediante aproximaciones genómicas y bioinformáticas sobre datos generados por secuenciación masiva.
- 5.- Investigar la presencia de genes del ciclo celular que pudieran estar implicados en el mecanismo de impulso de transmisión mostrado por el B.
- 6.- Averiguar el modo de origen del B en el citotipo AA de *P. autumnale* sobre la base de los datos genómicos obtenidos.

## Referencias

- Ainsworth Charles C. 1980. The populations cytology of *Scilla autumnalis*. PhD. Thesis. Queen Mary College. University of London
- Almeida da Silva RM and Crespi AL. 2013. *Scilla* L. en Castroviejo, S. et al (eds). Flora Ibérica 20, 145-156. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Almeida da Silva R, Rocha J, Silva A, García-Cabral I, Amich F and Crespi AL. 2014. The Iberian species of *Scilla* (Subfamily Scilloideae, Family Asparagaceae) under climatic change scenarios in Southwestern Europe. Systematic Botany, 39 (4).
- Araújo SMSR, Pompolo SG, Perfectti F and Camacho JPM. 2001. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. Proc. R. Soc. Lond. B 268: 1127–1131.
- Araújo SMSR, Pompolo SG, Perfectti F and Camacho JPM. 2002. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited. Proc. R. Soc. Lond. B 269: 1475–1478.
- Ayonoadu U and Rees H. 1968. The influence of B-chromosomes on chiasma frequencies in Black Mexican Sweet Corn. Genetica. 1968, Volume 39, Issue 1, pp 75–81.
- Azcárate FM, Arqueros L, Sanchez AM and Peco B. 2005. Seed and fruit selection by harvester ants, *Messor barbatus*, in Mediterranean grassland and scrubland. Functional Ecology 19:273-283.
- Banaei-Moghaddam AL, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Mayer KFX, Houben A. 2015. Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Volume 1849, Issue 1: 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.007>.
- Battaglia E. 1952. Filogenesi del cariotipo nel genere *Scilla*. 2: Il cariotipo diploide di *Scilla autumnalis* L. Industrie grafiche V. Lischi e figli
- Battaglia E. 1957. *Scilla autumnalis* L.: Biotipi 2n, 4n,6n e loro distribuzione geografica. Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 10:1, 75-95.
- Battaglia E. 1963. Una mutazione con B-cromosomi,  $2n = 14 + 3b$ , in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae), Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 16:3.
- Battaglia E. 1964a. Un secondo caso di B-cromosomi ( $2n = 14 + 6-8B$ ) in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) proveniente Dalla Palestina, Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 17:1, 65-76.
- Battaglia E. 1964b. *Scilla autumnalis* L.: Nuovi reperti di biotipi cariologici 2n, 4n, 6n, Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 17:3, 557-565.

- Benetta E D, Antoshechkin I, Yang T, Nguyen HQM, Ferree P M, and Akbari O S. 2020. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. *Science Advances*, 6(14), eaaz9808. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9808>
- Blunden R, Wilkes TJ, Forster JW, Jimenez MM, Sandery MJ, Karp A and Jones RN. 1993. Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome*, 36(4), 706–711. <https://doi.org/10.1139/g93-095>.
- Borisov YM and Zhigarev IA. 2018. B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* Thomas 1907 (Rodentia, Muridae). *Genes*. Oct, 9(19):472. doi: [10.3390/genes9100472](https://doi.org/10.3390/genes9100472)
- Bosemark NO. 1956. On accessory chromosomes in *Festuca pratensis* III. Frequency and geographical distribution of plants with accessory chromosomes. *Hereditas* 42. issue1-2: 189-210.
- Bosemark NO. 1967. Edaphic factors and the geographical distribution of accessory chromosomes in *Phleum phleoides*. *Hereditas*. 57, issue 1-2: 239-262. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1967.tb02105.x
- Bougourd SM and Jones RN. 1997. B chromosomes: a physiological enigma. *New Phytologist* 137:43-54.
- Brown LM and Jones RN. 1976. B-chromosomes effects at meiosis in *Crepis capillaris*. *Caryologia*, 41:493-506.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM and Cabral de Mello DC. 2013. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS One*, 2013 Jun 27; 8(6): e66532. doi: [10.1371/journal.pone.0066532](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066532).
- Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A and Camacho JPM. 1997. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, long a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*, 5, 194–198
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. Pp. 223–286 in T. R. Gregory, ed. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, CA.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC and Cabrero J. 1997. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*, 149(6), 1030–1050. <https://doi.org/10.1086/303364>
- Camacho JPM, Sharbel TF and Beukeboom L. 2000. B-chromosomes evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355:163-178.

- Camacho J P M, Bakkali M, Corral J M, Cabrero J, López-León M D, Aranda I, Marín-Alganza A and Perfectti F. 2002. Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proc. Biol. Roy. Soc. London* 269: 2173–2177. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2135>
- Camacho J P M, Shaw M W, Cabrero J, Bakkali M, Ruíz-Estévez M, Ruíz-Ruano F J, Martín-Blázquez R and López-León MD. 2015. Transient microgeographic clines during B chromosome invasion. *American Naturalist*, 186(5), 675–681. <https://doi.org/10.1086/683172>
- Coan RLB and Martins C. 2018. Landscape of transposable elements focusing on the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genes* 9. 269. doi:10.3390/genes9060269.
- Chen Q, Jahier J and Cauderon Y. 1993. The B chromosome system of inner mongolian *Agropyron* Gaertn. 2. Effects of Bs on homologous and homoeologous meiotic chromosome pairing, *Caryologia*, 46:4, 293-299, DOI: [10.1080/00087114.1993.10797269](https://doi.org/10.1080/00087114.1993.10797269)
- Cheng YM and Lin BY. 2004. Molecular organization of large fragments in the maize B chromosome: indication of a novel repeat. *Genetics*, vol 166, no 4:1947-1961 <https://doi.org/10.1534/genetics.166.4.1947>.
- Confalonieri VA. 1995. Macrogeographic patterns in B-chromosomes and inversion polymorphisms of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis*. *Gen. Sel Evol* 27:305-311.
- Dafni A, Shmida A and Avishai M. 1981a. Leafless autumnal-flowering geophytes in the mediterranean region. *Phytogeographical, ecological and evolutionary aspects. Plant systematics and evolution*, 137. 181-193.
- Dafni A, Cohen C and Noy-Meir I. 1981b. Life-cycle variation in geophytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol 68. No. 4. 652-660.
- Dafni A. 1996. Autumnal and winter pollination adaptations under Mediterranean conditions. *Boccone* 5(I).
- Dhar MK, Kour J and Kave S. 2019. Origin, behaviour, and transmission of B chromosome with special references to *Plantago lagopus*. *Genes* 10, 152.
- Ebert I, Greilhuber J and Speta F. 1996. Chromosome banding and genome size differentiation in *Prospero* (Hyacinthaceae): diploids. *Pl. Syst. Evol.* 203, 143-177.
- Egan AN, Schlueter J, Spooner DM. 2012. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany* 99(2): 175–185. doi:10.3732/ajb.1200020
- Emadzade K, Jang TS, Macas J, Kovařík A, Novák P, Parker J, Weiss-Schneeweiss H. 2014. Differential amplification of satellite PaB6 in chromosomally hypervariable *Prospero*

*autumnale* complex (Hyacinthaceae). Ann Bot. 114(8):1597-608. doi: 10.1093/aob/mcu178.

Evans GM and Macefield AJ. 1973. The effects of B chromosomes on homoeologous pairing in species hybrids. *Chromosoma*, 41:63-73.

Fröst S. 1958. The geographical distribution of accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. *Hereditas* 44 (1):75-111.

Ghaffari S and Bidmeshkipoor A. 2002. Presence and behaviour of B-chromosomes in *Acanthophyllum laxiusculum* (Caryophyllaceae). *Genetica* 115, 319–323. <https://doi.org/10.1023/A:1020676119886>

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49.

Guillén A and Ruiz Rejón M. 1984. Structural variability and chromosome numbers variation in natural populations of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Plant systematic and evolution*. 144. 201:207.

Hamouche Y, Amirouche N, Misset M T and Amirouche R. 2010. Cytotaxonomy of autumnal flowering species of Hyacinthaceae from Algeria. *Plant Syst Evol* 285:177–187.

Hanlon SL, Miller DE, Eche S, Hawley RS. 2018. Molecular analysis of *Drosophila melanogaster* B chromosomes reveals their origin, composition and structure doi: <https://doi.org/10.1101/386995>

Hakansson A. 1948. Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. *Hereditas* 34: 35–59

Hasegawa N. 1934. A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia* 6: 68–77

Hewitt GH and Brown PM. 1970. The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus*. V. A steep cline in East Anglia. *Heredity* 25:363-371.

Hewitt G and Ruscod C. 1971. Changes in microclimate correlated with a cline for B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Animal Ecology*, Vol 40, No 3:753-765.

Hong DY. 1982. Cytotype variation and polyploidy in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae). *Hereditas* 97: 227-235.

Hong Z J, Xiao J X, Peng S F, Lin Y P, & Cheng Y M. 2020. Novel B-chromosome-specific transcriptionally active sequences are present throughout the maize B chromosome. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(2), 313–325. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01623-2>

- Houben A, Leach CR, Verlin D, Rofe R, Timmis JN. 1997. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*.106(8):513-9. doi: 10.1007/pl00007689. PMID: 9426283.
- Huang W, Du Y, Zhao X and Jin W. 2016. B chromosomes contains active genes and impact the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant biology*.16:88. DOI 10.1186/s12870-016-0775-7.
- Jackson RC and Newmark P. 1960. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science*, Vol 132:1316-1317.
- Jang TS, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leitch AR, Speta F and Weiss-Schneeweiss H. 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evolutionary Biology* 13:130.
- Jang TS, Parker JS and Weiss-Schneeweiss H. 2015. Structural polymorphisms and distinct genomic composition suggest recurrent origin and ongoing evolution of B chromosomes in the *Prospero autumnale* complex (Hyacinthaceae). *New Phytologist* ;210(2):669-79. doi: 10.1111/nph.13778
- Jamilena M, Martinez F, Garrido-Ramos MA, Ruiz-Rejón C, Romero AT, Camacho JPM, Parker JS and Ruiz-Rejón M. 1995. Inheritance and fitness effects analysis for a euchromatic supernumerary chromosome segment in *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 118:249-259.
- Jiménez M M, Romera F, Puertas MJ and Jones RN. 1994. B-chromosomes in inbred lines of rye (*Secale cereale* L.) I. Vigour and fertility. *Genetica* 92: 149-154. <https://doi.org/10.1007/BF00132533>
- Jones RN and Rees H. 1982. B chromosomes. Academic Press. 266 pp.
- Jones RN. 1991. B-chromosome drive. *The American Naturalist*, Vol. 137, No. 3, Symposium: The Genetics and Evolutionary Biology of Meiotic Drive, pp. 430-442.
- Jones N. 1995. B-chromosomes in plants. *Tansley Review no. 85. New Phytol.* 1995. 131. 411-434.
- Jones RN, González-Sánchez M, González-García, M, Vega, JM and Puertas MJ. 2008. Chromosomes with a life of their own. *Cytogenet Genome Res.* 120:265-280.
- Jones N. 2012. B chromosomes in plants. *Plant Biosystems*, Vol. 146 (3) :727–737.
- Jones RN. 2018. Transmission and drive Involving parasitic B chromosomes. *Genes*; 9(8):388. <https://doi.org/10.3390/genes9080388>.
- Kayano H, Sannomiyat M and Nakamura K. 1970. Cytogenetic studies on natural populations of *Acrida lata*. I. Local variation in the frequency of B chromosomes. *Heredity* 25:113-122.

- Kour G, Kaul S and Dhar MK.. 2014. Molecular characterization of repetitive DNA sequences from B chromosome in *Plantago lagopus* L. *Cytogenet Genome Res.*142(2):121-8. doi: 10.1159/000356472
- Kumke K, Macas J, Fuchs J, Altschmied L, Kour J, Dhar MK and Houben A.2016. *Plantago lagopus* B chromosome is enriched in 5S rDNA-derived satellite DNA *Cytogenet Genome Res.* 148(1):68-73. doi: 10.1159/000444873.
- Lamb JC, Kato A, Birchler JA. 2005. Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma* 113:337–349
- Lamb JC, Riddle N C, Cheng YM, Theuri J, & Birchler J A. 2007. Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Research*, 15(3), 383–398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429746>
- Lía VV, Confalonieri VA and Poggio L. 2007. B chromosomes polymorphism in maize landraces: adaptive vs demographic hypothesis of clinal variation. *Genetics* 177:895-904.
- Ma W, Gabriel TS, Martis MM, Gursinsky T, Gursinsky T, Schubert V, Vrána J, Doležel J, Grundlach H, Altschmied L., Moghaddam U, Houben, A. 2016. Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog (Suppl. info). *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.14110>
- Makunin AI, Romanenko SA, Beklemisheva VR, Perelman PL, Druzhkova AS, Petrova KO, Prokopov DY, Chernyaeva EN, Johnson JL, Kukekova AV, Yang F, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS, Trifonov VA. 2018. Sequencing of supernumerary chromosomes of red fox and raccoon dog confirms a non-random gene acquisition by B chromosomes. *Genes*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/genes9080405>
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, Gundlach H, Wicker T, Šimková H, Novák P, Neumann P, Kubaláková M, Bauer E, Haseneyer G, Fuchs J, Doležel J, Stein N, Mayer KF, Houben A. 2012. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(33):13343-6. doi: 10.1073/pnas.1204237109.
- McAllister BF and Werren J H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106(4), 243–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254726>
- Mendelson D, Zohary D. 1972. Behaviour and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. *Heredity* 29: 329–339
- Melander Y. 1950. Accessory chromosomes in animals, especially in *polycelis tenuis*. *Hereditas*, 36, 19–38. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1950.tb03361.x>

- Miao VP, Covert SF and VanEtten HD. 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science*, vol 254:1773-1776.
- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano F J, Cabrero J, Corral J M, López-León M D, Sharbel T F, Camacho JPM. 2017a. Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Scientific Reports*, 7(April), 45200. <https://doi.org/10.1038/srep45200>
- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Camacho JP M, Cabrero J and López-León MD. 2017b. Transcription of a B chromosome CAP-G pseudogene does not influence normal condensin complex genes in a grasshopper. *Scientific Reports*, 7(June), 17650. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15894-5>
- Néo DM, Moreira Filho O and Camacho JPM. 2000. Altitudinal variation for B chromosomes frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85 (2):136-141.
- Novák P, Neumann P, Macas J. 2010. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*.15;11:378. doi: 10.1186/1471-2105-11-378. PMID: 20633259; PMCID: PMC2912890.
- Ohta S and Saruhashi Y. 1999. Geographical distribution of B chromosomes in *Aegilops mutica* Boiss., a wild relative of wheat. *Hereditas* 130 (2). 177-183.
- Oliver JL, Posse, F, Martinez-Zapater JM, Enriquez, AM and Ruiz-Rejón, M. 1982. B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (liliaceae). *Chromosome* 85: 399-403.
- Östergren G. 1945. Parasitic nature of extra fragment chromosome. *Bot. Notiser* 1945:157-168.
- Östergren G. 1947. Heterochromatic B chromosomes in *Anthoxanthum*. *Hereditas*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1947.tb02804.x>.
- Palestis BG, Trivers R, Burt A and Jones RN. 2004. The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenet. Genome Res* 106:151-158.
- Parker J, Jones G, Edgar L, Whitehouse C. 1991a. The population cytogenetics of *Crepis capillaris* IV. The distribution of B-chromosomes in British populations. *Heredity* 66, 211–218 (1991). <https://doi.org/10.1038/hdy.1991.27>
- Parker JS, Lozano R, Taylor S and Ruiz-Rejón M. 1991b. Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. *Heredity* 67, 287-297.
- Perfectti F and Werren J H. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution*, 55(5), 1069–1073. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055\[1069:tioobc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055[1069:tioobc]2.0.co;2)

- Pereira HS, Delgado M, Viegas W, Rato JM, Barão A and Caperta A. 2017. Rye (*Secale cereale*) supernumerary (B) chromosomes associated with heat tolerance during early stages of male sporogenesis. *Annals of Botany*. 119(3):325-337. Doi: 10.1093/aob/mcw206.
- Plowman AB and Bougourd SM. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72:587-593.
- Puertas MJ, Romera F and de la Peña A. 1985. Comparison of B chromosomes effects on *Secale cereale* and *Secale vavilovii*. *Heredity*, 55:229-234
- Puertas MJ. 2002. Nature and evolution of B chromosomes in plants: A non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 96: 198-205.
- Randolph LF. 1941. Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. *Genetics*, 26:608-631
- Riera L, Petitpierre E, Juan C, Cabrero J, Camacho JPM. 2004. Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 716–719. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15149414>
- Roman H. 1947. Mitotic nondisjunction in the case of in-terchanges involving the B-type chromosome in maize. *Genetics* 32: 391–409
- Roman H. 1948. Directed fertilization in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 34: 450–454.
- Ruban A, Fuchs J, Marques A, Schubert V, Soloviev A, Raskina O, Badaeva E and Houben A. 2014. B chromosomes of *Aegilops speltoides* are enriched in organelle genome-derived sequences. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090214>
- Ruban A, Schmutzer T, Scholz U, Houben A. 2017. How Next-Generation Sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. *Genes*, 8(11). pii: E294. doi: 10.3390/genes8110294.
- Ruiz-Rejón, M, Oliver JL y Ruiz-Rejón, C. 1980a. Variabilidad cromosómica en *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) de la Península Ibérica. *Bol. Soc. Brot. Ser. 2*, 53: 555-562.
- Ruiz-Rejón M, Posse F y Oliver JL. 1980b. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). Effects at the isozyme level. *Chromosoma* 79. 341-348.
- Rosetti N, Rebagliati P and Remis MI. 2010. Supernumerary chromosome variants in *Dichroplus elongatus* (Acrididae): fluorescent banding and cline variation pattern. *Journal of orthoptera research* 19(2):261-265.
- Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM. 2017. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma*.126(4):487-500. doi: 10.1007/s00412-016-0611-8.

- Ruiz-Ruano FJ, CabreroJ, López-León MD, Sánchez A, & CamachoJPM. 2018. Quantitative sequence characterization for repetitive DNA content in the supernumerary chromosome of the migratory locust. *Chromosoma*, 127(1), 45–57. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0644-7>.
- Ruiz-Ruano F J, Navarro-Domínguez B, López-León MD, CabreroJ, & Camacho JPM. 2019. Evolutionary success of a parasitic B chromosome rests on gene content. *BioRxiv*, 1–25. <https://doi.org/10.1101/683417>
- Sapre AB and Deshpande DS. 1987. Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridation. *Journal of heredity* 78. 3. 191-196. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110355>
- Semple JC. 1989. Geographical distribution of B chromosomes of *Xanthisma texanum* (Compositae: Astereae). II. Local variation within and between populations and frequency variation through time. *American Journal of Botany*, 76, No. 5 :769-776. DOI: 10.2307/2444424.
- Serrano-Freitas É A, Silva DMZA.A. Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Oliveira C, Camacho JPM, Foresti F. 2020. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(1), 195–207.
- Sandery M J, Forster J W, Blunden R, & I Jones N R. 1990. Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome*, 33(1985), 908–913. <https://doi.org/10.1139/g90-137>
- Silva DM, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JP, Porto-Foresti F, Foresti F. 2014. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS One*. Apr 15;9(4):e94896. doi: 10.1371/journal.pone.0094896
- Speta F. 1982: Die Gattungen *Scilla* L. s. str. und *Prospero* Salisb. im Pannonischen Raum. Veröff. Intern. Clusius-Forschungsges. Güssing 5, 1–19.
- Speta F. 1985: *Prospero* Salisb. und *Barnardia* Lindl., zwei artenreiche Gattungen der Hyacinthaceae. – 3. Österr. Botanikertreffen in Salzburg, 31. 5. – 2. 6. 1985, Kurzfassungen der Vorträge, 25–26.
- Shaw MW. 1983. Rapid movement of a B-chromosome frequency cline in *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity*, 50(1):1-14.
- Speta F. 2000. Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Prospero* Salisb (Hyacinthaceae) auf der griechischen Insel Kreta. *Linzer Biologische Beiträge* 32: 1323–1326.

- Speta F.1998. Systematische analyse der Gattung *Scilla* L. s. l. (Hyacinthaceae). *Phyton* (Horn, Austria). Vol 38. 1-224.
- Staub RN. 1987. Leaf striping correlated with the presence of B chromosome in maize. *The Journal of Heredity*, 78:71-74.
- Tosta VC, Marthe JB, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM, Pompolo SG, Recco-Pimentel SM, Perfectti F, Campos LA, Camacho JP. 2014. Possible introgression of B chromosomes between bee species (genus *Partamona*). *Cytogenetic and Genome Research*, 144(3), 220–226. <https://doi.org/10.1159/000370171>
- Trivers R, Burt A and Palestis BG. 2004. B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome* 47: 1-8.
- Utsunomia R, Mazzoni D, de Silva ZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Hashimoto DT, Oliveira, Trifonov VA, Porto-Foresti F, Camacho JPM, Foresti F. 2016. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLOS ONE*. 11(3): e0150573. doi: 10.1371/journal.pone.0150573.
- Valente GT, Conte MA, Fantinatt BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD and Martins C. 2014. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 31(8):2061–2072 doi: 10.1093/molbev/msu148.
- Valdés B. 2004. Some validations in Liliaceae. *Willdenowia* 34. 63-64.
- Vanzela ALL, de Paula AA, Quintas CC, Fernandes T, Baldissera JNDC, de Souza TB. 2017. *Cestrum strigilatum* (Ruiz & Pavon, 1799) B chromosome shares repetitive DNA sequences with A chromosomes of different *Cestrum* (Linnaeus, 1753) species. *Comp. Cytogenet.* 11, 511–524.
- Vaughan HE, Taylor S, Parker JS. 1997. The ten cytological races of the *Scilla autumnalis* species complex. *Heredity* 79. 371-379.
- Vosa CG. 1983. The ecology of B-chromosomes in *Listera ovata* (L.) R. Br. (Orchidaceae). *Caryologia*, 36 (2): 113-120.
- White, M.J.D. 1973. *Animal cytology and evolution*. 3rd ed. Cambridge University Press, London
- Zurita, S., J. Cabrero, M. D. López-León, and J. P. M. Camacho. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274–277.

# Material y métodos

## Material colectado para el estudio

La mayor parte del material vegetal colectado para este estudio procede de la población de Cuesta La Palma en Loja (Granada, España, altitud = 761 m s.n.m., y coordenadas geográficas 37° 7' 7" N y 4° 17' 1" O), de donde se han recogido un total de 417 bulbos y 347 semillas de *Prospero autumnale* (Asparagaceae) (2n=14, citotipo AA, tamaño de genoma = 7.85 ± 0.045 pg) durante los meses de septiembre y octubre de los años que ha durado este trabajo. Además, para el capítulo 2 de la tesis también se recogieron un total de 485 bulbos de 14 poblaciones de la zona (Tabla M.1). Para los análisis llevados a cabo en los capítulos 3 y 4 se usaron además un individuo del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> (procedente de Apulia, Italia) y otro del citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> (procedente de Creta, Grecia), que nos fueron enviados por la Dr<sup>a</sup> Hanna Weiss-Schneeweiss, de la Universidad de Viena.

**Tabla M.1:** Relación de poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale*, con el número de individuos totales estudiados en cada una. MFE: matorral fruticoso con encinas, MMe: Matorral mediterráneo, MMP: Matorral mediterráneo pastoreado, MDe: Matorral degradado, VRu: Vegetación ruderal, PRe: Pinar de repoblación,

Población	N	Presencia de Bs	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m s.n.m.)	Hábitat
Cuesta La Palma	417	si	37° 07' 06.73 "	4° 17' 00.90 "	761	MFE
Villanueva de Tapia	54	si	37° 09' 45.99"	4° 20' 41.20"	725	MFE
Sierra de Gracia	24	no	37° 06' 32.26"	4° 23' 16.74"	693	MMe
Sierra del Umbral	63	si	37° 08' 06.66"	4° 21' 15.13"	779	MMP
Sierra de Jobo	55	no	37° 02' 08.27"	4° 16' 28.35"	945	MMe
La Tajea	67	no	37° 08' 09.96"	4° 13' 17.90"	575	MMe
El Torcal	15	si	36° 59' 06.94"	4° 31' 25.33"	656	VRu
Los Arenales	16	no	37° 12' 38.35"	4° 08' 55.79"	897	MDe
Los Pinos	46	no	37° 09' 44.91"	4° 09' 38.02"	548	PRe
El Chorro	52	no	36° 53' 18.28"	4° 47' 2.56"	340	PRe
Cerro del Almendro	18	no	37° 08' 50.29"	4° 11' 15.16"	969	MMP
Riofrio	23	no	37° 09' 03.40"	4° 12' 12.13"	563	MMP
Paso del Lobo	14	no	37° 11' 03.16"	4° 10' 05.30"	521	MMe
Serrezuela-Loja	38	no	37° 09' 54.64"	4° 07' 54.67"	522	MMP
Total	902					

## **Determinación del número de cromosomas B en cada individuo**

La determinación del número de cromosomas B en cada individuo se realizó mediante una tinción simple de los cromosomas con orceína lactopropiónica. Pero antes se preparó el material de la siguiente forma:

En el campo, durante los meses de septiembre y octubre de cada año se recogían plantas completas con el bulbo, desenterrándolo del suelo. El bulbo se limpiaba de tierra, se eliminaban todas las raíces que poseía y se quitaba el escapo y resto de la planta. Posteriormente se colocaba en hidrocultivo y se dejaba de 3 a 5 días, tiempo suficiente para que produjera nuevas raíces con una longitud de 1 cm aproximadamente. En este momento se cortaban y se sumergían en una solución de colchicina al 0.1 % en donde se dejaban durante cuatro o cinco horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, las raíces tratadas se lavaban en agua destilada y se fijaban en alcohol:acético en proporción 3:1, en donde se dejaban a 4<sup>o</sup> C hasta su preparación para visualizar al microscopio.

Para teñir las metafases del meristemo de la raíz se procedió de la siguiente forma: Las raíces tratadas y fijadas se lavaban en agua destilada y se colocaban en una disolución de HCl 1 N durante 5 minutos a 60 ° C. Posteriormente se sumergían en orceína lactopropiónica durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez teñidas se separaba el meristemo apical y se procedía a su visualización al microscópico óptico montándolas en un portaobjetos mediante la técnica de aplastamiento. La preparación se sellaba con laca de uñas.

## **Determinación de caracteres fenotípicos**

En el otoño de 2015 muestreamos entre 26 y 67 (media de 37) individuos en estado de fructificación en cada una de las ocho poblaciones siguientes (Tabla M.1): Palma, Tapia, Umbral, Torcal, Jobo, Tajea, Pinos y Chorro, que almacenamos en bolsas de papel hasta su posterior estudio en el laboratorio. De cada individuo separamos el bulbo del resto de la planta. Colocamos el bulbo en hidrocultivo para producir raíces que pudieran ser analizadas citogenéticamente, como hemos descrito anteriormente. Del resto de la planta medimos los siguientes caracteres fenotípicos: número de escapos (NES), longitud del escapo (LES, en mm), medido desde el punto de aparición del pedicelo de la primera flor hasta su inserción en el bulbo (en caso de que la planta tuviera más de un escapo se tomó la medida del mayor); longitud de la inflorescencia (LIN, en mm), medido como la distancia desde la base del pedicelo de la primera flor hasta el ápice de la inflorescencia (si había más de un escapo, mediamos en el más largo); longitud del pedicelo floral (LPE, en mm), medido para la flor más basal como la distancia desde la inserción del pedicelo en el escapo hasta la base de la flor; número de flores por planta (NFL); diámetro del bulbo (DBU, en mm), medido como la distancia entre los dos extremos del bulbo tomada transversalmente. Todas las medidas de longitud se tomaron con un calibre digital.

## **Extracción de ácidos nucleicos**

### ***Extracción de DNA***

Del material recolectado, seleccionamos cuatro individuos (dos 0B y dos +B) de la población Cuesta La Palma. Dos de ellos habían sido recolectados en 2014 (uno era 0B, que hemos denominado AA-0B1, y el otro era 7B, denominado AA-7B), mientras que los otros dos pertenecían a la muestra de 2017 (uno era 0B, AA-0B2, y el otro 2B, AA-2B). De estas 4 plantas, y de las dos pertenecientes a los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> cortamos hojas que secamos en bolsas de celofán en un ambiente con silicagel para la posterior extracción de DNA. Para esta extracción, tomamos aproximadamente 100 mg de material de cada individuo y lo trituramos en un mortero con nitrógeno líquido hasta convertirlas en un polvo fino. Posteriormente usamos el kit comercial de extracción de DNA “GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit” de Sigma-Aldrich (ahora Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción del DNA genómico (gDNA). Una vez aislado éste, lo cuantificamos mediante un nanodrop (Tecan’s Infinite 200 NanoQuant) y determinamos su calidad haciendo correr 5 microlitros de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

### ***Extracción de RNA***

Para la extracción de RNA, se usaron unos 100 mg aproximadamente de material fresco de hojas recién cortadas de los individuos AA-0B2 y AA-2B. De estos dos individuos realizamos una extracción de RNA usando el kit comercial “RNeasy Plant Mini Kit” de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el RNA chequeamos la integridad de este haciendo correr dos microlitros de cada una de las muestras en gel de agarosa al 2%, mediante electroforesis en gel. Además, cuantificamos la cantidad de RNA extraído en un nanodrop (Tecan’s Infinite 200 NanoQuant).

## **Secuenciación Illumina**

La secuenciación genómica fue realizada en dos fases. Primero, en 2014, generamos librerías genómicas para los individuos AA-0B1 y AA-7B que fueron secuenciadas por MacroGen Inc. (Corea del Sur) en un equipo Illumina HiSeq2000, que generó lecturas pareadas de 2x101 nt, con los siguientes tamaños totales: 2 963 288 692 nt (2.96 Gb) para AA-0B1 y 3 088 344 266 nt (3.09 Gb) para AA-7B. Además, en 2017 generamos cuatro librerías genómicas más, dos del citotipo AA y una de los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> (librerías AA-0B2, AA-2B, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>) que fueron secuenciadas con la plataforma HiSeq X Ten por la empresa Admera Health (EEUU), con lecturas pareadas de 2x151 nt y de tamaño: AA-0B2= 27 146 712 238 nt (27.15 Gb), AA-2B= 15 446 397 946 nt (15.45 Gb), B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>= 10 366 112 430 nt (10.37 Gb) y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> = 15 269 922 805 nt (15.27 Gb).

Por otra parte, a partir de los RNAs extraídos generamos dos librerías de RNA que fueron secuenciadas mediante Illumina HiSeq4000 por la empresa BGI Tech Solutions (China), con lecturas pareadas de 2x150 nt de longitud, y con tamaños AA-OB2= 7 426 053 300 nt (7.43 Gb) y AA-2B= 7 098 914 100 nt (7.10 Gb).

## **Herramientas bioinformáticas**

### ***Estimas de abundancia de DNA repetitivo***

Para el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas mediante NGS, en esta tesis hemos empleado dos estrategias de las varias que se han desarrollado en los últimos años (Ruban et al. 2017). La primera consiste en la detección de elementos repetitivos mediante RepeatExplorer (Novak et al. 2013), que permite identificar y anotar, en primera instancia, los repetitivos obtenidos y, en función de la forma del grafo generado, asignarlos a repetitivos en tandem (DNA satélite y familias multigénicas) o bien repetitivos dispersos (eminentemente transposones). A continuación, utilizamos el método "Coverage ratio analysis" (Ruban et al. 2017), que se aplica mediante el mapeo de lecturas con RepeatMasker, pero nosotros lo llevamos a cabo mediante SSAHA2 (Ning et al. 2001). Usando muestras normalizadas de lecturas de las diferentes librerías, y con la utilización de réplicas biológicas, las diferencias en cobertura de los mapeos observados en diferentes librerías se pueden transformar en diferencias de abundancia de los elementos repetitivos entre tipos de genomas

### ***Análisis bioinformático del satelitoma***

Para la catalogación de todos los DNAs satélites que sea posible encontrar en el genoma de *P. autumnale*, que constituyen el satelitoma de la especie, utilizamos la herramienta SatMiner, desarrollada por Ruiz-Ruano et al. (2016) que permite identificar las familias de DNA satélite presentes en un genoma, incluyendo las que son extremadamente raras. Los scripts e instrucciones para la ejecución del protocolo se encuentran disponibles libremente en el repositorio GitHub: <https://github.com/firuizruano/satminer>. En esencia, consiste en la realización de varias rondas de clusterización mediante RepeatExplorer (Novák et al. 2013) seguidas del filtrado de lecturas contenedoras del DNA satélite, incrementando de esta forma la probabilidad de encontrar familias raras del mismo (Ruiz-Ruano et al. 2016).

### ***Ensamblaje de novo del transcriptoma, anotación, mapeo y selección de genes del B***

En esencia, el procedimiento bioinformático utilizado para buscar genes en los cromosomas B es similar al descrito en Ruiz-Ruano y col. (2019) (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/683417v1>) y consiste en la búsqueda de secuencias codificadoras (CDSs) que muestran abundancia diferencial entre librerías con B y sin B. Como no hay disponibles genomas de referencia secuenciados de la especie,

nuestro método consiste en mapear lecturas de gDNA sobre los contigs de un transcriptoma *de novo* construido *ex profeso* para la misma especie.

Para el ensamblaje del transcriptoma usamos las dos librerías mencionadas anteriormente, desarrollando scripts que depositamos en el repositorio público: <https://github.com/fjuizruano/ngs-protocols> con instrucciones para su instalación y ejecución. Con este propósito ensamblamos las dos librerías de RNA seq con Trinity v2.5.0: <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/releases> (Haas et al. 2013), con las opciones por defecto, incluyendo la normalización *in silico* con una cobertura máxima de 50x. Ya que únicamente estábamos interesados en conocer la presencia de genes codificadores de proteínas en los Bs de *P. autumnale*, extrajimos los CDSs mayores de 100 aminoácidos usando el software Transdecoder: <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>, y posteriormente redujimos la redundancia con CD-HIT-EST: <http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/> (Godzik, 2006), con opciones de alta sensibilidad, y agrupando aquellas secuencias que mostraban el 80% o más de similitud en al menos el 80% de su longitud (opciones `-M 0 -aS 0.8 -c 0.8 -G 0 -g1`).

A continuación anotamos las CDSs clusterizadas usando RepeatMasker (<https://www.repeatmasker.org/>), con RepBase (<https://www.girinst.org/replib/>), y el pipeline de Trinotate (<https://trinotate.github.io>), y luego con BLAST2GO (<https://www.blast2go.com/>) y la base de datos SWISS-PROT (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>; Boeckmann et al. 2003) para anotar contigs de genes codificadores de proteínas.

Para el mapeado de las lecturas genómicas y transcriptómicas sobre el transcriptoma de referencia hemos usado el software SSAHA2 (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/resources/software/ssaha2/>) (Ning et al. 2001) porque permite el mapeo de lecturas que muestran alta variación con respecto a la referencia y acepta el mapeo parcial de lecturas. Esto es crucial para nuestro propósito, ya que las secuencias usadas como referencia carecen de intrones, los cuales, si están presentes en las lecturas genómicas y, de no aceptarse el mapeo parcial quedarían muchas lecturas sin mapear aun cuando tuvieran homología parcial con los extremos de los exones. En nuestro caso, aceptamos mapeos con al menos 40 nt con un 80 % de identidad mínima. Posteriormente marcamos el número de lecturas mapeadas por sitio a lo largo de la CDS usando la herramienta Pysamstats (<https://github.com/alimanfoo/pysamstats>) integrada en el script `bamm-coverage-join.py`. Además, el script `coverage-graphics.py` expresaba la cobertura de cada CDS en cada librería como el número de copias por genoma haploide usando la siguiente ecuación:

$$\text{Nº de copias} = (\text{Cobertura} \times \text{Tamaño del genoma}) / \text{Tamaño de la librería}$$

Con el fin de eliminar contigs con coberturas demasiado bajas, descartamos todos aquellos que tuvieran menos de 0.5 copias por genoma haploide en el promedio de los dos individuos con B.

Para seleccionar contigs candidatos a residir en los cromosomas B, hemos calculado primero el umbral que tendría que sobrepasar en abundancia un gen que estuviera presente en el B, suponiendo que en cada cromosoma B hubiera el mismo número de copias del gen que en cada cromosoma A. Por ejemplo, si un gen muestra una copia por cromosoma A (es decir, dos copias en un genoma diploide como los que estamos analizando), los individuos con B deberían tener un incremento en cobertura, medido por el cociente  $+B/OB$  (gFC), de:

**[(copias en As) + (copias en Bs)] / (copias en As) =  $(2+2) / 2 = 2$  copias en el 2B, y  $(2+7) / 2 = 4.5$  copias en el 7B.**

Cualquier contig que tuviese un valor de gFC mayor que estos umbrales, en los dos individuos, mostraría evidencia de estar presente en el cromosoma B.

Una vez obtenida la colección de contigs que sobrepasaban estos umbrales, realizamos su anotación con Trinotate (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>) y Blast2go (<https://www.blast2go.com/>) para quedarnos con la lista de contigs anotados. Aunque los no anotados podrían ser también interesantes, la carencia de esta información impide obtener su posible relación con las funciones biológicas que podrían ser de interés para el cromosoma B. Dado que algunos genes estaban representados por más de un contig, resumimos la información por genes y así obtuvimos la lista de genes anotados del B.

## Herramientas bioestadísticas

Los análisis estadísticos realizados para esta tesis se han llevado a cabo mediante el uso combinado del software Statistica 6.0 (StatSoft Inc.), hojas de cálculo Excel y con el software libre R versión 4.0.0 (R Development Core Team 2007) y RStudio y diferentes paquetes estadísticos desarrollados para tal efecto, como Vegan (Oksanen J et al. 2020), factorminer (Lê et al. 2008) y ggplot2 (Wickham et al. 2020).

## Referencias

Lê S, Josse J and Husson F. 2008. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*. 25(1). pp. 1-18.

- Ning Z, Cox AJ, Mullikin JC. 2001. SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res.* 11, 1725–1729.
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J. 2013. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29, 792–793.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2020. Community ecology package version 2.5-7. URL <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>
- R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing (<http://www.R-project.org>)
- Ruban A, Schmutzer T, Scholz U, Houben A. 2017. How Next-Generation Sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. *Genes*, 8(11). pii: E294. doi: 10.3390/genes8110294.
- Ruiz-Ruano, F. J., López-León, M. D., Cabrero, J., & Camacho, J. P. M. 2016. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports*, 6(January), 28333. <https://doi.org/10.1038/srep28333>
- Ruiz-Ruano FJ, Navarro-Domínguez B, López-León MD, Cabrero J, and Camacho JPM. 2019. Evolutionary success of a parasitic B chromosome rests on gene content. *BioRxiv*, 1–25. <https://doi.org/10.1101/683417>
- Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen T L, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D. 2020. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics description A system for 'declaratively' creating graphics, based on ``The Grammar of Graphics''. URL <https://ggplot2.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/ggplot2> BugReports <https://github.com/tidyverse/ggplot2/issues>

# Capítulo 1

## Long-term monitoring of B-chromosome invasion and neutralization in a population of *Prospero autumnale* (Asparagaceae)

Published as:

Lanzas P, Perfectti F, Garrido-Ramos MA, Ruíz-Rejón C, González-Sánchez M, Puertas M, Camacho JPM. 2018. Long-term monitoring of B-chromosome invasion and neutralization in a population of *Prospero autumnale* (Asparagaceae). *Evolution* 72(6):1216-1224. doi: 10.1111/evo.13501. Epub 2018 May 25. PMID: 29741266.

### Abstract

B chromosomes have been reported in about 15% of eukaryotes, but long term dynamics of B chromosomes in a single natural population has rarely been analysed. *Prospero autumnale* plants collected in 1981 and 1983 at Cuesta de La Palma population have shown the presence of B chromosomes. We analyze here seven additional samples collected between 1987 and 2015 and show that B frequency increased significantly during the 1980's and showed minor fluctuations between 2005 and 2015. A mother-offspring analysis of B chromosome transmission, at population level, showed significant drive on the male side ( $k_B = 0.65$ ) and significant drag on the female side ( $k_B = 0.33$ ), with average B transmission rate being very close to the Mendelian rate (0.5). No significant effects of B chromosomes were observed on a number of vigour and fertility-related traits. Within a parasite/host framework, these results suggest that B chromosomes' drive on the male side is the main pathway for B chromosome invasion whereas B chromosome drag on the female side might be the main manifestation of host genome resistance in this species. *P. autumnale* thus illuminates a novel evolutionary pathway for B chromosome neutralization by means of a decrease in B transmission through the non-driving sex.

**Key words:** B-chromosomes, drag, drive, invasion, neutralization

## Introduction

B chromosomes are dispensable supernumerary elements most likely derived from the standard (A) chromosomes or through interspecific hybridization (for review, see Camacho 2005). B chromosomes have been reported in more than 1200 plant species (8 % of Monocotyledones and 4% of Dicotyledones; see Jones and Rees 1982; Camacho 2005; Levin et al 2005). Their frequency in natural plant populations is associated with mating system (Burt and Trivers 1998), genome size (Trivers et al. 2004; Levin et al. 2005) or number of A chromosomes (Trivers et al. 2004).

As first suggested by Östergren (1945), B chromosomes usually behave as genome parasites, imposing deleterious costs to carriers and promoting their own transmission through a variety of non-Mendelian mechanisms (drive). The main consequence of B-drive mechanisms is an increase in population B frequency, unless severe harmful effects of B-presence on host fitness counteract them. When these effects are slight, however, rapid increase in B frequency can be observed in the course of a few tens of generations, especially when Bs are in the initial invasive stage (Camacho et al. 1997). This invasion dynamic has been reported, for instance, in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (Zurita et al. 1998; Riera et al. 2004; Camacho et al. 2015), the fish *Prochilodus lineatus* (Cavallaro et al. 2000) and the wasp *Trypoxylon albitarse* (Araújo et al. 2001, 2002). However, B chromosome invasions have never been reported in plants, as B frequency has rarely been analysed for long periods in a single natural population.

Population dynamics of B chromosomes in natural populations mainly depend on two main properties, namely inheritance (presence of drive mechanisms) and effects on carrier fitness. A frequent drive mechanism in angiosperms is mitotic non-disjunction during gametophyte formation (Jones et al. 2008). In maize, the non-disjunction takes place during the second mitosis in pollen grain formation (Roman 1947, 1948), in *Aegilops speltoides* it occurs during first pollen mitosis (Mendelson and Zohary 1972) whereas, in rye, it occurs during the first mitosis in both male and female gametophytes (see Jones et al. 2008).

In most plant species, B chromosomes are parasitic. In rye, B chromosomes show drive through male and female gametophytes, but are harmful to carriers by decreasing fertility (Jiménez et al 1994), thus being an excellent example of parasitic B chromosomes (Puertas 2002). Likewise, maize B chromosomes are also parasitic by being harmful at high numbers (Staub 1987) and showing several mechanisms of drive (Carlson and Roseman 1992; González-Sánchez et al. 2003). However, in the chive *Allium schoenoprasum* up to 20 B chromosomes are found in natural populations. These Bs are highly polymorphic, with more than 12 different types and, most importantly, they show an average transmission rate (0.39) lower than the Mendelian one, but this poor B chromosome transmission is compensated for the higher survival of B-carrying plants

between the seed and seedling stages (Plowman and Bougoud, 1994). In fact, this is one of the few well-studied B chromosome polymorphisms pointing to be beneficial for plant fitness.

According to the strength of drive mechanisms, B chromosomes in plants can be classified into three types: a) highly parasitic, showing more than one mechanism of drive, e.g. those in rye, b) moderately parasitic, showing a single drive mechanism, e.g. those in maize and *A. speltoides*, and c) heterotic, which do not show drive but a beneficial effect to carriers (Puertas 2002). In addition, the coevolution between A and B chromosomes can lead to adaptations for attack and defence in both counterparts (Frank 2000), so that B frequency does not reach stability in natural populations. This is predicted by the near-neutral model of B chromosome evolution (Camacho et al. 1997) by which B chromosome drive is suppressed by A chromosomes, with consequent temporal changes in B frequency depending on whether the population is at the “invasion”, “suppression of drive” or “near-neutral” stages. This perspective threw new light on parasitic B chromosomes, such as those in rye and maize, where evidence for A chromosome control of B transmission has been shown (Puertas 2002).

The B chromosome system in *Prospero autumnale* was analyzed in the Iberian Peninsula during 1980's (Ruiz-Rejón et al. 1980a; Ruiz-Rejón et al. 1980b; Oliver et al. 1982; Guillen and Ruiz-Rejón 1984; Parker et al. 1991), who found several B-carrying populations with a remarkable effect on the activation of an esterase gene (Ruiz Rejón et al. 1980b; Oliver et al. 1982). However, B chromosome transmission, fitness effects, and long-term frequency changes have never been analyzed. In this paper, we analyze temporal variation of B chromosome frequency in an interval of 34 years in a single population, and study B transmission and effects on vigour and fertility-related traits.

## Materials and methods

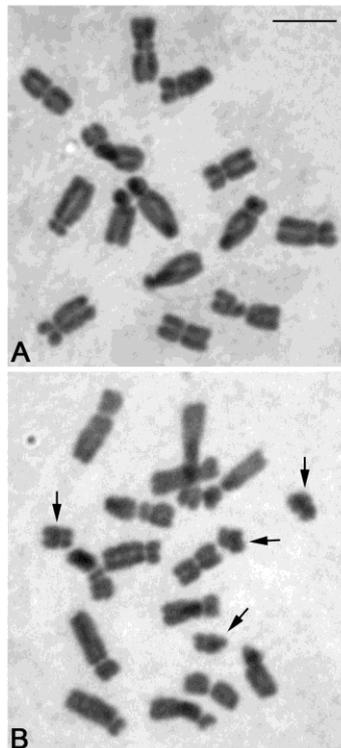
### *The Species*

*Prospero autumnale* (= *Scilla autumnalis*) (L.) Speta (Asparagaceae, Asparagales) is a perennial bulb of circummediterranean distribution than inhabits scrublands and Mediterranean woodlands (De-Yuan 1982; Ebert et al. 1996; Hamouche et al. 2010; Almeida da Silva and Crespi 2013; Almeida da Silva et al. 2014; Jang 2013). Reproduction of this plant is exclusively by seeds (Ainsworth 1980), and we never found vegetatively produced bulbs. *Prospero* (= *Scilla*) *hyacinthoides*, a close relative, showed about 13% of flowers producing seeds through experimental selfer crosses (Shtein et al. 2016). *P. autumnale* might show a similar mating system with predominant cross-fertilization.

This plant has been characterized cytogenetically (Battaglia 1957, 1963, 1964a, 1964b; De-Yuan 1982; Ebert et al. 1996; Vaughan et al. 1997; Jang et al. 2013) to show

ten chromosome races over its whole distribution area, presumably including some cryptic species (Vaughan et al. 1997). Recent cytogenetical and molecular analyses have reduced these ten races to only four diploid and four polyploid cytotypes (Jang et al. 2013). Four of these cytotypes have been found in the Iberian Peninsula: two diploid ( $2n=14$ , named AA and  $B^7B^7$ ) and two tetraploid ( $2n=28$ , the allotetraploid  $AAB^7B^7$  and the autotetraploid  $B^7B^7B^7B^7$ ; Parker et al. 1991). The AA cytotype is present only in the Iberian Peninsula and North Africa (Jang et al. 2013), the western distribution of this species, probably as results of Pleistocene glaciations (Jang et al. 2013). The AA cytotype shows a karyotype consisting of five submetacentric chromosome pairs (no. 1, 2, 3, 5 and 6), one subtelocentric pair (no. 4) and a smaller near-metacentric pair (no. 7), with  $7.85 \pm 0.045$  pg 1C DNA content and a single nucleolus organizer region (NOR) located adjacent to the centromere on the long arm of chromosome 3.

In addition to the normal karyotype, many natural populations of *Prospero autumnale* harbour B chromosomes, which constitute a highly widespread polymorphism within the Iberian Peninsula (Ruiz-Rejón et al. 1980a, 1980b; Parker et al. 1991). All individuals analyzed here showed the AA diploid cytotype ( $2n=14$ ), with 0-8 B chromosomes per plant. These B chromosomes were metacentric and smaller than the standard (A) chromosomes (Fig. 1), as previously reported by Ruiz Rejón et al. (1980a,b).



**Figure 1.1.** Mitotic metaphase cells from 0B (A) and 4B (B) plants. Note that B chromosomes (arrows) are conspicuously smaller than A chromosomes. Bar in A represents 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Plant sampling***

We collected complete fruit-carrying plants during autumn of 1987, 2005, 2006, 2012, 2013, 2014, and 2015 in Cuesta de La Palma (Loja, Granada, Spain), a population sited at 761 m asl, (37° 7′ 6.73″ N; 4° 17′ 0.90″ W) in a Mediterranean scrubland landscape.

### ***Determination of B chromosome number***

Bulbs were submitted to hydroculture until yielding 1 cm long roots, which were cut and immersed into 0.05% colchicine solution for 4 h. The roots were then fixed in 3:1 ethanol-acetic acid solution and stored at 4° C. For chromosome analysis, the roots were immersed into 1N HCl for 1 min, and then in 2% acetic orcein for 15 min. They were then washed in 45% acetic acid and the tip meristem of each root was used to make a squash preparation in a drop of 2% of acetic orcein.

To analyze chromosome number in seeds, they were germinated in petri dishes on humid filter paper at room temperature at a naturally illuminated area of the laboratory avoiding direct sunlight. When seed roots reached about 5 mm, they were cut and processed as bulb roots.

### ***Parameters measuring B chromosome frequency***

Three parameters of B chromosome frequency were calculated for each population sample. Namely, prevalence (the proportion of B-carrying individuals), mean (the average number of B chromosomes) and load (the mean number of B chromosomes in the B-carrying individuals). The relationship between the three parameters is quite simple, as mean is equal to prevalence times load (Camacho 2005). To get a longer scope of B chromosome evolution in Cuesta de la Palma population, we also included two samples from this same population analyzed in 1981 (Oliver et al. 1982) and 1983 (Guillén and Ruiz-Rejón 1984). In the 1981 sample, the B chromosomes found showed mitotic instability and the authors only scored the presence/absence of B chromosomes, for which reason only B prevalence can be calculated. In the 1983 sample, mitotic instability was observed only in five out of the 24 B-carrying plants, and we assigned them a number of B chromosomes coinciding with the median B number observed among the roots analyzed per individual (i.e. four 1B and one 3B individuals), as is usually done for mitotically unstable B chromosomes (see Pardo et al. 1995). No mitotic instability of B chromosomes was observed in the subsequent samples analyzed.

### ***B chromosome transmission at population level***

The average transmission of the B chromosome on the male and female sides was analyzed by a mother-offspring analysis of 95 plants collected in 2012. Christiansen and Frydenberg (1973) and Christiansen et al. (1973) showed that analyzing a single offspring from each mother is sufficient to get reliable estimates of average transmission rates at population level. However, several offspring per mother have been analyzed in other cases (eg. Nur 1977; Camacho et al. 1997). For the present research, we analyzed 347

seeds from the 95 plants collected in 2012, i.e. 3.65 seeds per plant on average. The number of B chromosomes in the seeds from each plant were averaged, and the latter values were averaged per type of plant carrying from 0 to 8 B chromosomes. This way, the same weight was given to each individual plant for these calculations.

The frequency of B chromosomes found among the offspring of OB plants, divided by B frequency in the 95 plants, provided an estimate of the average transmission ratio of the B chromosome through the male side at population level. Assuming random mating, we can calculate the B transmission rate through the female side by subtracting the B frequency observed in the progeny of OB plants to the frequency observed in each class of B-carrying plants (which corresponds to those Bs arrived through the pollen) and dividing by the number of Bs carried by the plant. This can also be done for the whole set of B-carrying plants by using the weighed mean number of B chromosomes in the B-carrying mothers and their offspring.

### ***Analysis of pollen fertility***

In 2012, we collected pre-anthesis inflorescences from 15 plants (eight OB, two 1B, four 3B and one 4B). They were fixed in 3:1 ethanol-acetic acid within glass tubes, at 4 ° C, replacing several times for freshly prepared fixative. To get estimates of pollen fertility, we analyzed 8 inflorescences (three OB, two 1B, two 3B and one 4B) by means of Alexander's staining (Alexander 1980), which allows differentiating between fertile and infertile pollen grains under the optical microscope.

### ***Vigour and fertility-related traits***

We measured five vigour traits in the sample of 2005. Namely, the number of scapes per plant, the length of the part of the scape lacking flowers (scape length), inflorescence length, pedicel length and bulb diameter, as well as three fertility-related traits, namely the number of fruits, the number of seeds and mean seed weight, and also the seed/fruit ratio. In 2012, we measured the same traits mentioned above plus the number of leaves, the number of flowers and the fruits/flowers ratio.

### ***Statistical procedures***

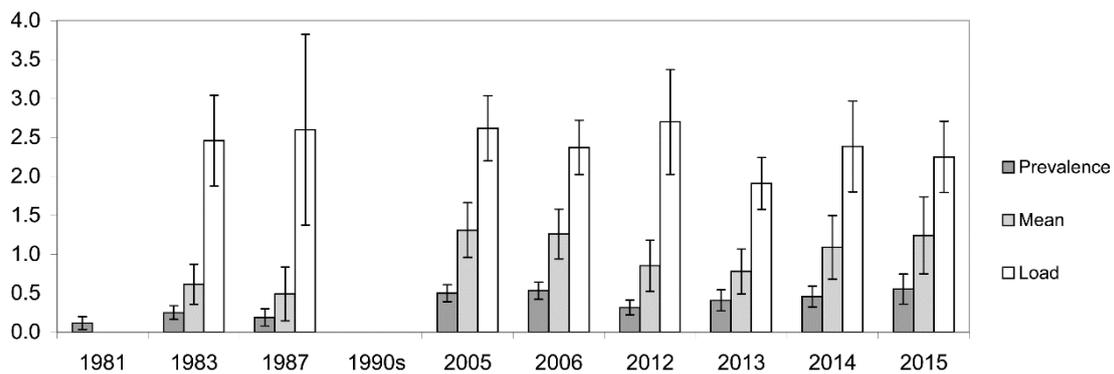
Temporal changes in B frequency were analyzed by means of One-Way ANOVA, followed by post-hoc LSD comparisons. Transmission rate of B chromosomes was compared with the Mendelian rate (0.5) by means of the Z-test (approximation of a binomial to normal distribution) (López-León et al. 1992; Pardo et al. (1994), using the equation  $Z = (k_B - 0.5) / (0.25/N)^{0.5}$ , where  $k_B$  is the observed transmission rate and  $N$  is the number of seeds analyzed. If  $Z > 1.96$  or  $Z < -1.96$  the null hypothesis is rejected, indicating significant B accumulation and B elimination, respectively. For the analysis of B chromosome phenotypic effects, all vigour and fertility-related traits were transformed to natural logarithms, and comparisons between B-carrying and B-lacking classes were performed by the Student t-test and One-Way ANOVA. Pollen viability was

compared between B-carrying and B-lacking plants by the Student t-test, and seed survival was compared by a contingency  $\chi^2$  test. Type-I errors were minimized by the Bonferroni-Holm method (Holm 1979).

## Results

### *Evolution of B chromosome frequency across a 34-year period*

We sampled the Cuesta de la Palma population at seven different years between 1987 and 2015. To analyze temporal variation in B frequency for a longer period (1981-2015), the following analyses also include the 1981 sample for prevalence analysis and the 1983 sample for prevalence, mean and load analyses (Fig. 2, Table S1). We found individuals with 0-8 B chromosomes, and noticed significant changes in B frequency along the 1983-2015 period, which were apparent for prevalence (One-Way ANOVA:  $F=7.20$ ,  $df=8, 601$ ,  $P<0.000001$ , Bonferroni-Holm:  $P_b<0.000003$ ) and mean ( $F=3.27$ ,  $df=7, 541$ ,  $P=0.0021$ ,  $P_b=0.0042$ ) but not for load ( $F=0.85$ ,  $df=7, 205$ ,  $P=0.5464$ ). Post-hoc comparisons (Table S2) showed a significant increase in B prevalence and mean frequency between 1987 and 2005 (Fig. 2), whereas B prevalence significantly decreased between 2006 and 2012 and increased between 2012 and 2015. Taken together, these results showed temporal changes in B frequency in Cuesta de la Palma population, with 2.6 fold increase between 1987 and 2005 in prevalence and mean, and 40% decrease in B prevalence between 2006 and 2012.



**Figure 1.2.** Changes in B chromosome frequency observed in Cuesta de la Palma population between 1983 and 2015, measured as prevalence (the proportion of B-carrying individuals), mean (the mean number of Bs per individual), and load (the mean number of Bs per B-carrying individual). Error bars indicate 95% confidence intervals.

Remarkably, no changes were found for B-load during the whole period, suggesting that the population reached equilibrium for this parameter. This might result from selection against individuals carrying many B chromosomes. In fact, individuals with more than four B chromosomes were actually rare in most samples (Table S1). This is also evidenced by the lower coefficient of variation (CV) shown by B-load among years (10%) compared to those of prevalence (35%) and mean (34%).

### ***B chromosome transmission at population level***

Assuming random mating, the mean number of B chromosomes found among the seeds yielded by B-lacking plants (0.55, Table 1) indicates the average frequency of Bs transmitted through the male side in the natural population. The ratio between this figure and mean B frequency in the 95 plants (0.85, Table 1) yields the average B transmission rate through the male side ( $k_B = 0.65$ ), which was significantly higher than the Mendelian rate (0.5) thus revealing the existence of drive through the male side (Table 1). On the other hand, the B transmission rate on the female side can be inferred in B-carrying plants by subtracting the 0.55 Bs transmitted through the male side to the mean B frequency observed in each class of B-carrying plants. This revealed a tendency to B chromosome elimination through the female side, which was significant in 1B plants (Table 1). Additional joint analysis of the 30 B-carrying plants showed an average transmission rate ( $k_B = 0.33$ ) being significantly lower than the Mendelian one (Table 1). Due to the presence of only one plant belonging to the 5B, 7B and 8B classes, we performed this same analysis on plants carrying 1-4 B chromosomes, which still showed significant drag of B chromosomes on the female side (Table 1). Remarkably, B elimination was higher in plants carrying odd number of B chromosomes.

The mean transmission rate through both sexes  $(0.65+0.33)/2 = 0.49$  was, however, very close to the Mendelian one, indicating that B chromosome drive through the male side is counteracted by a similar amount of B chromosome drag through the female side. This explains the high resemblance between the weighted mean number of B chromosomes in plants (0.85) and seed offspring (0.83) (Table 1), and is consistent with the absence of differences in B chromosome prevalence or mean between 2012 and 2013 (Table S2).

**Table 1.1.** Mother-offspring analysis of B chromosome transmission at population level. Bm= Number of B chromosomes in the mother, Nm= Number of mothers, Ns= Number of seed offspring, Bs= Mean number of B chromosomes in the seed offspring, kB= B transmission rate, Z= Z test (significant when  $1.96 < Z < -1.96$ ). In B-lacking plants, kB was calculated as the quotient between Bs and the mean number of Bs in the 95 mothers analyzed (0.85), and this represents B transmission rate through the male side. In B-carrying plants, we estimated kB through the female side by subtracting Bs in B-lacking bulbs (0.55) to Bs in the B-carrying mother type, and dividing by the corresponding Bm. In case of joint estimations for B-carrying plants, as a whole, we used weighed means taking into account the number of bulbs into each B-number class. Note that kB indicated significant drive through pollen but significant drag through the ovum. Significant Z values are in bold-type letter, and indicate B drive when positive or B drag when negative.

Item	Bm	Nm	Ns	Bs	kB	Z	Net	via
B-lacking plants	0	65	236	0.55	0.65	<b>4.48</b>	drive	male
B-carrying plants	1	9	35	0.86	0.31	<b>-2.27</b>	drag	female
	2	9	29	1.42	0.43	-0.72		female
	3	2	6	1.25	0.23	-1.31		female
	4	7	29	2.20	0.41	-0.94		female
	5	1	3	2.67	0.42			female
	7	1	3	0.00	-0.08			female
	8	1	6	1.50	0.12			female
Total	0.85	95	347	0.83				
Plants with 1-8 Bs	2.7	30	111	1.44	0.33	<b>-3.62</b>	drag	female
Plants with 1-4 Bs	2.3	27	99	1.00	0.39	<b>-2.13</b>	drag	female

### ***No effects of B chromosomes on vigour and fertility-related traits***

We measured and scored several vigour and fertility-related traits (fruit and seed production) in 2005 and 2012 to compare between years and between B-carrying and B-lacking individuals. A comparison of these plant traits between B-carrying and B-lacking individuals showed absence of significant differences in both years (analyzed separately) (Tables 2 and S3). We also analyzed pollen viability in three B-lacking plants as well as two with 1B, two with 3B and one with 4B, collected in 2012 (Table S4). The results did not show significant differences associated with B chromosome presence ( $t=0.18$ ,  $df=6$ ,  $P=0.86$ ), with pollen viability being very close to 95% in both B-carrying and B-lacking plants.

**Table 1.2.** Comparison of vigour and fertility-related traits between B-carrying (+B) and B-lacking (OB) plants. *t*= Student *t* test, *df*= degrees of freedom, *Pb*= *P*-value corrected by the Bonferroni-Holm method (see full data set in Table S3)

	Mean OB	Mean +B	N OB	N +B	<i>t</i>	<i>df</i>	<i>P</i>	<i>Pb</i>
<b>2005</b>								
Number of scapes	0.02	0.07	40	42	-1.33	80	0.188	
Scape length	5.07	5.10	39	42	-0.42	79	0.673	
Inflorescence length	3.97	3.97	39	42	-0.04	79	0.972	
Pedicel length	2.44	2.33	38	39	1.53	75	0.130	
Bulb diameter	2.22	2.22	40	42	0.05	80	0.963	
Number of fruits	1.90	1.74	39	42	1.01	79	0.316	
Number of seeds	2.23	2.10	36	36	0.63	70	0.531	
Seeds/Fruits	0.25	0.22	36	36	0.20	70	0.839	
Mean seed weight	-6.51	-6.49	34	26	-0.10	58	0.920	
<b>2012</b>								
Number of scapes	0.06	0.12	65	30	-1.05	93	0.297	
Scape length	4.82	4.75	65	30	1.56	93	0.122	
Inflorescence length	4.27	4.19	65	30	1.13	93	0.260	
Pedicel length	2.44	2.40	65	30	0.87	93	0.386	
Bulb diameter	2.03	1.93	65	30	2.02	93	0.047	0.420
Number of fruits	2.28	2.23	65	30	0.42	93	0.678	
Number of seeds	3.22	3.19	65	30	0.18	93	0.860	
Seeds/Fruits	0.94	0.96	65	30	-0.28	93	0.781	
Mean seed weight	-6.53	-6.62	65	30	0.97	93	0.333	

Finally, a comparison between the number of seeds with different number of B chromosomes, yielded by plants collected in 2012, and the number of plants collected in 2013 (Table S5), was consistent with absence of B chromosome effects on seed or seedling survival (contingency  $\chi^2= 0.16$ , *df*= 3, *P*= 0.98).

## Discussion

Temporal changes in B frequency in natural populations have been witnessed in several instances and, in some cases, it was possible to identify the causal factors producing them. For example, in the grasshopper *E. plorans*, the B<sub>24</sub> variant arose in the Torrox population (Málaga, Spain) as a derivative of the B<sub>2</sub> variant, which is the predominant B variant in all surrounding populations. In only eight years, between 1984 and 1992, B<sub>24</sub> frequency increased swiftly in this population, leading to the almost complete replacement of B<sub>2</sub>. Controlled crosses demonstrated significant drive for B<sub>24</sub> through females, which suggested that B variant replacement had taken place thanks to this B<sub>24</sub> property (Zurita et al. 1998), which was absent in B<sub>2</sub> (López-León et al. 1992). Other examples of dramatic increases in B frequency, typical of an invasion period, were later reported in *E. plorans* from the Mallorca island (Riera et al. 2004) and from the Otivar population in the South of the Iberian Peninsula (Camacho et al. 2015), the Brazilian fish

*P. lineatus* (Cavallaro et al. 2000), and the Brazilian wasp *T. albitarse* (Araújo et al. 2001, 2002). However, no similiares cases of temporal changes in B frequency have been reported in natural populations of plants.

In all cases, B frequency seemed to reach a maximum for prevalence and load. For instance, in the grasshopper *E. plorans*, the natural population where B chromosomes reached the highest frequency was Torrox (Málaga, Spain) just after B chromosome invasion (Zurita et al. 1998). The invading B<sub>24</sub> variant showed prevalence values fluctuating among years (0.722 in 1992, 0.827 in 1994, 0.782 in 1998 and 0.826 in 2000; Manrique-Poyato 2010), suggesting that B frequency reached such a limit in 1994 and 2000. Load also fluctuated among these years (1.35, 1.86, 1.34 and 1.63, respectively), also suggesting the existence of a maximum for this parameter. Likewise, B prevalence and B load showed remarkable changes among years in the Cuesta de la Palma population of *P. autumnale*. The lowest value of prevalence was recorded in 1981 (0.11) but it increased to 0.50 in 2005, being this last value close to the upper values observed in subsequent years. This divides the study period into two well differentiated stages: the invasion stage during the 1980's, and the near-neutral stage during the 2000's. The rapid invasion of B chromosomes was most likely facilitated by the predominantly cross-fertilizing mating system of *P. autumnale*, in consistency with predictions by Burt and Trivers (1998). Comparisons between consecutive samples revealed two significant changes in B prevalence in this population, one between 1987 and 2005 (frequency increase) and the other between 2006 and 2012 (frequency decrease). The frequency increase appeared to be caused by completion of the invasion stage at some point between 1987 and 2005, whereas the frequency decrease between 2006 and 2012 was a characteristic fluctuation of the near-neutral stage. However, no significant differences were observed for B-load during the whole period analyzed, with only slightly fluctuating values from 1.91 in 2013 to 2.70 in 2012. This indicates that B-load cannot increase beyond a threshold, which in *P. autumnale* is clearly higher than in *E. plorans* presumably because the former species shows higher tolerance to B chromosomes, as indicated by the absence of effects on vigour and fertility-related traits reported here, which contrasts with B chromosome effects decreasing female fertility in *E. plorans* (Zurita et al. 1998). As Table S1 shows, *P. autumnale* plants with 5B and 6B were observed in 1983 and 1987, respectively, when prevalence was still low, and this maximum was about the same in the 2005 and 2006 samples, with double values for prevalence.

The male drive mechanism of B chromosomes in *P. autumnale* most likely favours even numbers of B chromosomes resulting in the frequency of karyomorphs with even number of B chromosomes being higher than the immediately lower odd number (see Table S1). For instance, the frequency of 2B plants was higher than that of 1B ones in 2005, 2006, 2013, 2014 and 2015. This resembles the situation in other plant species showing higher frequency of even than odd B chromosome numbers. An

extreme case is rye, where the frequency of plants with odd numbers is very low (see Romera et al. 1991) which is the consequence of B-drive mechanisms involving the directed non-disjunction of B chromosomes to the sperm and egg nuclei during gametophytic post-meiotic mitoses (see Jones and Rees 1982). In *Aegilops speltoides*, plants from Haifa showed a B frequency pattern similarly biased toward even numbers (Cebriá et al. 1995) and B chromosomes show drive on the male side only (Mendelson and Zohary 1972). Therefore, it is conceivable that the drive mechanism in *P. autumnale* involves directed non-disjunction of the B chromosome on the male side.

Our present results shed new light on possible mechanisms explaining the observed changes in B frequency in *P. autumnale* over the 34 years period analyzed here. On the one hand, B chromosomes appear to have little effect on external phenotype and they infringe no harmful effects on fertility-related traits such as pollen fertility, fruit and seed production, or seed survival. Bearing in mind that the two samples analyzed (in 2005 and 2012) most likely belonged to the near-neutral stage, it would be tempting to speculate that selection for more tolerant plants, during the previous invasion stage, would help to explain the absence of B effects in these samples. However, the fact that B-load reached similar values across the whole period monitored, including the invasion stage, runs against this possibility. On the other hand, our mother-offspring analysis has shown the existence of significant drive through the male side and significant drag on the female side, with average transmission rate (0.49) very close to the Mendelian one (0.5), predicting no change in B chromosome frequency between 2012 and 2013, in consistency with the B-frequency analysis (see Table S2).

Taken together, the former results are consistent with the near-neutral model of B chromosome evolution described for the grasshopper *E. plorans* (Camacho et al. 1997). The absence of net drive and presence of temporal fluctuations in B frequency reflect the near-random walk resulting from drive suppression, with fluctuations mostly due to drift, although some selection against high B numbers cannot be ruled out (Camacho et al. 1997). The main difference with *E. plorans* is that drive suppression in this grasshopper takes place in the driving sex (i.e., the female), whereas B chromosome drive in *P. autumnale* is still operating through the male side ( $k_B = 0.65$ ). Remarkably, B chromosomes showed very low transmission rate through the female side ( $k_B = 0.33$ ), yielding a net B chromosome transmission ( $k_B = 0.49$ ) being highly consistent with B chromosome neutralization ( $k_B = 0.50$ ). Notwithstanding, the clear tendency to B chromosome frequency increase during the '80s is incompatible with the current  $k_B$  values observed in both sexes, as B chromosome initial invasion needs either net B drive (parasitic model) or an increase in host fitness associated to B presence at low numbers (heterotic model) (Camacho et al. 1997), and none of these features were observed in the 2000s. A possible explanation is that, in *P. autumnale*, host genome defence has taken place by decreasing  $k_B$  through females instead of by suppressing drive through

males. Unfortunately, this hypothesis cannot be tested in Cuesta de La Palma population, because it would have required another mother-offspring analysis in the 1980s. However, it could be done in other populations showing low B chromosome frequency (i.e., with prevalence below 20 %), as B invasion could be starting in them, so that temporal changes in male drive and/or female drag could be investigated by mother-offspring analysis in the invasion and neutralization stages. This is an interesting prospect for future research.

The near-neutral model predicts a host's response to B chromosome invasion in form of the increase in frequency of host genes able to suppress B drive, a process leading the system towards a near-neutral random walk. Evidence for genes suppressing B chromosome drive has been reported in plants like rye (Jiménez et al. 1995,1997) and maize (González-Sánchez et al. 2003), as well as in animals (Shaw and Hewitt 1985; Shaw et al. 1985; Nur and Brett 1985, 1987; Herrera et al. 1996). The case of *P. autumnale* shows a new face for the arms race between parasitic and host chromosomes as B chromosome neutralization appears to have taken place in the non-driving sex, i.e. the female side. The fact that transmission rate on the female side was lower in plants with odd number of Bs suggests the possibility that B-univalents tend to be lost in polar bodies during female meiosis, so that allelic variants in the host genome promoting this tendency would be selected for during B invasion. Given that drive through the male side was still apparent in 2012, it is conceivable that drive suppression in this species is still evolving, for which reason we observed significant increases and decreases in B frequency at different years, depending on the relative strength of male drive and female drag.

## References

- Ainsworth, C. C. 1980. The population cytology of *Scilla autumnalis*. PhD Queen Mary University of London.
- Alexander, M. P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi yeast and bacteria. *Stain Technol.* 55: 13-18.
- Almeida da Silva, R. M. and A. L. Crespi. 2013. *Scilla L.* In: Castroviejo, S. et al (eds). *Flora Ibérica* 20: 145-156. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Almeida da Silva, R., J. Rocha, A. Silva, I. García-Cabral, F. Amich, and A. L. Crespi. 2014. The Iberian species of *Scilla* (Subfamily Scilloideae, Family Asparagaceae) under climatic change scenarios in Southwestern Europe. *Syst. Bot.* 39: 1083-1098.
- Araújo, S. M. S. R., S. G. Pompolo, F. Perfectti, J. P. M. Camacho. 2001. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 1127–1131.

- Araújo, S. M. S. R., S. G. Pompolo, F. Perfectti, J. P. M. Camacho. 2002. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1475–1478.
- Battaglia, E. 1957. *Scilla autumnalis* L.: Biotipi 2n, 4n, 6n e loro distribuzione geografica. *Caryologia* 10: 75-95.
- Battaglia, E. 1963. Una mutazione con B-cromosomi,  $2n = 14 + 3b$ , in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae). *Caryologia* 16: 609-618.
- Battaglia, E. 1964a. Un secondo caso di B-cromosomi ( $2n = 14 + 6-8B$ ) in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) proveniente dalla Palestina, *Caryologia* 17: 65-76.
- Battaglia, E. 1964b. *Scilla autumnalis* L.: Nuovi reperti di biotipi cariologici 2n, 4n, 6n, *Caryologia* 17: 557-565.
- Burt, A. and R. Trivers. 1998. Selfish DNA and breeding system in flowering plants. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 141-146.
- Camacho, J. P. M. 2005. B chromosomes. In: Gregory TR (ed): *The Evolution of the Genome*, pp 223–286. Elsevier, San Diego.
- Camacho, J. P. M., M. W. Shaw, M. D. López-León, M. C. Pardo, and J. Cabrero. 1997. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am. Nat.* 149: 1030–1050.
- Camacho, J. P. M., M. W. Shaw, J. Cabrero, M. Bakkali, M. Ruíz-Estévez, F. J. Ruíz-Ruano, R. Martín-Blázquez, M. D. López-León. 2015. Transient microgeographic clines during B chromosome invasion. *Am. Nat.* 186: 675–681.
- Carlson, W. R., and R. R. Roseman. 1992. A new property of the maize B chromosome. *Genetics* 131: 211–223.
- Cavallaro, Z. I., L. A. C. Bertollo, F. Perfectti, J. P. M. Camacho. 2000. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Res.* 8: 627–634.
- Cebria, A., M. L. Navarro, and M. J. Puertas. 1995. The effect of B chromosomes on fitness components in *Aegilops speltoides* Tausch. *Genetica* 96: 199-205.
- Christiansen, F. B., and O. Frydenberg. 1973. Selection component analysis of natural populations using population samples including mother-offspring combinations. *Theor. Pop. Biol.* 4:425–445.
- Christiansen, F. B., O. Frydenberg, and V. Simonsen. 1973. Genetics of *Zoarces* populations IV. Selection component analysis of an esterase polymorphism using population samples including mother-offspring combinations. *Hereditas* 73: 291–304.
- De-Yuan, H. 1982. Cytotype variation and polyploidy in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae). *Hereditas* 97: 227-235.

- Ebert, I., J. Greilhuber, and F. Speta. 1996. Chromosome banding and genome size differentiation in *Prospero* (Hyacinthaceae): diploids. *Plant Syst. Evol.* 203:143-177.
- Frank, S. A. 2000. Polymorphism of attack and defense. *Trends Ecol. Evol.* 15:167-171.
- González-Sánchez, M., E. González-González, F. Molina, A. M. Chiavarino, M. Rosato, and M. J. Puertas. 2003. One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90: 122–129.
- Guillen, A., and M. Ruiz-Rejón. 1984. Structural variability and chromosome number variation in natural population of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Plant Syst. Evol.* 144:201-207.
- Hamouche, Y., N. Amirouche, M. T. Misset, and R. Amirouche. 2010. Cytotaxonomy of autumnal flowering species of Hyacinthaceae from Algeria. *Plant Syst Evol* 285:177–187.
- Herrera, J., M. D. López-León, J. Cabrero, M. W. Shaw, and J. P. M. Camacho. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 76: 633–639.
- Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6: 65–70.
- Jang, T. S, K. Emadzade, J. Parker, E. M. Temsch, A. R. Leitch, F. Speta, H. Weiss-Schneeweiss. 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evol. Biol.* 13: 136.
- Jang, T. S. 2013. Chromosomal evolution in *Prospero autumnale* complex. PhD Dissertation. Wien University.
- Jiménez, M. M., F. Romera, M. J. Puertas, and R. N. Jones. 1994. B-chromosomes in inbred lines of rye (*Secale cereale* L.) I. Vigour and fertility. *Genetica* 92: 149-154.
- Jiménez, M. M., F. Romera, A. Gallego, and M. J. Puertas. 1995. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. II. 0B x 2B crosses. *Heredity* 74: 518–523.
- Jiménez, M. M., F. Romera, M. González-Sánchez, and M. J. Puertas. 1997. Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. III. Male meiosis and gametogenesis. *Heredity* 78: 636–644.
- Jones, R. N., and H. Rees. 1982. B chromosomes. Academic Press, London
- Jones, R. N., M. González-Sánchez, M. González-García, J. M. Vega, and M. J. Puertas. 2008. Chromosomes with a life of their own. *Cytogenet. Genome Res.* 120: 265-280.
- Levin, D. A., B. G. Palestis, R. N. Jones, and R. Trivers. 2005. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution* 59: 962–969.
- López-León, M. D., J. Cabrero, J. P. M. Camacho, M. I. Cano, and J. L. Santos. 1992. A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. *Evolution* 46: 529–539.

- Manrique-Poyato, M. I. 2010. Dinámica espacial y temporal de los cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*. PhD Universidad de Granada, Spain.
- Mendelson, D., and D. Zohary. 1972. Behaviour and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. *Heredity* 29: 329-339.
- Nur, U. 1977. Maintenance of a "parasitic" B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Genetics* 87: 499–512.
- Nur, U., and B. L. Brett. 1985. Genotypes suppressing meiotic drive of a B chromosome in the mealybug *Pseudococcus obscurus*. *Genetics* 110: 73-92.
- Nur, U., and B. L. Brett. 1987. Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealybug *Pseudococcus affinis (obscurus)*. *Genetics* 115: 499-510.
- Oliver, J. L., F. Posse, J. M. Martínez-Zapater, A. M. Enríquez, and M. Ruiz-Rejón. 1982. B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosoma* 85: 399-403.
- Östergren, G. 1945. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot Notiser* 2: 157–163.
- Pardo, M. C., M. D. López-León, J. Cabrero, and J. P. M. Camacho. 1994. Transmission analysis of mitotically unstable B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Genome* 37: 1027–1034.
- Pardo, M. C., M. D. López-León, E. Viseras, J. Cabrero, and J. P. M. Camacho. 1995. Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. *Heredity* 74: 164–169.
- Parker, J. S., R. Lozano, S. Taylor, and M. Ruiz-Rejón. 1991. Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. *Heredity* 67: 287–297.
- Puertas, M. J. 2002. Nature and evolution of B chromosomes in plants: A non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 96: 198-205.
- Plowman, A. B., and S. M. Bougourd. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72: 587–593.
- Riera, L., E. Petitpierre, C. Juan, J. Cabrero, and J. P. M. Camacho. 2004. Evolutionary dynamics of a B-chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J. Evol. Biol.* 17: 716–719.
- Roman, H. 1947. Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. *Genetics* 32: 391-409.
- Roman, H. 1948. Directed fertilization in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 34: 36-42.
- Romera, F., M. M. Jiménez, and M. J. Puertas. 1991. Factors controlling the dynamics of the B chromosome polymorphism in Korean rye. *Heredity* 67: 189-195.
- Ruiz-Rejón, M., J. L. Oliver, and C. Ruiz-Rejón. 1980a. Variabilidad cromosómica en *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) de la Península Iberica. *Bol. Soc. Brot. Sér. 2*, 53: 555-562.

- Ruiz-Rejón, M., F. Posse, and J. L. Oliver. 1980b. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae): effects at the isozyme level. *Chromosoma* 79: 341-348.
- Shaw, M. W., and G. M. Hewitt. 1985. The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity* 54: 187-194.
- Shaw, M. W., G. M. Hewitt, and D. A. Anderson. 1985. Polymorphism in the rate of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 55: 61-68.
- Shtein, I., T. Noy-Porat, and A. Eshel. 2016. Life cycle and reproductive botany of *Scilla hyacinthoides*, a Mediterranean geophyte. *Sci Hortic* 201: 167–174.
- Staub, R. W. 1987. Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *J. Hered.* 78: 71–74.
- Trivers, R., A. Burt, and B. G. Palestis. 2004. B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome* 47: 1-8.
- Vaughan, H. E., S. Taylor, and J. S. Parker. 1997. The ten cytological races of the *Scilla autumnalis* species complex. *Heredity* 79: 371-379.
- Zurita, S., J. Cabrero, M. D. López-León, and J. P. M. Camacho. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274–277.

## Supporting information

**Table S1.1.** Frequency of B chromosomes observed in Cuesta de la Palma population between 1981 and 2015, measured as B-prevalence (the proportion of B-carrying individuals), B-mean (the mean number of Bs per individual), and B-load (the mean number of Bs per B-carrying individual). CI= Confidence interval. Note that the 1981 sample was taken from Oliver et al. (1982) and B frequency was expressed as presence/absence. The sample of 1983 was analyzed by Guillén and Ruiz-Rejón (1984).

**Table S1.2.** Pos-hoc comparisons after ANOVAs performed on temporal changes for B chromosome prevalence (upper half-matrix) and mean (lower half-matrix) in La Palma population of *Prospero autumnale*. P-values lower than 0.05 are shown in bold.

**Table S1.3.** Full data set of vigour and fertility-related traits measured in *P. autumnale* plants from Cuesta de la Palma population

**Table S1.4.** Full data set for pollen fertility analysis in *P. autumnale* plants from Cuesta de la Palma population

**Table S1.5.** Comparison of B frequency between the seeds yielded by plants in 2012 and those analyzed in 2013. The absence of significant differences ( $\chi^2= 0.16$ ,  $df= 3$ ,  $P= 0.96$ ) indicates the absence of B chromosome effects on seed survival, although with the caveat that some of the 2013 plants could have been derived from seeds produced before 2012 because of overlapping generations.

**Table S1.1.** Frequency of B chromosomes observed in Cuesta de la Palma population between 1981 and 2015, mean proportion of B-carrying individuals), B-mean (the mean number of Bs per individual), and B-load (the mean number of B chromosomes per individual). CI= Confidence interval. Note that the 1981 sample was taken from Oliver et al. (1982) and B frequency presence/absence. The sample of 1983 was analyzed by Guillén and Ruiz-Rejón (1984).

Year	Number of B chromosomes								Total	B-Prevalence			B-Mean			
	0	1	2	3	4	5	6	7		8	Mean	CI -95%	CI +95%	Mean	CI -95%	CI +95%
1981	54				7					61	0.11	0.03	0.20			
1983	72	9	4	3	7	1	0	0	0	96	0.25	0.16	0.34	0.61	0.36	0.87
1987	43	4	1	2	2	0	1	0	0	53	0.19	0.08	0.30	0.49	0.15	0.84
2005	42	8	16	9	3	5	1	0	0	84	0.50	0.39	0.61	1.31	0.96	1.66
2006	38	10	17	8	6	2	0	0	0	81	0.53	0.42	0.64	1.26	0.94	1.58
2012	65	9	9	2	7	1	0	1	1	95	0.32	0.22	0.41	0.85	0.52	1.18
2013	32	7	10	5	0	0	0	0	0	54	0.41	0.27	0.54	0.78	0.49	1.07
2014	31	7	11	3	3	1	0	1	0	57	0.46	0.32	0.59	1.09	0.68	1.50
2015	13	2	10	2	2	0	0	0	0	29	0.55	0.36	0.74	1.24	0.75	1.74

**Table S1.2.** Pos-hoc comparisons after ANOVAs performed on temporal changes for B chromosome prevalence and mean (lower half-matrix) in La Palma population of *Prospero autumnale*. P-values lower than 0.05 are shown in bold.

Year	1983	1987	2005	2006	2012	2013	2015
1981	0.074392	0.394633	<b>0.000001</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.008229</b>	<b>0.000747</b>	<b>0.000000</b>
1983		0.438423	<b>0.000318</b>	<b>0.000063</b>	0.325660	<b>0.045698</b>	<b>0.000000</b>
1987	0.611921		<b>0.000136</b>	<b>0.000032</b>	0.109183	<b>0.014659</b>	<b>0.000000</b>
2005	<b>0.001192</b>	<b>0.001143</b>		0.668176	<b>0.007989</b>	0.251147	0.580000
2006	<b>0.002888</b>	<b>0.002419</b>	0.821215		<b>0.002184</b>	0.128889	0.350000
2012	0.249747	0.139658	<b>0.033059</b>	0.060191		0.245193	0.070000
2013	0.501865	0.298588	<b>0.033175</b>	0.055421	0.758464		0.570000
2014	<b>0.047989</b>	<b>0.028802</b>	0.365678	0.487350	0.326117	0.253447	
2015	<b>0.038739</b>	<b>0.023182</b>	0.824692	0.953869	0.199862	0.158956	0.630000

**Table S1.3.** Full data set of vigour and fertility-related traits measured in *P. autumnale* plants from Cuesta de la Palma popula

Year	Id no.	Number of Bs	Number of scapes	Scape length	Inflorescence length	Pediculum length	Bulb diameter	Number of fruits	Number of seeds	See
2005	98	0	1	149.2	59.2	11.4	9.0	9	7	0
2005	2	0	1	282.6	146.9	12.9	13.6	25	40	1
2005	3	0	1	273.1	110.2	16.2	12.2	9	11	1
2005	4	0	1	196.9	67.7	15.8	10.3	13	15	1
2005	100	0	1	156.4	28.2	10.4	6.7	3	3	1
2005	99	0	1	133.3	52.0	9.4	7.4	10	13	1
2005	8	0	1	146.7	45.0	12.0	17.7	0	0	
2005	62	0	1	112.8	0.0	0.0	12.3	2	0	0
2005	54	0	1	183.1	69.9	7.6	8.7	12	14	1
2005	13	0	1	169.3	75.6	12.3	6.3	7	8	1
2005	85	0	1	130.4	44.7	9.9	9.9	2	0	0
2005	15	0	2	321.8	80.4	15.6	17.7	36	72	2
2005	16	0	1		87.2	12.1	6.1	15	30	2
2005	17	0	1	132.3	36.3	9.5	5.4	3	8	2
2005	82	0	1	104.8	39.2	9.5	6.8	4	7	1
2005	53	0	1	86.8	25.4	6.5	6.7	3	5	1
2005	20	0	1	88.8	18.4		8.9	5	0	0
2005	21	0	1	119.7	40.1	9.0	8.6	3	5	1
2005	102	0	1	178.6	86.3	12.5	9.8	15	8	0
2005	77	0	1	180.9	38.6	6.9	9.5	5	1	0
2005	76	0	1	139.0	32.5	8.7	7.2	7	9	1
2005	25	0	1	140.8	85.5	13.1	10.7	6	2	0
2005	75	0	1	156.3	31.3	11.9	9.1	9	8	0
2005	27	0	1	173.5	73.7	12.7	10.1	9	12	1
2005	70	0	1	199.5	72.1	17.4	10.3	11	27	2
2005	69	0	1	279.0	93.4	12.1	10.1	11	10	0
2005	66	0	1	58.1	17.4	7.9	8.2	2	9	4
2005	50	0	1	126.8	45.9	8.8	9.6	4	3	0

2005	65	0	1	174.4	58.4	13.6	9.5	7	6	0
2005	35	0	1	162.6	32.8	13.8	12.4	2	6	3
2005	64	0	1	207.1	59.3	16.1	10.7	8	19	2
2005	38	0	1	176.7	75.9	14.4	7.3	10	17	1
2005	49	0	1	264.3	102.0	16.5	11.1	16	31	1
2005	40	0	1	186.7	65.5	9.1	9.5	7	9	1
2005	41	0	1	182.5	57.6	16.6	7.5	8	9	1
2005	42	0	1	186.0	58.0	10.9	6.8	8	17	2
2005	43	0	1	166.5	52.3	10.6	10.6	13	7	0
2005	44	0	1	93.7	25.7	8.8	7.6	3	3	1
2005	46	0	1	128.4	31.9	15.2	10.6	3	7	2
2005	61	0	1	251.1	87.3	13.2	8.4	9	15	1
2005	39	1	1	83.1	18.8	7.9	7.1	2	0	0
2005	33	1	1	129.9	39.6	10.3	10.2	3	3	1
2005	81	1	1	165.0	45.0	8.4	6.9	6	15	2
2005	12	1	1	163.6	82.2	10.4	9.8	12	43	3
2005	95	1	1	212.1	89.0	12.4	10.3	10	5	0
2005	47	1	1	179.8	45.9	10.0	6.9	5	9	1
2005	63	1	1	170.5	77.7	8.3	5.8	6	10	1
2005	78	2	2	173.4	70.6	13.3	9.7	20	39	2
2005	60	2	1	195.8	74.4	10.5	11.1	11	18	1
2005	58	2	1	160.4	57.5	13.5	14.3	7	11	1
2005	55	2	1	120.0	22.3	5.2	8.2	1	0	0
2005	45	2	1	124.6	23.1	9.3	8.8	4	4	1
2005	5	2	2	228.9	68.9	11.8	15.4	14	7	0
2005	34	2	1	108.3	44.2	10.8	7.1	6	7	1
2005	90	2	1	132.2	41.7	6.3	9.1	4	9	2
2005	68	2	1	267.7	108.7	21.0	6.0	11	8	0
2005	30	2	1	157.3	28.6	8.7	8.5	4	7	1
2005	92	2	1	124.0	27.9	10.7	6.2	2	5	2
2005	71	2	2	273.3	108.0	13.2	7.7	25	30	1
2005	88	2	2	223.6	89.6	10.4	6.6	17	12	0
2005	91	2	1	144.2	57.6	10.2	8.5	4	10	2

2005	14	2	1	193.8	100.4	17.6	12.1	15	22	1
2005	93	2	1	262.9	116.9	16.8	8.4	6	10	1
2005	6	3	1	162.3	45.8	8.7	6.6	6	11	1
2005	31	3	1	240.9	82.4	14.9	10.4	5	9	1
2005	29	3	1	206.6	85.0	12.4	9.8	6	3	0
2005	22	3	1	108.9	38.7		10.7	3	0	0
2005	19	3	1	222.4	83.7	14.4	8.2	7	6	0
2005	24	3	1	191.1	62.1	11.9	13.2	4	14	3
2005	26	3	1	89.2	18.8		8.5	4	1	0
2005	72	3	1	166.0	37.4	10.4	11.9	5	9	1
2005	74	3	1	136.2	44.2	4.8	9.6	7	0	0
2005	59	4	1	184.4	56.4	7.4	13.0	2	2	1
2005	11	4	1	116.9	32.2	8.4	7.3	4	6	1
2005	101	4	1	158.9	78.1	12.9	8.0	7	11	1
2005	79	5	1	148.3	34.7	7.7	5.9	5	6	1
2005	1	5	1	321.5	127.8	20.7	16.7	19	39	2
2005	23	5	1	132.8	34.8		57.1	2	0	0
2005	37	5	1	169.2	47.9	8.3	9.4	8	1	0
2005	18	5	1	134.9	47.7	11.7	7.0	10	17	1
2005	89	5	1	161.7	56.2	10.1	5.4	3	2	0
2005	80	6	1	165.7	49.6	4.4	7.2	3	0	0
2012	2	0	1	162.3	95.1	13.7	10.0	15	56	3
2012	3	0	1	117.7	82.1	11.6	7.5	16	44	2
2012	120	0	2	113.0	86.0	9.3	9.6	24	37	1
2012	6	0	1	130.5	104.0	12.3	9.9	17	55	3
2012	7	0	1	155.9	51.0	14.5	8.6	8	22	2
2012	9	0	1	112.3	53.2	9.3	5.9	4	9	2
2012	95	0	2	103.1	96.8	13.8	8.9	22	21	0
2012	119	0	1	180.1	109.9	12.6	7.4	11	23	2
2012	12	0	1	107.2	96.0	10.5	7.6	17	64	3
2012	89	0	1	131.4	66.9	10.8	6.6	11	28	2
2012	14	0	1	160.9	115.1	10.1	13.5	19	39	2
2012	16	0	1	138.9	59.1	12.4	6.3	9	33	3

2012	17	0	1	125.8	86.9	12.4	8.6	9	10	1
2012	18	0	1	176.8	106.7	14.7	7.2	17	48	2
2012	19	0	1	115.9	72.3	9.7	8.0	8	28	3
2012	20	0	1	106.3	68.7	12.4	5.8	11	37	3
2012	21	0	1	138.3	85.1	16.4	10.5	6	19	3
2012	22	0	1	141.5	68.8	12.6	6.1	9	30	3
2012	23	0	1	77.0	54.4	12.1	6.8	6	10	1
2012	117	0	1	174.3	83.1	13.1	8.8	7	10	1
2012	114	0	1	144.9	65.7	12.8	9.5	8	25	3
2012	26	0	1	150.3	61.4	8.4	6.3	7	14	2
2012	27	0	1	126.8	65.0	11.7	6.1	12	37	3
2012	28	0	1	109.1	46.1	10.2	7.6	7	27	3
2012	29	0	1	132.1	65.7	12.0	5.9	7	15	2
2012	30	0	1	111.5	64.4	13.4	9.8	8	27	3
2012	112	0	1	127.2	64.4	10.8	8.4	9	30	3
2012	110	0	2	132.4	71.6	10.8	6.2	15	56	3
2012	109	0	1	125.3	29.1	7.9	7.5	5	16	3
2012	88	0	1	90.6	117.6	18.2	7.7	15	23	1
2012	87	0	1	107.2	65.5	12.7	7.7	9	13	1
2012	37	0	1	92.3	64.4	15.4	6.8	9	30	3
2012	38	0	1	157.3	78.2	15.6	9.4	11	31	2
2012	39	0	1	130.3	73.2	11.3	6.1	12	33	2
2012	40	0	1	107.4	73.4	12.1	7.6	10	27	2
2012	41	0	1	104.6	50.1	8.2	5.4	4	11	2
2012	42	0	1	119.9	58.3	10.8	6.4	10	41	4
2012	43	0	1	110.0	82.4	12.9	9.0	15	23	1
2012	44	0	1	155.3	101.7	17.1	8.4	15	45	3
2012	107	0	1	103.4	83.7	10.7	8.0	9	26	2
2012	106	0	1	115.0	80.7	13.1	6.2	13	21	1
2012	85	0	1	95.4	31.8	10.7	5.3	5	19	3
2012	103	0	1	97.9	44.5	12.3	6.1	3	5	1
2012	101	0	1	101.2	53.8	7.0	8.4	8	27	3
2012	51	0	1	104.2	80.9	16.7	10.6	11	35	3

2012	52	0	1	106.5	62.9	10.6	5.0	8	28	3
2012	99	0	1	94.0	55.6	8.2	6.8	9	23	2
2012	55	0	1	134.4	106.5	11.0	11.7	20	52	2
2012	57	0	1	109.3	38.4	10.1	4.5	4	14	3
2012	59	0	1	156.9	68.4	11.9	5.9	6	18	3
2012	98	0	2	149.0	77.8	10.6	10.6	14	10	0
2012	83	0	1	93.2	80.3	14.2	8.3	10	33	3
2012	62	0	1	143.2	130.3	9.3	10.6	18	64	3
2012	63	0	1	117.6	60.1	11.8	6.6	6	20	3
2012	64	0	1	154.9	98.4	11.2	7.1	11	46	4
2012	80	0	1	133.4	54.4	9.4	8.3	8	25	3
2012	68	0	1	101.6	58.4	8.8	7.1	6	10	1
2012	70	0	1	112.4	29.6	7.8	5.5	3	11	3
2012	72	0	1	93.5	74.9	10.9	5.9	11	23	2
2012	75	0	1	143.1	89.8	9.8	11.1	8	23	2
2012	76	0	1	78.3	56.5	9.5	6.2	6	5	0
2012	97	0	2	163.5	88.6	15.2	10.1	33	76	2
2012	78	0	1	159.9	84.9	9.3	7.7	12	38	3
2012	96	0	2	182.8	174.5	16.7	9.9	33	84	2
2012	94	0	1	184.4	95.0	11.7	8.9	14	31	2
2012	61	1	2	127.7	55.9	9.4	6.8	15	55	3
2012	84	1	1	98.7	56.4	11.4	7.5	7	12	1
2012	104	1	1	81.2	79.3	14.0	6.0	6	22	3
2012	36	1	1	107.4	61.9	7.6	6.7	10	31	3
2012	35	1	1	125.7	86.4	8.5	8.9	20	37	1
2012	118	1	1	140.7	75.3	11.2	5.4	13	26	2
2012	10	1	2	120.5	123.6	17.7	7.7	24	95	3
2012	65	1	1	132.4	80.0	11.7	7.6	10	18	1
2012	92	2	1	112.2	58.3	9.9	6.0	6	7	1
2012	4	2	1	110.0	55.3	7.4	5.9	2	8	4
2012	11	2	1	116.7	93.6	17.0	6.1	15	34	2
2012	25	2	1	120.0	70.0	11.1	9.3	10	31	3
2012	113	2	1	145.0	70.5	8.6	6.4	10	24	2

2012	50	2	2	120.3	94.9	13.3	7.4	15	49	3
2012	31	2	1	111.8	42.1	12.7	6.9	6	16	2
2012	34	2	1	113.0	57.0	12.5	6.5	11	18	1
2012	46	2	1	110.4	71.8	7.5	7.6	10	36	3
2012	123	2	2	153.9	117.4	19.9	7.4	20	55	2
2012	45	3	1	118.5	66.3	11.6	11.3	11	39	3
2012	32	3	1	91.0	49.4	9.8	6.4	6	17	2
2012	49	4	1	86.3	66.6	11.8	6.9	7	13	1
2012	122	4	2	122.8	105.2	13.9	6.8	19	37	1
2012	108	4	1	105.7	29.5	9.4	8.5	6	13	2
2012	24	4	1	114.6	57.0	13.3	8.0	8	19	2
2012	79	4	1	107.1	37.9	11.2	4.4	6	28	4
2012	77	4	1	143.0	54.3	10.4	5.6	6	25	4
2012	13	4	1	116.4	56.8	8.2	6.1	10	26	2
2012	60	5	1	109.2	49.9	8.5	7.4	5	8	1
2012	47	7	1	120.5	55.4	9.9	5.3	9	34	3
2012	54	8	1	130.8	97.7	12.9	7.8	13	34	2

---

**Table S1.4.** Full data set for pollen fertility analysis in *P. autumnale* plants from Cuesta de la Palma population

Plant no.	Number of Bs	Anther no.	Pollen grains		Fertility
			Viable	Inviabile	
15	0	1	97	3	0.97
		2	98	2	0.98
20	0	1	95	5	0.95
		2	96	4	0.96
3	0	1	112	15	0.88
		2	121	4	0.97
1	1	1	150	1	0.99
		2	100	1	0.99
		3	65	5	0.93
		4	99	1	0.99
		5	150	3	0.98
		6	110	2	0.98
27	1	1	100	4	0.96
		2	100	4	0.96
		3	85	15	0.85
		4	97	3	0.97
		5	95	5	0.95
30	3	1	200	15	0.93
		2	127	5	0.96
32	3	1	82	18	0.82
		2	112	10	0.92
		3	157	12	0.93
		4	96	6	0.94
2	4	1	100	0	1.00
		2	97	3	0.97
		3	100	6	0.94
		4	100	3	0.97

**Table S1.5.** Comparison of B frequency between the seeds yielded by plants in 2012 and those analyzed in 2013. The absence of significant differences ( $\chi^2= 0.16$ ,  $df= 3$  ,  $P= 0.96$ ) indicates the absence of B chromosome effects on seed survival, although with the caveat that some of the 2013 plants could have been derived from seeds produced before 2012 because of overlapping generations.

Item	0B	1B	2B	3B or more	Total
2012 seeds	206	51	60	30	347
2013 bulbs	32	7	10	5	54
Total	238	58	70	35	401

## Capítulo 2

# La distribución geográfica de los cromosomas B no parece estar relacionada con las características fenotípicas, pero sí con la capacidad reproductiva en *Prospero autumnale*

### Resumen

La distribución de los cromosomas B (cromosomas supernumerarios dispensables) nos puede proporcionar información relevante sobre el origen y la dinámica poblacional de estos, así como la etapa evolutiva en la que se encuentran. Múltiples estudios se han realizado sobre la distribución de los cromosomas B abarcando amplios rangos geográficos, pero son escasos los que se han realizado a escalas locales. Aquí estudiamos la distribución de los cromosomas B en 14 poblaciones de la especie vegetal *Prospero autumnale* en el sur de la Península Ibérica que se disponen espacialmente muy cercanas entre sí, encontrándolos sólo en cuatro de estas poblaciones. Además, hemos analizado los rasgos fenotípicos de caracteres vegetativos y reproductivos en 8 de estas poblaciones, las cuatro que portan los cromosomas B y otras cuatro sin ellos. Nuestros resultados indican que no existe relación entre la frecuencia de cromosomas B y la mayoría de los caracteres vegetativos estudiados. Sin embargo, hemos encontrado que en las poblaciones +B se produce un mayor número promedio de semillas. Este efecto podría deberse a una mayor conectividad por polen, que podría relacionarse con el hecho que este cromosoma B usa el polen para su impulso de transmisión.

### Introducción

Los cromosomas B (Bs) son cromosomas supernumerarios, dispensables, que no aparean con los cromosomas A y que se transmiten a tasas no mendelianas por acumulación en la línea germinal (Jones 1991, Beukeboom 1994, Camacho 2005, Jones et al. 2008). La consecuencia de ello es el incremento en frecuencia de los Bs en la población, a menos que su presencia esté asociada con efectos negativos sobre la eficacia biológica del organismo hospedador (Jones and Rees 1982, Camacho et al. 2000).

Desde su descubrimiento (Wilson 1907), los cromosomas B han sido ampliamente estudiados, tanto en animales como en plantas y hongos (Ver revisión en

Camacho 2005, Jones 2012), habiéndose descrito en el 15 % de las especies eucariotas. Su origen más probable es a partir de los cromosomas A de la propia especie (Beukeboom 1994, Camacho 2005), aunque también se han descrito cromosomas B originados por hibridación interespecífica (Sapre and Deshpande 1987, Camacho et al. 2000, Perfectti and Werren 2001, Camacho 2005, Jones et al. 2008).

El modelo más ampliamente aceptado sobre la evolución de los cromosomas B en las poblaciones naturales es el modelo casi-neutro (Camacho et al. 1997), que considera que los cromosomas B atraviesan diferentes etapas en su coevolución con el genoma A, siendo primero parasíticos, debido a su impulso durante la transmisión, para luego ser neutralizados con pérdida del impulso y, a largo plazo, eliminados, a menos que lo recuperen. Este modelo es una extensión del modelo parasítico planteado originalmente por Östergren (1945). La frecuencia de Bs en poblaciones naturales se ha asociado con factores tales como el tipo de reproducción (Burt and Trives 1998), el tamaño del genoma (Trivers et al. 2004, Levin et al. 2005) o el número de cromosomas A de la especie (Trivers et al. 2004).

La distribución geográfica de diferentes tipos de cromosomas B y su frecuencia en las poblaciones puede proporcionar información sobre su origen y mantenimiento en la naturaleza (Jones 1995, Cabrero et al. 1997, Perfectti et al. 2004). Quizás por ello, éste es uno de los aspectos mejor estudiados de los Bs en diferentes especies y a distintas escalas geográficas y ecológicas, que van desde toda el área de distribución de una determinada especie (Bosemark 1956x, Fröst 1958, Ohta et al. 1999, Tsumsaki et al. 2004, Borisov et al. 2018) hasta un área local (Bougourd and Parker 1975, Semple 1989, Cabrero et al. 1997, Morilha et al. 2000, Rosetti et al. 2010, Camacho et al. 2015).

La abundancia y frecuencia de ciertos Bs pueden estar relacionadas con algunos factores geográficos o ambientales. Así, por ejemplo, la frecuencia de Bs en poblaciones del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* a lo largo del río Segura se encuentra negativamente correlacionada con la altitud (Cabrero et al. 1997) y siguen un patrón de aislamiento por distancia (Perfectti et al. 2004), pero en el maíz se encontró la relación contraria con la existencia de una clina altitudinal para el número medio de Bs por planta, ya que los cultivares que crecían a grandes altitudes presentaban un alto número de Bs (Lia et al. 2007). Igualmente, en el pez carácido *Astyanax scabripinnis* se encontraron cromosomas B en dos poblaciones localizadas a grandes altitudes en Brasil (1800, 1920 m), faltando estos en poblaciones situadas a 700 m (Néo et al. 2000). Por otra parte, en el saltamontes *Trimerotropus pallidipennis* se ha observado que la frecuencia de individuos portadores de Bs por población está asociada negativamente con la latitud y positivamente con la longitud (Confalonieri 1995). Los patrones de distribución observados estaban, en este caso, probablemente relacionados con la disponibilidad de hábitats adecuados, en consistencia con el modelo parasítico, que

predice mayor frecuencia de Bs en poblaciones naturales que viven en ambientes más favorables para el organismo hospedador (Camacho 2005).

Los factores ecológicos también influyen en la distribución geográfica de los cromosomas B en algunas especies. Es el caso de la planta *Phleum phleoides*, cuya frecuencia de Bs está correlacionada negativamente con el contenido en materia orgánica del suelo (Bosemark 1967), o el de *Festuca pratensis*, donde la frecuencia de plantas portadoras de Bs se encuentra correlacionada positivamente con el contenido en arcilla del suelo (Bosemark 1956x). En *Centaurea scabiosa*, la mayor frecuencia de Bs se observa en poblaciones que crecen en áreas con baja humedad ambiental y en condiciones climáticas más continentales (Fröst 1958). Por otra parte, las poblaciones de *Listera ovata* que contienen Bs en hábitats empapados contienen un 18 % más de Bs que las encontradas en hábitats normales (Vosa 1983). En otros casos, la distribución de los Bs depende de la calidad del hábitat. Es el caso del saltamontes *Acrida lata* en una zona del norte de Japón (Kayano et al. 1970), o de *Crepis capillaris* (Parker et al. 1991) en donde los Bs se encuentran ausentes de poblaciones situadas en localidades con condiciones subóptimas para la especie.

En otros casos, son varios los factores que condicionan la distribución de poblaciones con cromosomas B. En el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* en Gran Bretaña se ha encontrado una relación entre una clina para la frecuencia de Bs y una clina para la temperatura, dándose la mayor frecuencia de Bs en las zonas más cálidas (Hewitt and Ruscod 1971). Igualmente, la frecuencia de Bs en el saltamontes *Dichroplus elongatus* está correlacionada negativamente con la latitud y positivamente con la altitud y temperatura media anual (Rosetti et al. 2010).

Sin embargo, también se han reportados casos en que la distribución de cromosomas B no parece estar asociada a ningún factor geográfico o ambiental. Como ejemplos tenemos el estudio de Shaw (1983) con el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* en East Anglia, el ratón *Apodemus peninsulae* en Korea (Borisov and Zhigarev 2018), la planta compuesta *Xanthisma texanum* en el suroeste de Oklahoma y Texas (Semple 1989), *Aegylops mutica* (Ohta and Saruhashi 1999) o *Agropyron* (Chen et al. 1993), donde los Bs aparecen en la mayoría de las áreas de distribución de la especie. Sin embargo, en el último caso, hay una clara relación entre la presencia de Bs y la poliploidía, ya que los Bs eran más frecuentes en las plantas diploides (63% de portadores) que en las tetraploides (5%), sugiriendo que los Bs son mejor tolerados en los genomas diploides (Chen et al. 1993), tal como observaron Palestis et al. (2004) al encontrar una relación negativa entre la presencia de Bs y la poliploidía.

Otro de los aspectos más estudiados de la biología de los cromosomas B ha sido su efecto sobre caracteres fenotípicos de los individuos portadores (ver revisión en Bougourd and Jones 1997, Camacho 2005). Son numerosos los estudios que han documentado la influencia de los Bs sobre caracteres endofenotípicos como el aumento

en la frecuencia de quiasmas durante la meiosis, tanto en plantas (Ayonoadu and Rees 1968, Brown and Jones 1976, Ghaffari and Bidmeshkipoor 2002) como en ortópteros (Hewitt and Brown 1970), así como la disminución del apareamiento entre los cromosomas A homólogos en híbridos de *Lolium* (Evans and Macefield 1973), la expresión de una enzima esterasa extra en individuos portadores del B en *P. autumnale* (Ruiz-Rejón et al. 1980b, Oliver et al. 1982), la resistencia al estrés térmico en meiocitos de *Secale cereale* (Pereira et al. 2017) o la resistencia al antibiótico pisatina en el hongo *Nectria haematococca* (Miao et al. 1991), por citar solo algunos ejemplos. Asimismo, también se ha reportado la influencia de los cromosomas B sobre caracteres exofenotípicos como, por ejemplo, la aparición de líneas de color verde en hojas en el maíz (Staub 1987), o el color de los aquenios en la compuesta *Haplopappus gracilis* (Jackson and Newman 1960).

Pero los efectos fenotípicos más generalizados se han observado sobre rasgos relacionados con el vigor, la fertilidad y la fecundidad de los organismos (Östergren 1947, Jones and Rees 1982, Jones 1995, Camacho et al. 2000, Camacho 2005), siendo estos mayores en aquellos individuos con mayor número de Bs. Así, las plantas de maíz con un número alto de Bs (de 15 a 20 cromosomas) ven reducidas su fertilidad y vigor, además de producir semillas defectuosas (Randolph 1941). Asimismo, se ha descrito que la presencia de Bs produce un incremento en el tamaño celular y nuclear y un alto porcentaje de granos de polen abortados y pocas semillas maduras (Randolph 1941). En el centeno (*Secale cereale*), la fertilidad decrece progresivamente con el aumento del número de Bs (de 2 a 4), efectos que dependen del número de Bs en los individuos y no de la frecuencia de Bs en la población (Puertas et al. 1985).

Como mencionamos anteriormente, el modelo parasítico (Östergren 1945, Camacho 2005) predice que los cromosomas B deberían ser más abundantes en poblaciones que habiten en lugares con condiciones ambientales más favorables para el organismo hospedador, ya que, bajo condiciones óptimas, éste puede tolerar mejor la carga impuesta por los cromosomas B (Parker et al. 1991a, Confalioneri 1995, Ghaffari and Bidmeshkipoor 2002). En cambio, en las zonas donde los individuos estén sometidos a mayor estrés ambiental, el efecto deletéreo de los Bs se acentuará y la frecuencia de individuos portadores disminuirá por el efecto de la selección natural (Jones and Rees 1982). En el caso concreto de plantas, cabría esperar encontrar Bs en mayor frecuencia y número en aquellas poblaciones cuyos individuos posean características fenotípicas que evidencian condiciones ambientales más benignas, tales como un mayor tamaño vegetativo, mayor producción de flores u órganos de reserva más grandes, puesto que estos rasgos se consideran indicadores de respuesta a estrés ambiental (Chapin 1991). La respuesta de las poblaciones a la presencia de Bs medida con indicadores multivariantes, tales como la integración fenotípica o la estructura de sus matrices de correlación entre caracteres también podría aportar información valiosa a este respecto.

En este trabajo nos proponemos averiguar cuál es la distribución espacial a escala local de los cromosomas B en distintas poblaciones de *Prospero autumnale* para intentar conocer si existe alguna relación entre la presencia y frecuencia de Bs y algunos factores geográficos, así como determinar si determinadas combinaciones de caracteres fenotípicos están asociadas a la distribución de los cromosomas B.

## Material y métodos

### *La especie*

*Prospero autumnale* (= *Scilla autumnalis*, Asparagaceae) es un bulbo perenne que muestra una amplia distribución geográfica circunmediterránea (Ainsworth 1980, Parker et al. 1991b, Vaughan et al. 1997, Jang et al. 2013). Su distribución abarca una gran variedad de ambientes que van desde zonas húmedas y frías en el sur de Inglaterra hasta regiones muy áridas como los desiertos de Israel (De-Yuang 1982, Ebert et al. 1996, Hamouche et al. 2010, Jang et al. 2013, Almeida da Silva et al. 2014).

Numerosas poblaciones naturales de la especie contienen cromosomas B, que constituye un polimorfismo ampliamente distribuido por la península ibérica (Ruiz Rejón et al. 1980a, Parker et al. 1991b, Vaughan et al. 1997, Almeida da Silva et al. 2014). La presencia de Bs en esta especie está asociada con la expresión de un gen para una esterasa (Ruiz Rejón et al. 1980b) localizado en el complemento cromosómico A (Oliver et al. 1982).

Además de los cromosomas B, otro de los aspectos bien estudiados de la especie es su historia vital, de modo que *Prospero autumnale* se describe como un geófito perenne histeranto (florecen en otoño cuando no tienen hojas), en donde hojas y flores aparecen y se desarrollan en estaciones climáticas distintas, ocurriendo la floración en otoño (septiembre/octubre) cuando todavía no han aparecido las hojas, que suelen desarrollarse después de las primeras lluvias (noviembre/diciembre), en los climas áridos impredecibles en los que viven (Dafni et al. 1981a, 1981b). Sin embargo, en zonas climáticas más húmedas, la planta florece mucho antes (julio - agosto) (Ainsworth 1980). En las condiciones climáticas de baja humedad ambiental, los órganos de almacenamiento juegan un papel crucial en el desarrollo de su ciclo vital, sobre todo para la floración, ya que después de la acumulación de una biomasa inicial crítica, ésta puede ocurrir casi cada año (Dafni et al. 1981a).

Dentro de la clasificación que Dafni et al. (1981a, 1981b) hace de los geófitos, sobre la base del tipo de órgano de almacenamiento, ciclo vital y otros aspectos, *Prospero autumnale* sigue el denominado “patrón *Urginea*”, que se caracteriza por una serie de características reproductivas específicas tales como ovario situado por encima del nivel del suelo, dispersión de semillas antes de las primeras lluvias invernales y

germinación de semillas inmediatamente después de la dispersión, sin periodo de dormancia.

Uno de los factores ambientales que más influyen en la floración de esta especie es la denominada “reserva de fondos” que se da en este tipo de plantas y permite la misma producción de hojas en años buenos o malos, consiguiendo así que la floración sea independiente de las condiciones climáticas. El otro factor que influye en la floración es la temperatura, y no el fotoperiodo, como lo demuestra el hecho de que las poblaciones situadas en zonas con temperaturas más bajas florecen antes que las situadas en regiones más cálidas (Dafni et al. 1981b).

### Las poblaciones

En la década de los 80 del pasado siglo, se estudiaron citogenéticamente diversas poblaciones de *Prospero autumnale* en la Península Ibérica, siendo la población de La Palma (Granada) una de las que presentaban cromosomas Bs (Ruiz-Rejón et al 1980a). En el año 2013, iniciamos una prospección en poblaciones cercanas para analizar la distribución de los cromosomas B a escala de paisaje. En total muestreamos 14 poblaciones separadas por al menos 1 km de distancia lineal (Figura 2.1). En el año 2015 analizamos una serie de caracteres fenotípicos vegetativos y reproductivos en ocho de las poblaciones muestreadas, distribuidas según un gradiente longitudinal SO-NE, cuatro de las cuales (Palma, Tapia, Umbral y Torcal) mostraron cromosomas B a distintas frecuencias (poblaciones +B), mientras que las otras cuatro (Tajea, Jobo, Chorro y Pinos) carecían de ellos (poblaciones 0B). La Tabla 2.1 muestra un resumen de las características ambientales y geográficas de cada una de las 14 poblaciones estudiadas.

**Tabla 2.1.** Relación de poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale*, con la indicación de sus características ambientales y geográficas. Las poblaciones resaltadas en negrita son en las que se han estudiado los rasgos fenotípicos. La presencia de cromosomas B se indica con un asterisco (\*) en la población.

Población	Nombre	Código	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Hábitat
<b>Cuesta La Palma *</b>	<b>Palma*</b>	LPA	<b>37° 7' 6.73 "</b>	<b>4° 17' 0.90 "</b>	<b>761</b>	<b>Matorral fruticoso con encinas</b>
<b>Villanueva de Tapia*</b>	<b>Tapia*</b>	TAP	<b>37° 9' 45.99"</b>	<b>4 °20' 41.20"</b>	<b>725</b>	<b>Matorral fruticoso con encinas</b>
Sierra de Gracia	Gracia	SGR	37° 6' 32.26"	4 °23' 16.74"	693	Matorral mediterráneo
<b>Sierra del Umbral*</b>	<b>Umbral*</b>	SUM	<b>37° 8' 6.66"</b>	<b>4° 21' 15.13"</b>	<b>779</b>	<b>Matorral mediterráneo pastoreado</b>
Sierra de Jobo	Jobo	SJO	37° 2' 8.27"	4 °16' 28.35"	945	Matorral mediterráneo
<b>La Tajea*</b>	<b>Tajea</b>	TAJ	<b>37° 8' 9.96"</b>	<b>4° 13' 17.90"</b>	<b>575</b>	<b>Matorral mediterráneo</b>
<b>El Torcal</b>	<b>Torcal*</b>	TOR	<b>36° 59' 6.94"</b>	<b>4 °31' 25.33"</b>	<b>656</b>	<b>Vegetación ruderal</b> Matorral degradado con árboles dispersos
Los Arenales	Arenales	LAR	37° 12' 38.35"	4 °8' 55.79"	897	
<b>Los Pinos</b>	<b>Pinos</b>	LPI	<b>37° 9' 44.91"</b>	<b>4 °9' 38.02"</b>	<b>548</b>	<b>Pinar de repoblación</b>
<b>El Chorro</b>	<b>Chorro</b>	CHO	<b>36° 53' 18.28"</b>	<b>4 °47' 2.56"</b>	<b>340</b>	<b>Pinar de repoblación</b>
Cerro del Almendro	Almendro	CAL	37° 08' 50.29"	4 °11' 15.16"	969	Matorral mediterráneo pastoreado
Riofrío	Riofrío	RIO	37° 09' 03.40"	4 °12' 12.13"	563	Matorral mediterráneo pastoreado
Paso del Lobo	Lobo	PLO	37° 11' 03.16"	4 °10' 05.30"	521	Matorral mediterráneo
Serrezuela-Loja	Serrezuela	SER	37° 9' 54.64"	4° 7' 54.67"	522	Matorral mediterráneo pastoreado

### ***Determinación del número de cromosomas B por individuo***

Para determinar el número de cromosomas B por individuo, colocamos cada bulbo recolectado en hidrocultivo hasta la producción de raíces. Cuando éstas alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud, las cortamos y sumergimos en una solución de colchicina al 0.1 % durante cuatro horas a temperatura ambiente. Posteriormente las fijamos introduciéndolas en una mezcla 3:1 de etanol-ácido acético y por último las guardamos a 4 °C hasta su posterior análisis citogenético.

Para la tinción de los cromosomas, sumergimos cada raíz en HCl 1N durante 1 minuto a 60 °C, y luego en orceína lactopropiónica durante 15 minutos. Para su estudio al microscopio óptico, aplastamos los meristemas radicales en una gota de orceína lactopropiónica en un portaobjetos con un cubreobjetos.

Para cada población calculamos tres parámetros de frecuencia de cromosomas Bs: prevalencia (la proporción de individuos portadores de Bs), media (el número medio de Bs por individuo) y carga (el número medio de Bs por individuo, en los individuos portadores).

### ***Caracteres fenotípicos***

En el otoño de 2015 muestreamos entre 26 y 67 (media de 37) individuos en estado de fructificación en cada una de las ocho poblaciones anteriormente mencionadas, que almacenamos en bolsas de papel hasta su posterior estudio en el laboratorio. De cada individuo separamos el bulbo del resto de la planta. Colocamos el bulbo en hidrocultivo para producir raíces que pudieran ser analizadas citogenéticamente, como hemos descrito anteriormente. Del resto de la planta medimos los siguientes caracteres fenotípicos: número de escapos (NES), longitud del escapo (LES, en mm), medido desde el punto de aparición del pedicelo de la primera flor hasta su inserción en el bulbo (en caso de que la planta tuviera más de un escapo se tomó la medida del mayor); longitud de la inflorescencia (LIN, en mm), medido como la distancia desde la base del pedicelo de la primera flor hasta el ápice de la inflorescencia (si había más de un escapo, mediamos en el más largo); longitud del pedicelo floral (LPE, en mm), medido para la flor más basal como la distancia desde la inserción del pedicelo en el escapo hasta la base de la flor; número de flores por planta (NFL); diámetro del bulbo (DBU, en mm), medido como la distancia entre los dos extremos del bulbo tomada transversalmente. Estos rasgos corresponden a caracteres que están relacionados con la respuesta de la planta al estrés abiótico (Chapin 1991). Todas las medidas de longitud se tomaron con un calibre digital (marca Medid).

También medimos varios caracteres reproductivos indicadores de éxito reproductivo: el número total de frutos (NFR) y semillas (NSE) por planta. A partir de estas medidas calculamos el número de semillas por fruto (SFR), como el cociente entre NSE y NFR, la tasa de fructificación (FRU), como el cociente entre NFR y NFL, la fertilidad

(FER) como el cociente entre NSE y el número total de óvulos, que en esta especie son 6 por ovario (este índice indica la proporción de semillas producidas por la planta con respecto al total de semillas que puede producir).

### ***Análisis de las medias fenotípicas***

En primer lugar, realizamos un análisis estadístico descriptivo de los datos obtenidos, calculando las medias poblacionales, las varianzas y los coeficientes de variación para cada una de las variables definidas en el apartado anterior (Tabla S2.1). Para comparar las medias de los distintos caracteres entre poblaciones realizamos test de Kruskal-Wallis cuando comparamos el total de las poblaciones y test de Mann-Whitney para la comparación de poblaciones +B con OB.

Con las medias poblacionales calculadas anteriormente, correspondientes a los caracteres NES, LES, LIN, NFL, LPE, DBU, NFR y SFR, realizamos un análisis multivariante del fenotipo mediante un Análisis de Componentes Principales. De éste se obtuvieron los componentes principales PC1 y PC2. Con éstos construimos un gráfico biplot que visualiza las relaciones entre las distintas poblaciones estudiadas según su distribución en el morfoespacio fenotípico, así como las correlaciones entre las distintas variables estudiadas.

### ***Relaciones fenotípicas entre poblaciones***

Para determinar las relaciones morfológicas entre las distintas poblaciones estudiadas, hemos calculado la matriz de distancias euclídeas y de Manhattan para los valores promedio de las variables NES, LES, LIN, NFL, LPE y DBU, y posteriormente hemos construido un dendrograma por el método del vecino más próximo.

### ***Matrices de correlación e índice de integración fenotípica***

En la matriz de correlación de una población podemos detectar dos tipos de parámetros. Por una parte, la intensidad de correlación, que viene dada por el valor de  $r$  para cada par de caracteres y por el  $I_r$  para el conjunto de la matriz; y, por otra parte, el patrón de correlaciones, que determina el conjunto de pares de rasgos correlacionados y el signo de esas correlaciones (si son positivas o negativas).

Para el cálculo de las matrices de correlación poblacionales estandarizamos (media= 0 y varianza=1) los datos de las variables correspondientes a los caracteres usados para el análisis de PCA de cada una de las poblaciones por separado. Para el cálculo de las matrices de correlación usamos el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y se calculó el p-valor de cada uno de los valores de los pares de correlaciones. Con estos resultados se construyeron grafos para cada población (figura 2.3) que muestra gráficamente el patrón de correlaciones.

Como medida de la integración fenotípica en cada población calculamos el índice de integración de Wagner-Cheveraud (Wagner 1984, Cheveraud 1988), como la varianza

de los autovalores ( $\text{var}(\lambda_i)$ ) de la matriz de correlación fenotípica, expresado como una fracción del máximo valor para un número dado de caracteres fenotípicos (Armbuster et al. 2009) y corregido mediante la substracción del factor que viene dado por la expresión  $T-1/n$ , donde  $T$  es el número de rasgos fenotípicos considerados, y  $n$  el número de individuos de la población. Calculamos el intervalo de confianza de cada valor del índice mediante bootstrapping (500 repeticiones) de la varianza de los autovalores de cada matriz de correlación poblacional. También usamos alternativamente el índice de correlación de Cane ( $I_r = E(r)$ ), que se calcula como el promedio del conjunto de los valores de los coeficientes de correlación de Pearson en cada población (Cane 1993).

### ***Relación entre frecuencia de cromosomas B y rasgos vegetativos y reproductivos***

La relación entre la frecuencia de Bs y los diferentes rasgos cuantitativos medidos en las distintas poblaciones la hemos calculado mediante el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) de la prevalencia de Bs con el valor medio del resto de variables poblacionales estudiadas,

De esta misma manera, determinamos además la relación entre frecuencia de Bs y los tres parámetros geográficos (latitud, longitud y altitud), además de la relación entre los diferentes caracteres vegetativos y reproductivos y los parámetros geográficos.

### ***Relación entre distancias geográficas y distancias fenotípicas***

Comprobamos la posible existencia de relación entre las distancias geográficas poblacionales y la distancia fenotípica de las mismas mediante un test de Mantel, por el que hemos comparado la matriz de distancias geográficas (en km) entre las distintas poblaciones y las distancias fenotípicas euclídeas calculadas a partir de las variables NES, LES, LIN, NFL, DBU, LPE, NFR y SFR.

Usamos las matrices de distancias genéticas construidas con la frecuencia de cromosomas Bs de las cuatro poblaciones +B para testar la relación entre distancias genéticas y distancias geográficas. Para construir la matriz de distancias genéticas entre las poblaciones +B usamos como parámetro la diferencia en la prevalencia de Bs, usando los datos tomados en los años 2013 y 2015.

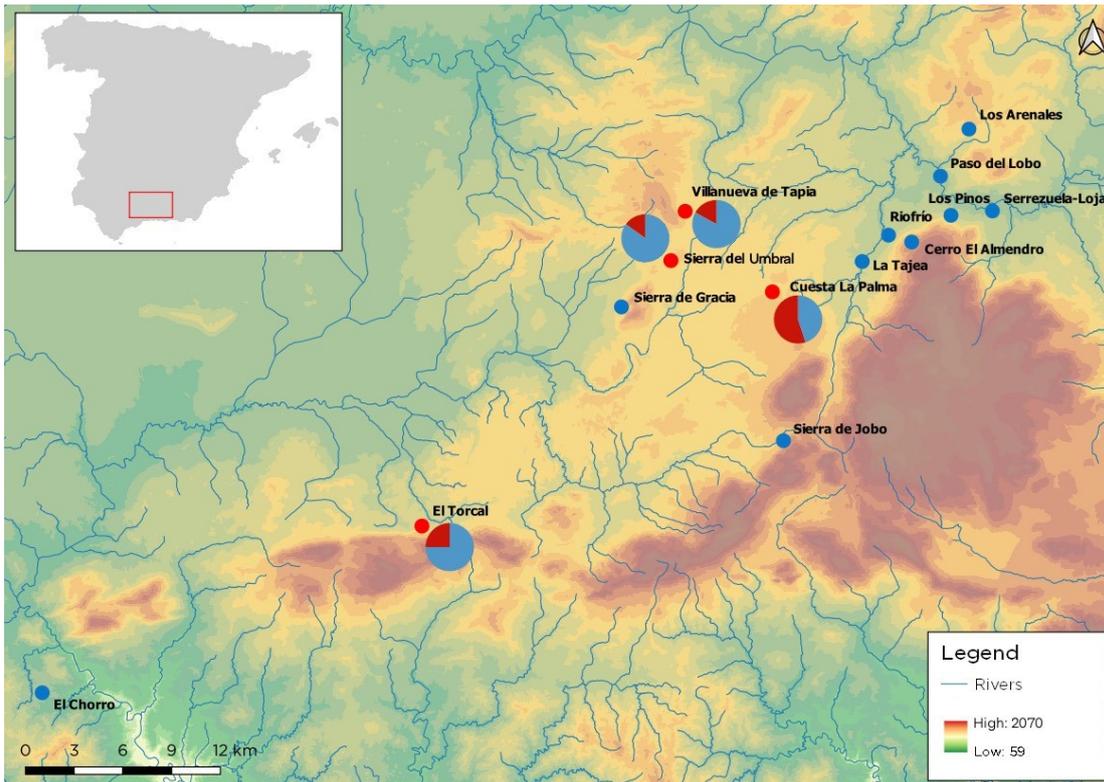
### ***Análisis estadístico***

Todos los análisis estadísticos realizados para este trabajo, además de los gráficos obtenidos, se han realizado en el software libre R versión 4.0.0 (R Development Core Team 2007) y RStudio y diferentes paquetes estadísticos desarrollados para tal efecto como Vegan (Oksanen et al. 2020), factorminer (Lê et al. 2008) y ggplot2 (Wickham et al. 2020).

## Resultados

### *Distribución geográfica de los cromosomas B en la zona.*

Hemos analizado un total de 568 individuos que fueron muestreados en las 14 poblaciones (Tabla 2.1) durante 2013 (333 individuos de 13 poblaciones) y 2015 (235 individuos de 8 poblaciones). En la muestra de 2013, sólo tres poblaciones albergaban cromosomas B (Umbral, La Palma y Tapia), mientras que no aparecieron en las 10 poblaciones restantes (Tabla 2.2). En 2015 muestreamos de nuevo las tres poblaciones +B y cuatro poblaciones 0B, y añadimos otra población localizada en Torcal (Tabla 2.2) que resulto ser +B. No detectamos cambios significativos en prevalencia, media y carga del B en las tres poblaciones que fueron analizadas en los dos años ( $p > 0.05$  en los tres casos, tests de Mann-Whitney). Por otra parte, las comparaciones entre poblaciones +B muestreadas en 2013 no arrojaron diferencias significativas en prevalencia (Kruskal-Wallis:  $H= 3.51$ ,  $P= 0.172$ ), media ( $H= 3.67$ ,  $P= 0.159$ ) y carga ( $H= 1.47$ ,  $P= 0.477$ ), pero sí las mostraron en 2015 para prevalencia ( $H= 11.17$ ,  $P= 0.001$ ) y media ( $H= 14.11$ ,  $P= 0.003$ ), pero no para carga ( $H= 6.86$ ,  $P= 0.08$ ). La distribución del B entre individuos (0-4 Bs) diferían entre las 3 poblaciones +B de 2013 (test de contingencia RxC:  $p = 0.0176 \pm 0.0045$ ), siendo La Palma la población con mayor frecuencia de Bs (Tabla S2.3). Tapia y Camacho (poblaciones +B) están localizadas muy cerca de La Palma (a 7.5 y 6.5 Km, respectivamente) y sus prevalencias de Bs fueron alrededor de la mitad que las de La Palma, al igual que en Torcal, situada a 27 Km de esta última. Las distancias genéticas, calculadas a partir de la prevalencia de Bs entre pares de poblaciones +B, tanto en 2013 como en 2015 se muestran en la Tabla 2.3.



**Figura 2.1.** Distribución geográfica de las poblaciones estudiadas de Prospero autumnales, indicando las poblaciones OB (puntos en azul) y las +B (puntos en rojo). Los gráficos circulares indican la frecuencia de Bs (en rojo) en cada una de las poblaciones +B.

**Tabla 2.2.** Distribución del número de cromosomas B en las poblaciones estudiadas en dos años distintos, 2013 y 2015

Poblaciones	año 2013						año 2015					
	N	0B	1B	2B	3B	4B	N	0B	1B	2B	3B	4B
Almendro	18	18	0	0	0	0						
Archidona	24	24	0	0	0	0						
Arenales	16	16	0	0	0	0						
Umbral	18	14	3	0	1	0	45	38	5	1	1	0
Chorro	19	19	0	0	0	0	33	33	0	0	0	0
Jobo	29	29	0	0	0	0	26	26	0	0	0	0
Loja	38	38	0	0	0	0						
La Palma	54	32	7	10	5	0	29	13	2	10	2	2
Paso Lobo	14	14	0	0	0	0						
Los Pinos	18	18	0	0	0	0	28	28	0	0	0	0
Riofrío	23	23	0	0	0	0						
Tajeta	32	32	0	0	0	0	35	35	0	0	0	0
Tapia	30	22	4	0	1	3	24	20	2	2	0	0
Torcal							15	11	2	2	0	0
<b>Totales</b>	<b>333</b>	<b>299</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>235</b>	<b>204</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

**Tabla 2.3.** Distancia genética entre poblaciones con presencia de Bs de *P. autumnale*. Para el cálculo de la distancia se ha usado como parámetro la prevalencia de Bs. La diagonal superior muestra los valores de distancias en 2013 y la inferior en 2015

	Palma	Tapia	Umbral
Palma		0,23	0,31
Tapia	0,39		0,08
Umbral	0,4	0,01	
Torcal	0,29	0,1	0,11

### **Variación fenotípica**

Los valores promedio de las variables fenotípicas vegetativas y reproductivas aparecen en las Tablas S2.1 y S2.2 respectivamente. Hemos encontrado diferencias significativas entre las 8 poblaciones para todos los rasgos fenotípicos analizados (Tabla 2.4, tests de Kruskal-Wallis). Cuando este análisis se realizó por separado para las poblaciones +B y 0B, observamos que las 0B también diferían entre sí para todos los rasgos mientras que las poblaciones +B eran homogéneas para los rasgos reproductivos, pero no así para los vegetativos (Tabla 2.4).

Dada esta diferencia entre los dos tipos de poblaciones, realizamos una comparación entre poblaciones 0B vs. +B, para los 12 rasgos fenotípicos analizados, mediante el test de Mann-Whitney (Tabla 2.5). Esto reveló que, cuando se comparan los dos tipos de población, incluyendo las plantas portadoras y no portadoras de cromosomas B de las poblaciones +B (172 plantas), hay cuatro rasgos reproductivos (NFL, NSE, SFR y FER) que muestran valores significativamente mayores en las poblaciones +B (Tabla 2.5A). Cuando se incluyeron solamente las plantas 0B de los dos tipos de población en el análisis, se observaron diferencias significativas para LES, NSE y SFR (Tabla 2.5B), sugiriendo que las diferencias anteriores podrían deberse más a características intrínsecas de las poblaciones +B que a la presencia de individuos con Bs. Para comprobarlo, realizamos una tercera ronda de análisis comparando entre las plantas con B y sin B de las 4 poblaciones +B, no detectando diferencias significativas debidas a la presencia del B (Tabla 2.5C). Esto parece indicar que las diferencias entre poblaciones +B y 0B se deben a características asociadas a las poblaciones y no a la mera presencia del B.

**Tabla 2.4.** Análisis de Kruskal-Wallis comparando los rasgos fenotípicos entre poblaciones. Cuando se compararon todas las poblaciones, se detectaron diferencias significativas para todos los rasgos al igual que cuando se compararon las poblaciones sin cromosomas B (OB). Sin embargo, las 4 poblaciones +B fueron homogéneas para 5 de los rasgos reproductivos analizados, y sólo 1 de los 6 rasgos vegetativos. gl= grados de libertad; Pb= Probabilidad de Bonferroni.

Rasgo	Todas las poblaciones				Poblaciones +B				Poblaciones OB	
	H	gl	P	Pb	H	gl	P	Pb	H	gl
NES	34,25	7	<0.0001	<0.0001	4,31	3	0,2296		31,11	3
NFL	78,27	7	<0.0001	<0.0001	4,17	3	0,2433		47,97	3
LES	92,94	7	<0.0001	<0.0001	61,75	3	<0.0001	<0.0001	22,53	3
LIN	73,45	7	<0.0001	<0.0001	33,87	3	<0.0001	<0.0001	32,95	3
LPE	49,01	7	<0.0001	<0.0001	32,51	3	<0.0001	<0.0001	14,32	3
DBU	80,17	7	<0.0001	<0.0001	22,66	3	<0.0001	<0.0001	52,45	3
DIN	56,65	7	<0.0001	<0.0001	38,26	3	<0.0001	<0.0001	16,18	3
NFR	84,2	7	<0.0001	<0.0001	2,93	3	0,402		56	3
NSE	54,89	7	<0.0001	<0.0001	7,21	3	0,0654		12,02	3
SFR	146,66	7	<0.0001	<0.0001	69,48	3	<0.0001	<0.0001	21,06	3
FRU	21,73	7	0,0028	0,0028	1,31	3	0,7257		18,07	3
FER	46,45	7	<0.0001	<0.0001	6,74	3	0,0806		21,06	3

**Tabla 2.5.** Comparación de 12 rasgos fenotípicos entre poblaciones +B vs. OB, mediante tests de Mann-Whitney. A) Se incluyen todos los individuos de las 8 poblaciones. B) Se incluyen solo los individuos OB de las 8 poblaciones. C) Se incluyen solo los individuos de las 4 poblaciones con B. SD= desviación estándar. Pb= P después de la corrección secuencial de Bonferroni

		Poblaciones +B			Poblaciones OB			Z	P	Pb
		Media	ES	N	Mean	ES	N			
A	NES	1,26	0,04	172	1,23	0,04	123	0,4104	0,6815	13,63
	NFL	14,19	0,59	172	13,2	0,82	123	318,8	0,0014	0,013
	LES	121,22	3,27	172	123,28	2,82	123	-169	0,091	0,546
	LIN	57,44	1,85	172	53,13	2,26	123	174,49	0,081	0,567
	LPE	13,15	0,55	172	13,22	0,33	123	-138,2	0,1671	0,836
	DBU	10,12	0,21	172	10,41	0,32	123	-0,08	0,936	0,936
	DIN	0,26	0,01	172	0,26	0,01	123	119,53	0,232	0,696
	NFR	7,50	0,44	172	6,68	0,50	123	268,69	0,0072	0,058
	NSE	20,40	1,07	172	11,6	0,81	123	625,7	4E-10	4E-09
	SFR	2,51	0,12	172	1,08	0,07	123	847,12	2E-17	3E-16
	FRU	0,53	0,02	172	0,5	0,02	123	127,22	0,2033	0,813
	FER	0,26	0,01	172	0,18	0,01	123	454,6	5E-06	1E-04

		Poblaciones +B			Poblaciones OB			Z	P	Pb
		Media	ES	N	Mean	ES	N			
B	NES	1,25	0,06	73	1,23	0,04	123	0,12	0,9067	18,13
	NFL	13,15	0,69	73	13,2	0,82	123	1,97	0,0494	0,346
	LES	110,01	3,96	73	123,28	2,82	123	-3,44	0,0006	0,006
	LIN	52,94	2,47	73	53,13	2,26	123	0,33	0,7418	29,67
	LPE	13,26	1,21	73	13,22	0,33	123	-2	0,0456	0,365
	DBU	10,02	0,32	73	10,41	0,32	123	-0,23	0,8177	24,53
	DIN	0,26	0,01	73	0,26	0,01	123	1,65	0,0995	0,597
	NFR	6,52	0,54	73	6,68	0,50	123	0,96	0,3358	16,79
	NSE	17,64	1,72	73	11,6	0,81	123	3,33	0,0009	0,009
	SFR	2,28	0,17	73	1,08	0,07	123	6,02	2E-09	2E-08
	FRU	0,5	0,03	73	0,5	0,02	123	0,05	0,9605	0,961
	FER	0,23	0,02	73	0,18	0,01	123	2,53	0,0114	0,103

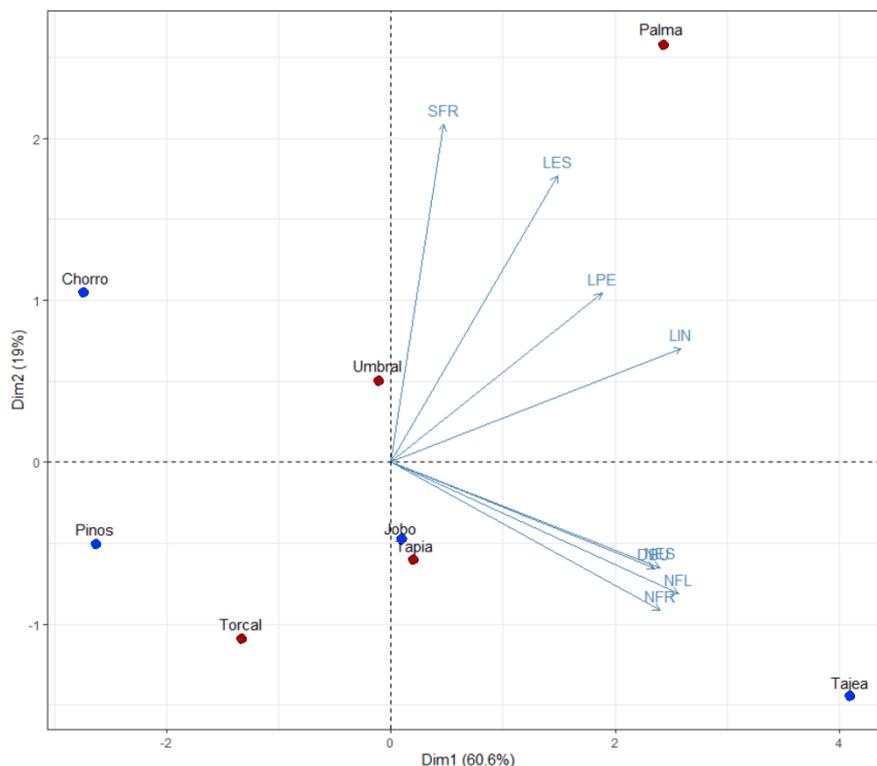
		Individuos sin B			Individuos con B			Z	P	Pb
		Media	ES	N	Media	ES	N			
C	NES	1,25	0,06	73	1,33	0,13	24	-0,31	0,7571	0,757
	NFL	13,15	0,69	73	15,79	2,21	24	-1,2	0,2286	1,143
	LES	110,01	3,96	73	138,5	10,01	24	-2,66	0,0078	0,094
	LIN	52,94	2,47	73	65,46	6,13	24	-1,67	0,0953	0,953
	LPE	13,26	1,21	73	13,01	0,78	24	-0,34	0,7318	1,464
	DBU	10,02	0,32	73	11,43	0,72	24	-1,56	0,118	0,944
	DIN	0,26	0,01	73	0,25	0,02	24	0,64	0,5198	2,079
	NFR	6,52	0,54	73	9,04	2,09	24	-1,24	0,216	1,296
	NSE	17,64	1,72	73	23,21	3,29	24	-2,01	0,0439	0,483
	SFR	2,28	0,17	73	2,82	0,35	24	-1,44	0,1505	1,053
	FRU	0,5	0,03	73	0,52	0,04	24	-0,52	0,6042	1,813
	FER	0,23	0,02	73	0,27	0,03	24	-1,65	0,0987	0,888

### **Análisis multivariante del fenotipo.**

El análisis discriminante realizado con las variables fenotípicas NES, LES, NFL, LIN, LPE, DBU, NFR y SFR no consiguió separar (discriminar) las poblaciones +B y OBs (TE Training Error de 24.74 % incluyendo en el análisis los individuos con Bs y TE= 23.46 % eliminando los individuos portadores de Bs).

El análisis de componentes principales realizado con las medias poblacionales de estas mismas variables en las ocho poblaciones estableció dos grupos de variables correlacionadas, por una parte, NFR, NFL, DBU y NES, y por otra LPE, LIN, LES y SFR, tanto incluyendo como excluyendo los individuos con Bs del análisis.

En el biplot de la Figura 2.2, que representa las componentes principales 1 y 2 (que subsumen el 80% de la varianza), las poblaciones Tapia (+B), Umbral (+B), Torcal (+B) y Jobo (OB) aparecen muy cercanas entre sí, mientras que Tajea (OB), Palma(+B), Pinos (OB) y Chorro (OB) se disponen más dispersas en el gráfico, no existiendo un patrón de agregación claro entre poblaciones +B y OB.



**Figura 2.2.** Biplot en donde se representan las variables longitud del escapo (LES), longitud de la inflorescencia (LIN), longitud del pedicelo (LPE), diámetro del bulbo (DBU), número de escapos (NES), número de flores (NFL), número de frutos (NFR) y semillas por fruto (SFR) de las ocho poblaciones estudiadas (con color azul se representan las poblaciones OB y en rojo las +B). Nótese como aparecen dos grupos de variables correlacionadas por una parte NFR, NFL, DBU y NES, con una fuerte relación entre ellas, y por otra SFR, LES, LPE, LIN. Nótese también como las poblaciones aparecen muy dispersas en el gráfico, y que sólo algunas de ellas están más cercanas: Umbral, Jobo, Tapia.

Las poblaciones que aparecen más agrupadas en el biplot coinciden con aquellas que se encuentran también espacialmente próximas entre sí, a excepción de Torcal que está más alejada. Por otra parte, la población de La Palma, que también se encuentra espacialmente próxima a este grupo, en el biplot aparece claramente separada de éstas, lo que indica que, a pesar de su cercanía espacial, es fenotípicamente muy diferente.

### ***Matriz de correlaciones e índice de integración fenotípica***

La intensidad de correlación entre rasgos a nivel poblacional ( $I_r$ ) varió entre 0.175 de Torcal y 0.372 de Tapia (ambas poblaciones +B) (Tabla 2.6), pero en ningún caso obtuvimos diferencias significativas entre los  $I_r$  de las ocho poblaciones estudiadas (test de Kruskal-Wallis,  $H = 11.36$ ,  $p=0.128$ ).

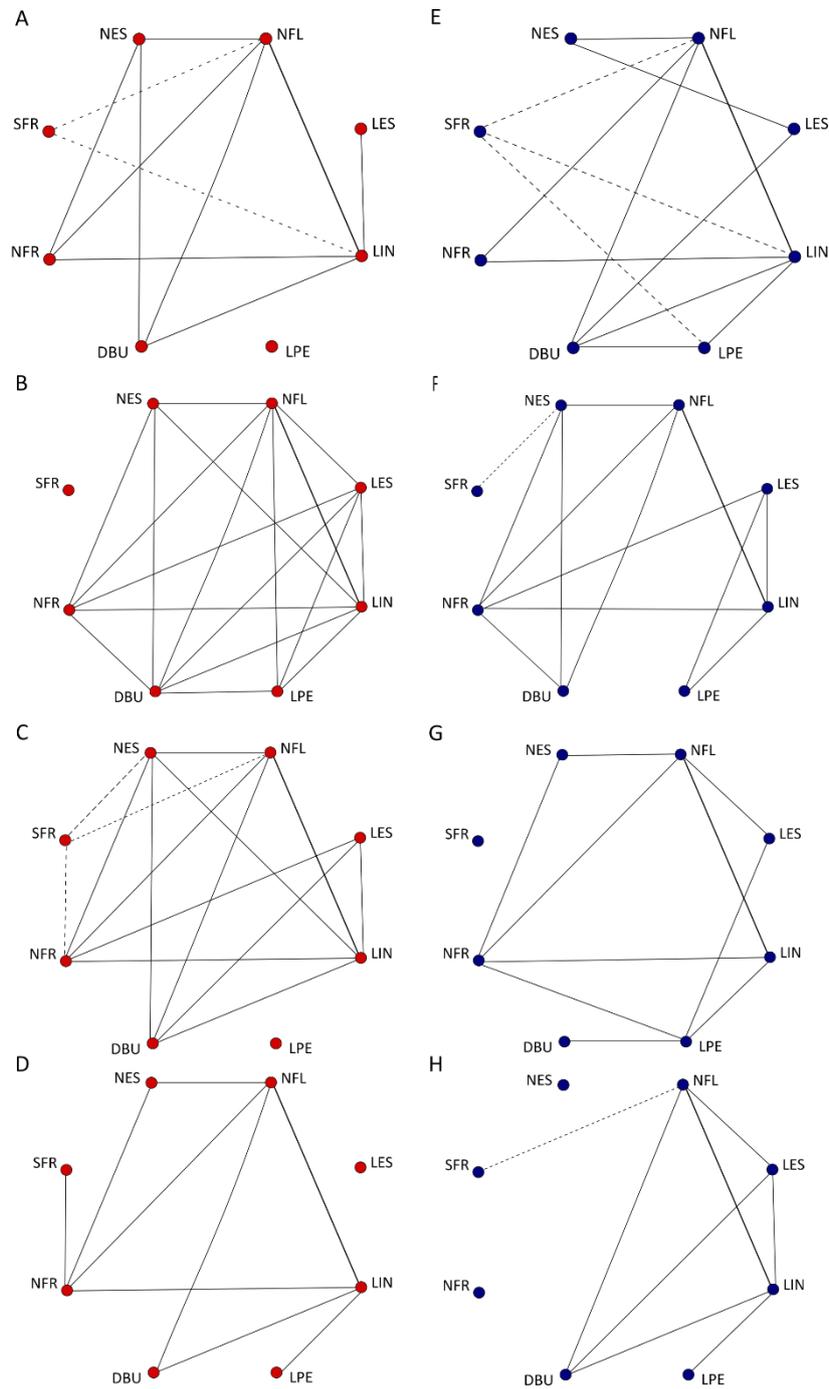
Las poblaciones con un mayor número de correlaciones positivas fueron Tapia y Umbral (ambas +B), mientras que la población de Chorro (OB) fue la que mostró un menor número de correlaciones entre pares de caracteres (Tabla S2.4, Figura 2.3).

Si nos fijamos en la correlación de los distintos pares de caracteres en las poblaciones estudiadas, los pares NFR-LIN, NES-NFL, NFR-NFL están positivamente correlacionados en todas las poblaciones excepto en Chorro, en donde no detectamos esa correlación. El par DBU-NFL también tiene valor positivo en todas las poblaciones excepto en Pinos, y el par DBU-LIN en todas las poblaciones obtiene valores positivos excepto en Tajea y Pinos (Tabla S2.4). Valores negativos de correlación se muestran en los pares SFR-NFL en Palma, Umbral y Jobo; SFR-LIN en Palma y Tajea; y SFR-LPE en Jobo; SFR-NES en Umbral y Tajea; SFR-SFR es negativo en Umbral y positivo en Torcal (Tabla S2.4).

El índice de integración fenotípica de Wagner-Cheveraud ( $INT$ ) (Tabla 2.9) alcanzó valores inferiores al 20 %. La población de Pinos (OB) es la que mostró un valor de  $INT$  más bajo (9,95 %), mientras que fue Tapia (+B) la que mostraba el valor más alto (19.73 %). Las otras poblaciones mostraron un  $INT$  muy parecido (en torno al 11 %). No existían diferencias significativas entre los valores del  $INT$  entre poblaciones (los intervalos de confianza calculados se solapan en todos los casos) (Tabla 2.6).

**Tabla 2.6.** Índice de integración fenotípica de las poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale*.  
 $\text{Var}(\lambda_i)$ : varianza de los autovalores de las matrices de correlación de cada una de las poblaciones  
de corrección. INT: índice de integración fenotípica corregido. INT (%): porcentaje de la integración  
posible para la población dada, Ir: Valor promedio del conjunto de correlaciones estudiadas.

Población	$\text{var}(\lambda_i)$	t-1/n	INT	ci - 95%	ci + 95 %	INT %	Ir	ci -95
Palma*	1.132	0.179	0.953	0.14	2.6	11.91	0.205	0.1
Tapia*	1.779	0.2	1.579	0.18	0.2	19.74	0.372	0.2
Umbral*	1.042	0.104	0.937	0.15	2.73	11.71	0.198	0.1
Torcal*	1,023	0.225	0.797	0.32	2.17	9.96	0.176	0.0
Chorro							0.162	0.0
Tajea	1.158	0.2	0.958	0.15	4.21	11.98	0.272	0.1
Pinos	1.037	0.241	0.796	0.31	2.52	9.95	0.233	0.1
Jobo	1.334	0.269	1.065	0.22	3.24	13.31	0.227	0.0



**Figura 2.3.** Grafos de correlaciones para las ocho poblaciones estudiadas. Las variables estudiadas son número de escapos (NES), número de flores (NFL), longitud del escapo (LES), longitud de la inflorescencia (LIN), longitud del pedicelo (LPE), diámetro del bulbo (DBU), número de frutos (NFR) y semillas por fruto (SFR). Las líneas entre variables muestran los coeficientes de correlación significativos, en línea continua se muestran las correlaciones positivas y en discontinuas las negativas. Los grafos con puntos rojos corresponden a las poblaciones +B, mientras que las que se representan con puntos azules a las poblaciones OB. Los grafos corresponden a: A: Palma, B: Tapia, C: Umbral, D: Torcal, E: Jobo, F: Tajea, G: Pinos, H: Chorro.

**Tabla 2.7.** Relación entre el valor promedio de las variables estudiadas de las ocho poblaciones de *F. ...* diagonal superior se muestra el valor del Coeficiente de correlación de Pearson (r), y en la inferior e señalan en negrita aquellos valores que son estadísticamente significativos ( $p < 0.005$ ). fBs: frecuencia Ir = Índice de integración fenotípica de Cane, INT = Índice de integración fenotípica de Wagner-Chev LAT = Latitud, LON = Longitud, NES = Número de escapos, NFL = número de flores, LES = Longitud de Longitud de la inflorescencia, LPE = Longitud del pedúnculo floral, DBU = Diámetro del bulbo, NFR = NSE = Número de semillas, SFR = Semillas por fruto.

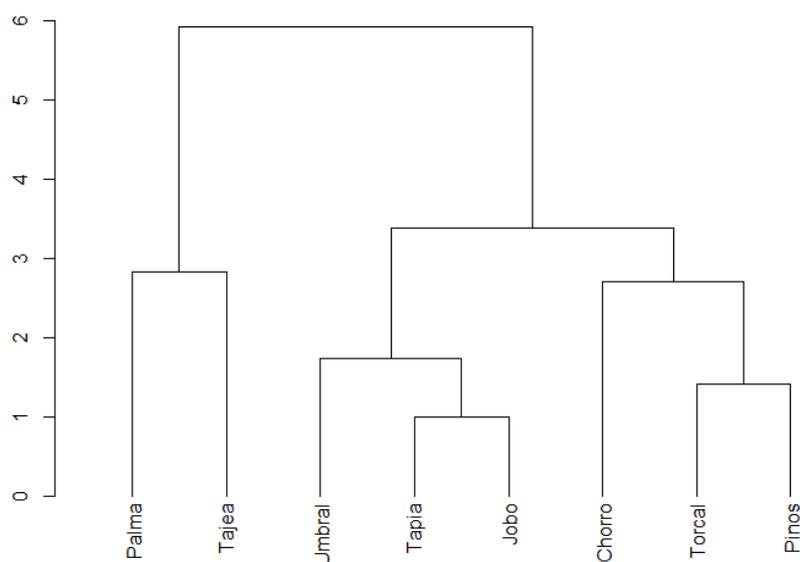
	fBs	Ir	INT	ALT	LAT	LON	NES	NFL	LES	LIN	LPE	DBU
fBs		-0.08	0.23	0.31	0.18	-0.05	0.04	0.21	0.57	0.54	0.18	0.04
Ir	0.85		<b>0.82</b>	0.27	0.64	-0.48	0.25	0.49	-0.08	0.2	0.3	0.59
INT	0.6	<b>0.01</b>		<b>0.72</b>	<b>0.77</b>	-0.69	0.43	0.56	-0.13	0.33	0.19	0.67
ALT	0.5	0.5	<b>0.05</b>		0.43	<b>-0.55</b>	0.42	0.31	-0.15	0.3	0.24	0.58
LAT	0.7	0.09	<b>0.03</b>	0.3		-0.87	0.5	0.5	0.16	0.41	0.08	0.52
LON	0.9	0.22	0.06	0.16	<b>0.005</b>		-0.53	-0.48	-0.15	-0.42	-0.04	-0.65
NES	0.9	0.56	0.29	0.3	0.21	0.18		<b>0.87</b>	0.2	<b>0.74</b>	0.46	<b>0.77</b>
NFL	0.62	0.22	0.14	0.5	0.21	0.22	<b>0.005</b>		0.32	<b>0.82</b>	0.48	0.82
LES	0.14	0.84	0.77	0.72	0.71	0.72	0.64	0.44		<b>0.76</b>	0.53	0.25
LIN	0.17	0.64	0.42	0.48	0.32	0.3	<b>0.04</b>	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>		0.67	<b>0.72</b>
LPE	0.7	0.47	0.65	0.56	0.84	0.93	0.25	0.22	0.17	0.07		0.64
DBU	0.9	0.12	0.07	0.13	0.2	0.08	<b>0.026</b>	<b>0.01</b>	0.55	<b>0.04</b>	0.08	
NFR	0.62	0.34	0.24	0.65	0.22	0.25	<b>0.006</b>	<b>0</b>	0.46	<b>0.02</b>	0.44	0.06
NSE	<b>0.01</b>	0.73	0.18	0.07	0.43	0.7	0.38	0.32	0.56	0.16	0.35	0.43
SFR	0.054	0.5	0.86	0.3	0.63	0.97	0.72	0.93	0.43	0.44	0.53	0.86

### **Relación entre la frecuencia de cromosomas B y los caracteres fenotípicos**

Los coeficientes de correlación de Pearson entre prevalencia de Bs y las diferentes variables fenotípicas, reproductivas y geográficas mostraron un valor significativo únicamente con el número de semillas ( $r = 0.82$ ,  $p = 0.01$ ). No se encontró ninguna otra relación entre la prevalencia de Bs y otras variables vegetativas o geográficas (Tabla 2.7).

### **Relación morfológica entre poblaciones**

En el dendrograma de la Figura 2.4, se muestran las relaciones jerárquicas entre poblaciones estudiadas según sus rasgos morfológicos. Podemos ver como aparece un clúster formado por Palma (+B) y Tajea (0B), y otro por el resto de las poblaciones que a su vez se subdivide en otros dos: uno con Tapia (+B), Jobo (0B) y Umbral (+B), y otro con Chorro (0B), Torcal (+B) y Pinos (0B). Por tanto, no se detecta un patrón claro de semejanza morfológica que separe poblaciones +B y 0B.



**Figura 2.4.** Dendrograma de las ocho poblaciones de *P. autumnale* estudiadas, construido con la matriz de distancias euclídeas y de Manhattan entre las variables cuantitativas NES, LES, LIN, NFL, LPE y DBU.

### **Relación entre caracteres fenotípicos y variables geográficas**

Sólo apareció una relación significativa entre el índice de integración fenotípica (*INT*) y la altitud. El resto de las variables no mostraron ninguna relación significativa en el análisis de regresión.

### **Relación entre distancias fenotípicas y distancias geográficas**

La matriz de distancias geográficas entre poblaciones (Tabla S2.5) y las matrices de distancias fenotípicas (Tabla S2.6) no mostraron correlación significativa (test de Mantel,  $r = -0.1838$ ,  $p = 0.685$ ). Tampoco se encontró relación entre las distancias en frecuencia de Bs (Tabla 2.3) y las distancias geográficas entre poblaciones (Tabla S2.3). Para este cálculo se utilizó tanto la matriz de distancias entre todas las poblaciones como la matriz reducida solo para las poblaciones con presencia de Bs.

### **Discusión**

Los cromosomas B son parásitos genómicos que representan una carga para los individuos portadores (Östergren 1945) por lo que es razonable pensar que sólo aquellas poblaciones que muestran ciertas características fenotípicas, genéticas y ecológicas serán capaces de albergar cierta frecuencia de cromosomas B sin que la población sufra efectos negativos importantes (Camacho 2005). En apoyo de esta hipótesis, en *P. autumnale* hemos observado que varios caracteres relacionados con el éxito reproductivo (NFL, NFR, NSE, SFR, FRU, FER) mostraban todos ellos valores más altos en las poblaciones +B que en las 0B, tal como se esperaría si las plantas con B vivieran en un hábitat más favorable. Puesto que el número medio de semillas puede considerarse como un indicador directamente relacionado con la capacidad reproductiva, las poblaciones que producen mayor número medio de semillas serán aquellas que se encuentran en un hábitat más idóneo y es esperable, por tanto, que puedan resistir mejor los efectos negativos que pudieran producir los Bs en los individuos portadores. También el hecho de que las plantas de poblaciones con Bs tengan medias con valores altos para caracteres indicadores de calidad ambiental (tamaño de planta, bulbos, número de flores) nos hacen suponer que estas poblaciones se encuentran bien adaptadas a su ambiente y que éste no impone una restricción muy importante en la adquisición de los recursos que necesitan (Chapin 1991). Lo mismo podemos decir de los caracteres relacionados con el éxito reproductivo (producción de frutos, producción de semillas), puesto que éstos aumentan con el incremento en la disponibilidad de recursos (Lechowicz and Blais 1988), y son precisamente las poblaciones +B las que poseen los valores medios más elevados. Todo esto sugiere que ciertas condiciones ambientales, aún no identificadas, favorecen que determinadas poblaciones puedan albergar una mayor frecuencia de cromosomas Bs, siempre y cuando los Bs lleguen a la población.

En la literatura se han reportado tanto efectos de los Bs sobre el vigor (Müntzing 1943, 1966, Kishikawa 1965, Bougourd and Jones 1997) como su ausencia (Plowman and Bougourd 1994). En *P. autumnale* no hemos encontrado relación entre la presencia o frecuencia de Bs y los caracteres fenotípicos relacionados con el vigor (LES, LIN, DBU y NFL). Y obtuvimos el mismo resultado cuando consideramos el fenotipo de forma

integrada. Es conocido que las plantas que muestran unos altos valores de integración fenotípica, es decir, una alta correlación entre rasgos, desarrollan más eficientemente sus funciones (Berg 1960, Armbruster et al. 1999). Aunque es sabido que la correlación entre rasgos puede ser alterada por ciertas condiciones ambientales (Schlichting 1989, Pigliucci 2003) y que estos pueden asimismo cambiar entre ambientes (Waitt and Levin 1993), no hemos encontrado relación entre los índices de integración fenotípica calculados,  $I_r$  e  $INT$ , y la frecuencia de Bs. Tanto  $I_r$  como  $INT$  alcanzan valores muy bajos en las poblaciones estudiadas, situándose por debajo del 20 % en la mayoría de las poblaciones. En este sentido, hemos de decir que no existen diferencias significativas en los valores de los índices de integración fenotípica calculados para los caracteres analizados entre poblaciones +B y 0B.

En el área de estudio hemos encontrado cromosomas Bs en sólo cuatro de las catorce poblaciones de *P. autumnale* estudiadas (Figura 2.1), las cuales se encuentran muy cercanas entre sí geográficamente (Tapia, Umbral y Torcal, además de la Palma) localizadas en dirección suroeste de la misma, no existiendo grandes barreras geográficas que pudieran impedir el flujo génico entre estas poblaciones. Las cuatro poblaciones +B están rodeadas por poblaciones sin Bs tanto al oeste (Chorro) como al este (Riofrío, etc).

Para explicar la distribución observada de cromosomas B podemos contemplar dos escenarios alternativos. En el primero, la distribución de los cromosomas B en la zona podría haber sido más amplia en el pasado, pero como consecuencia de ciertos eventos ecológicos y/o evolutivos a escala poblacional, ha quedado restringida a la situación actual. Si esta hipótesis fuera válida deberíamos encontrar Bs en otras poblaciones, pero sin seguir un patrón de agregación espacial, ya que la extinción del cromosoma B en cada población se esperaría que se hubiese producido de forma independiente. Sin embargo, la distribución observada (con tres de las cuatro poblaciones +B situadas muy cercanas en el espacio, como se observa en la Figura 2.1 y la Tabla S2.3) parece indicar una agrupación espacial clara de las poblaciones con B. El segundo escenario propone que los Bs aparecieron en una de las cuatro poblaciones +B y, desde ese punto de origen, se produjo la invasión hacia otras poblaciones cercanas. La mayor frecuencia de cromosomas B en la población de La Palma sugiere que ésta fue la primera que albergó cromosomas B, pues se conoce su presencia desde los años 80 del siglo XX (Ruíz-Rejón et al. 1980a, 1980b), y desde ella se pudieron extender a otras poblaciones cercanas. Estudios previos (Lanzas et al. 2018) han mostrado que la frecuencia de Bs en la Palma ha aumentado en el transcurso de las últimas décadas y que en la actualidad puede encontrarse en un equilibrio dinámico de acuerdo con la teoría casi-neutra de la evolución de los cromosomas B (Camacho et al. 1997). Si el planteamiento anterior es correcto, los cromosomas B se habrían dispersado en dirección suroeste, ya que las poblaciones que contienen Bs se sitúan en esta dirección y muy cercanas a la población de La Palma que consideramos fuente por tener una

frecuencia mayor de Bs. Sin embargo, aún no conocemos la dirección ni la intensidad del flujo génico de esta especie en la zona, que sería una información clave para probar la hipótesis anterior.

No conocemos si la conectividad por polen en las poblaciones +B es mayor que en las OB, lo que beneficiaría la transmisión de los Bs entre individuos y entre poblaciones cercanas. Conocemos por trabajos previos (Lanzas et al. 2018) que en *P. autumnale* la acumulación de los Bs se produce a través del gametofito masculino, esto es, granos de polen, y que los Bs tienen una tasa de transmisión a través de éste de  $k_B=0.65$ . Una mayor frecuencia de Bs podría ser esperable en aquellas poblaciones con una mayor producción de semillas, como ocurre en las poblaciones +B estudiadas. La conectividad funcional en plantas a través del polen va a depender de varios factores, tales como la identidad, densidad y comportamiento de la comunidad de polinizadores, así como de otros factores abióticos, como velocidad y dirección del viento predominante, etc. (Auffret et al. 2017). *P. autumnale* es una especie de polinización otoñal y se ha comprobado que este tipo de plantas utilizan estrategias mixtas para la dispersión del polen, tales como insectos polinizadores además del viento o la lluvia (Dafni 1996). Por todo esto sería muy interesante estudiar en próximos trabajos las comunidades de polinizadores de la especie en las poblaciones +B y OB para determinar si existen diferencias en su diversidad y funcionalidad.

En cualquier caso, la frecuencia de Bs sufre un cambio abrupto en el ámbito geográfico aquí estudiado. Esta característica también se ha observado en otras poblaciones de organismos con poblaciones con Bs como en *Allium schoenoprasum* (Bourgard and Parker 1975 y 1979b) y en los saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt and Brown 1970) y *Eyrepopocnemis plorans* (Cabrero et al. 1997). En la población estudiada en el río Wye de *A. schoenoprasum*, la frecuencia de Bs pasa del 17 % al 0 % en menos de 2 km de distancia. Este cambio brusco fue explicado en base a la estrategia reproductiva que presenta *A. schoenoprasum*, ya que la dispersión de bulbos y semillas se produce aguas abajo del río, mientras que el desplazamiento de los polinizadores sucede aguas arriba (Bougourd and Parker 1975, 1979b). En el caso de *M. maculatus* de la población de East Anglia, se pasa de una frecuencia de Bs del 40 % a 0 % en 3.5 km, lo que se explica parcialmente por el gradiente climático, además de otros factores intrínsecos a la propia población (Hewitt and Brown 1970). Por último, en *E. plorans* la frecuencia de Bs finaliza abruptamente en las poblaciones estudiadas en cuatro afluentes del río Segura. Esta distribución se explica por la presencia de barreras geográficas infranqueables para la especie (Cabrero et al. 1997) y por aislamiento por distancia (Perfectti et al. 2004).

En el caso de *P. autumnale*, la dispersión por semillas se produce a escala local, ya que la planta muestra principalmente un mecanismo de dispersión autócora, aunque también se ha detectado dispersión mediante hormigas de la especie *Messor barbatulus*

en pastizales castellanos (Azcárate et al. 2005). La dispersión a más distancia de los cromosomas B puede producirse a través del polen, ya que éste es el vehículo que utilizan los Bs para la acumulación preferencial del B en la especie ( $k_B = 0.65$ ; Lanzas et al. 2018). Además, las poblaciones se sitúan en localidades separadas espacialmente por amplias zonas inhóspitas para la especie. Este factor unido al escaso flujo génico puede explicar la interrupción brusca de la frecuencia de Bs en el sistema analizado.

Por otra parte, ninguno de los factores geográficos considerados en este trabajo tales como la altitud, latitud o longitud, parecen estar relacionados con la frecuencia de Bs en las poblaciones estudiadas de *P. autumnale*. Similares resultados se han obtenido en estudios previos tanto en animales como vegetales. Por ejemplo, en la planta *Xanthisma texanum*, y a pesar de cuantificar numerosas variables ambientales, no se encontró ninguna relación entre éstas y la frecuencia de Bs (Semple 1989). Lo mismo sucede en *Aegilops mutica* en Turkia e Irán, donde tampoco apareció relación entre la frecuencia de plantas con Bs y diversos factores ambientales relacionados con la topografía y la vegetación (Ohta and Saruhashi 1999). Evidentemente, la distribución de los Bs podría estar relacionada con otros factores ambientales que no hemos considerado en este estudio, tales como características edáficas o de disponibilidad de agua, relaciones que sí se han encontrado en otras especies de plantas como *Phleum phleoides*, en donde existe una marcada correlación negativa entre la frecuencia de Bs y el contenido en materia orgánica del suelo (Bosemark 1967), y en *Centaurea scabiosa*, donde se ha encontrado correlación positiva entre la humedad ambiental y la frecuencia de Bs (Fröst 1958). Es posible que en nuestro caso no hayamos tenido potencia estadística suficiente para encontrar estas relaciones, puesto que el estudio fue hecho a una escala geográfica pequeña que implica que no deben existir grandes diferencias ambientales entre las poblaciones estudiadas. Este hecho llama la atención sobre la posibilidad de que las diferencias en frecuencia de Bs entre las poblaciones analizadas sean el resultado de simple contingencia histórica determinada por la llegada del B a la primera población y su diseminación posterior a poblaciones contiguas, tal como propone el segundo escenario mencionado arriba. Un análisis de marcadores genéticos nucleares y plastidiales probablemente arrojaría mucha luz sobre si la historia de las poblaciones de la zona analizada es reciente y si es congruente con la distribución del B por contagio entre poblaciones cercanas, un hecho que se vería reflejado en los marcadores mencionados.

Finalmente, ninguno de los análisis realizados en este estudio, tanto uni como multivariantes, para determinar si existe relación entre caracteres fenotípicos y frecuencia de Bs ha arrojado resultados significativos, por lo que podemos concluir que no existe relación entre la presencia de cromosomas B y los caracteres cuantitativos estudiados, al menos con el tamaño muestral aquí utilizado. Los resultados obtenidos tampoco implican que otros rasgos no estudiados aquí no puedan estar afectados por la presencia de cromosomas B, pero si es cierto que los rasgos relacionados con el vigor

representados en nuestro caso por LES, LIN, DBU y NFL no se han visto afectados por la presencia de Bs.

## Referencias

- Almeida da Silva R, Rocha J, Silva A, García-Cabral I, Amich F and Crespi AL. 2014. The Iberian species of *Scilla* (Subfamily Scilloideae, Family Asparagaceae) under climatic change scenario in Southwestern Europe. *Systematic Botany*, 39(4).
- Ayonoadu U and Rees H. 1968. The influence of B-chromosomes on chiasma frequencies in Black Mexican Sweet Corn. *Genetica*. 1968, Volume 39, [Issue 1](#), pp 75–81.
- Armbruster WS, Di Stilio US, Tuxill JD, Flores TC and Velázquez Runk JL. 1999. Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine Neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation-pleiades concept. *American Journal of Botany*, 86(1):39-55.
- Armbruster WS, Pelabon C, Bolstad GH and Hansen TF. 2015. Integrated phenotypes: understanding trait covariation in plants and animals. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369.
- Ainsworth Charles C. 1980. The populations cytology of *Scilla autumnalis*. PhD. Thesis. Queen Mary College. University of London
- Auffret A, Rico Y, Bullock JM, Hooftman DAP, Pakeman RJ, Soons MB, Suárez-Esteban A, Traveset A, Wagner HH and Cousins SAO. 2017. Plant functional connectivity – integrating landscape structure and effective dispersal. *Journal of Ecology* 105:1648-1656.
- Azcárate FM, Arqueros L, Sanchez AM and Peco B. 2005. Seed and fruit selection by harvester ants, *Messor barbatus*, in Mediterranean grassland and scrubland. *Functional Ecology* 19:273-283.
- Berg RL. 1960. The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution* 14:171-180.
- Beukeboom Leo W. 1994. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome conference. *Heredity* 73. 328-336.
- Bougourd SM and Jones RN. 1997. B chromosomes: a physiological enigma. *New Phytologist* 137:43-54.
- Bougourd SM and Parker JS. 1975. The B chromosome system of *Allium schoenoprasum*. I. B-distribution. *Chromosoma*. 53. 273-282
- Bougourd SM and Parker JS. 1979a. The B chromosome system of *Allium schoenoprasum*. II. Stability, inheritance and phenotypic effects. 1979. *Chromosoma*. 75. 369-383.
- Bougourd SM and Parker JS. 1979b. The B-chromosome system of *Allium schoenoprasum* III. An abrupt change in B-frequency. *Chromosome* 75:385-392,

- Borisov YM and Zhigarev IA. 2018. B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* Thomas 1907 (Rodentia, Muridae). Genes. Oct, 9(19):472. doi: [10.3390/genes9100472](https://doi.org/10.3390/genes9100472)
- Bosemark NO. 1956a. On accessory chromosomes in *Festuca pratensis* III. Frequency and geographical distribution of plants with accessory chromosomes. Hereditas 42. issue1-2: 189-210.
- Bosemark NO. 1956b. Cytogenetics of accessory chromosomes in *Phleum phleoides*. Hereditas, vol 42. Issue 3-4:443-466.
- Bosemark NO. 1967. Edaphic factors and the geographical distribution of accessory chromosomes in *Phleum phleoides*. Hereditas. 57, issue 1-2: 239-262. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1967.tb02105.x
- Brown LM and Jones RN. 1976. B-chromosomes effects at meiosis in *Crepis capillaris*. Caryologia, 41:493-506.
- Burt A and Trivers R. 1998. Selfish DNA and breeding system in flowering plants. Proc. R. Soc. Lond. B. 265:141-146.
- Cabrero J, López-León M D, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A and Camacho JPM. 1997. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, long a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*, 5, 194–198
- Cane WP.1993. The ontogeny of post-cranial integration in the common tern, *Sterna hirundo*. *Evolution*, 47, 844–854. doi:10.2307/2409980
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC and Cabrero J. 1997. Populations dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*. Vol 149. No 6. 1030-1050.
- Camacho JPM, Sharbel TF and Beukeboom L. 2000. B-chromosomes evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355:163-178.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. Pp. 223–286 in T. R. Gregory, ed. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, CA.
- Camacho JPM, Shaw MW, Cabrero J, Bakkali M, Ruiz-Estevez M, Ruiz-Ruano FJ, Martín-Blázquez R and López-León MD. 2015. Transient microgeographic clines during B chromosomes invasions. *The American Naturalist*. 186, nº 5.
- Chapin FS III. 1991. Integrated responses of plants to stress. A centralized system of physiological responses. *Bioscience* vol 41. No1: 29-36.
- Chen Q, Jahier J and Cauderon Y. 1993. The B chromosome system of Inner Mongolian *Agropyron* Gaerth. 1. Distribution, morphology and cytological behaviour. *Caryologia*, Vol 46, issue 4:245-260.

- Cheverud JM. 1988. A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution*, 42(5):958-968.
- Confalonieri VA. 1995. Macrogeographic patterns in B-chromosomes and inversion polymorphisms of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis*. *Gen. Sel Evol* 27:305-311.
- De-Yuang H. 1982. Cytotype variation and polyploidy in *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae). *Hereditas* 97:227-235.
- Dafni A, Cohen D and Noy-Mier I. 1981a. Life-Cycle variation in geophytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol 68, No 4:652-660.
- Dafni A, Shmida A and Avishai M. 1981b. Leafless autumnal flowering geophytes in the Mediterranean region – phytogeographical, ecological and evolutionary aspects. *Pl. Syst. Evol.* 137, 181-193.
- Dafni A. 1996. Autumnal and winter pollination adaptations under Mediterranean conditions. *Boccone*, 5:171-181.
- Evans GM and Macefield AJ. 1973. The effects of B chromosomes on homoeologous pairing in species hybrids. *Chromosoma*, 41:63-73.
- Fröst S. 1958. The geographical distribution of accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. *Hereditas* 44 (1):75-111.
- Ghaffari SM and Bidmeshkipoor A. 2002. Presence and behaviour of B-chromosomes in *Acanthophyllum laxiusculum* (Caryophyllaceae). *Genetica* 115:319-323.
- Guillén A and Ruiz-Rejón M. 1984. Structural variability and chromosome numbers in natural populations of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Pl. Syst. Evol.* 144, 201-207.
- Granier C and Vile D. 2014. Phenotyping and beyond: modelling the relationships between traits. *Current opinion in plant biology*. 18:96-102.
- Ghazoul J. 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 80(3):413-43. doi: 10.1017/s1464793105006731. PMID: 16094807.
- Hamouche Y, Amirouche N, Missiet MT and Amirouche R. 2010. Cytotaxonomy of autumnal flowering species of Hyacinthaceae from Algeria. *Plant Syst. Evol.* 285:177-187.
- Hewitt GH and Brown PM. 1970. The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus*. V. A steep cline in East Anglia. *Heredity* 25:363-371.
- Hewitt G and Ruscod C. 1971. Changes in microclimate correlated with a cline for B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Animal Ecology*, Vol 40, No 3:753-765.
- Holderegger R, Buehler D, Gugerli F and Manel S. 2010. Landscape genetics of plants. *Trends in plant science*. Volume 15, Issue 12 : 675-683.

- Jackson RC and Newmark P. 1960. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. Science, Vol 132:1316-1317.
- Jang TS, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leitch AR, Speta F and Weiss-Schneeweiss H. 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). BMC Evolutionary Biology 13:130.
- Jones RN. 1991. B-chromosome drive. The American Naturalist. Vol 137, No 3:430-442.
- Jones N. 1995. B-chromosomes in plants. Tansley Review no. 85. New Phytol. 131: 411-434.
- Jones RN, González-Sánchez M, González-García, M, Vega, JM and Puertas MJ. 2008. Chromosomes with a life of their own. Cytogenet Genome Res. 120:265-280.
- Jones N. 2012. B chromosomes in plants. Plant Biosystems, Vol. 146 (3) :727–737.
- Jones RN and Rees H. 1982. B chromosomes. Academic Press. 266 pp.
- Kayano H, Sannomiyat M and Nakamura K. 1970. Cytogenetic studies on natural populations of *Acrida lata*. I. Local variation in the frequency of B chromosomes. Heredity 25:113-122.
- Kishikawa H. 1965. Cytogenetic studies of B chromosomes in rye, *Secale cereale* L., in Japan. Agr. Bull. Saga Univ. 21:1-81.
- Lanzas P, Perfectti F, Garrido-Ramos M, Ruiz-Rejón C, González-Sánchez M, Puertas M and Camacho JPM. 2018. Long-term monitoring of B-chromosome invasión and neutralization in a population of *Prospero autumnale* (Asparagaceae). Evolution.72(6):1216-1224. doi: 10.1111/evo.13501.
- Lechowicz MJ and Blais PA. 1988. Assessing the contribution of multiple interacting traits to plant reproductive success: environmental dependence. J. EVOL. BIOL 1:255-273.
- Levin DA, Palestis BG, Jones RN and Trivers R. 2005. Phyletic hot spots for B chromosomes in Angiosperms. Evolution, 59(5): 962-969.
- Lía V V, Confalonieri V A and Poggio L. 2007. B chromosomes polymorphism in maize landraces: adaptive vs demographic hypothesis of clinal variation. Genetics 177:895-904.
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD. 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. Science, vol 254:1773-1776.
- Müntizing A. 1943. The formation of chromocentres in interkinetic nuclei of maize by knobs and B chromosomes. Journal of Heredity 34:195-198
- Müntizing A. 1966. Accessory chromosomes. Bulletin of the Botanical Society of Bengal 20:1-15
- Néo DM, Moreira Filho O and Camacho JPM. 2000. Altitudinal variation for B chromosomes frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. Heredity 85 (2):136-141.
- Ohta S and Saruhashi Y. 1999. Geographical distribution of B chromosomes in *Aegilops mutica* Boiss., a wild relative of wheat. Hereditas 130 (2). 177-183.

- Oliver JL, Posse F, Martinez-Zapater JM, Enriquez AM and Ruiz-Rejón M. 1982. B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosome* 85: 399-403.
- Östergren G. 1945. Parasitic nature of extra fragment chromosome. *Bot. Notiser* 1945:157-168.
- Östergren G. 1947. Heterochromatic B chromosomes in *Anthoxanthum*. *Hereditas*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1947.tb02804.x>.
- Palestis B G, Trivers R, Burt A and Jones R N. 2004. The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenet. Genome Res* 106:151-158.
- Parker JS, Jones GH, Edgar IA, Whitehouse C. 1991a. The population cytogenetics of *Crepis capillaris*. IV. The distribution of B-chromosomes in British populations. *Heredity* 66:211-218.
- Parker JS, Lozano R, Taylor S and Ruiz-Rejón, M. 1991b. Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. *Heredity* 67. 287-297.
- Pereira HS, Delgado M, Viegas W, Rato JM, Barão A and Caperta AD. 2017. Rye (*Secale cereale*) supernumerary (B) chromosomes associated with heat tolerance during early stages of male sporogenesis. 2017. *Annals of Botany*. 119(3):325-337. Doi: 10.1093/aob/mcw206.
- Perfectti F and Werren J H. 2001. The interspecific origin of B chromosome: Experimental evidence. *Evolution* 55(5). 1069-1073.
- Perfectti F, Pita M, De La Vega CG, Gosálvez J, Camacho JPM. 2004. Spatio-temporal dynamics of a neutralized B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 376-385.
- Pigliucci M. 2003. Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology letters* 6:265-272.
- Plowman AB and Bougourd SM. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72:587-593.
- Puertas MJ, Romera F and de la Peña A. 1985. Comparison of B chromosomes effects on *Secale cereale* and *Secale vavilovii*. *Heredity*, 55:229-234
- R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing (<http://www.R-project.org>)
- Randolph LF. 1941. Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. *Genetics*, 26:608-631
- Rosetti N, Rebagliati P, Remis MI. 2010. Supernumerary chromosome variants in *Dichroplus elongatus* (Acrididae): fluorescent banding and cline variation pattern. *Journal of Orthoptera Research*. *Journal of Orthoptera Research* 10(2):216-265.

- Ruiz-Rejón M, Oliver JL and Ruiz-Rejón C. 1980a. Variabilidad cromosómica en *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) de la península ibérica. Bol. Soc. Brot. Sér. 2, 58: 555-562.
- Ruiz-Rejón M, Posse F and Oliver JL. 1980b. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (liliaceae): Effects at the isozyme level. Chromosome 79:341-348.
- Sapre AB and Deshpande DS. 1987. Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. Journal of Heredity, 78(3):191-196.
- Semple JC. 1989. Geographical distribution of B chromosomes of *Xanthisma texanum* (Compositae: Astereae). II. Local variation within and between populations and frequency variation through time. *American Journal of Botany*, 76, No. 5 :769-776. DOI: 10.2307/2444424
- Shaw M W. 1983. Rapid movement of a B-chromosome frequency cline in *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). Heredity, 50(1):1-14.
- Schlichting CD. 1989. Phenotypic integration and environmental change: ¿What are the consequences of differential phenotypic plasticity of traits?, *BioScience*, Volume 39, Issue 7: 460–464, <https://doi.org/10.2307/1311138>
- Staub RN. 1987. Leaf striping correlated with the presence of B chromosome in maize. The Journal of Heredity, 78:71-74.
- Trivers R, Burt A, Palestis BG. 2004. B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome* 47: 1-8.
- Tsurusaki N and Shimada T. 2004. Number of B chromosomes and external morphology in *Psathyropus tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Cytogenet Genome Res* 106:365–375. DOI: 10.1159/000079314
- Vaughan HE, Taylor S and Parker JS. 1997. The ten cytological races of the *Scilla autumnalis* species complex. Heredity, 79. 371-379.
- Vosa CG. 1983. The ecology of B-chromosomes in *Listera ovata* (L.) R. Br. (Orchidaceae). *Caryologia*, 36 (2): 113-120.
- Wagner GP. 1984. On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices: evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *J. Math. Biol.* 21:77-95.
- Waitt DE and Levin DA. 1993. Phenotypic integration and plastic correlations in *Phlox drummondii* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* 80 (10): 1224-1233.
- Wilson EB. 1907. The supernumerary chromosome in Hemiptera. *Science*, Vol XXVI, No. 677: 871.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2020. *Community Ecology*

Package            Version            2.5-7.            URL            <https://cran.r-project.org>,  
<https://github.com/vegandevs/vegan>

Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen T L, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D. 2020. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics description A system for 'declaratively' creating graphics, based on ``The Grammar of Graphics''. URL <https://ggplot2.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/ggplot2> BugReports <https://github.com/tidyverse/ggplot2/issues>

Lê, S., Josse, J. & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*. **25(1)**. pp. 1-18.

## Material suplementario

**Tabla S2.1.** Valores medios de los caracteres vegetativos medidos en las poblaciones estudiadas de *P. autumnale* en 2015. Los valores se expresan en mm. Es: error estándar

**Tabla S2.2.** valores medios de los caracteres reproductivos medidos en las poblaciones estudiadas en 2015 de *P. autumnale*. Es: error estándar

**Tabla S2.3.** Coeficientes de variación de cada una de las variables medidas en las ocho poblaciones de *Prospero autumnale* estudiadas durante 2015.

**Tabla S2.4.** Número de cromosomas B encontrados y parámetros de frecuencia en las distintas poblaciones de *P. autumnale* estudiadas en los años 2013 y 2015. Las distribuciones de Bs en las distintas poblaciones se han comparado mediante el test de Kruskal-Walis, dándose los valores de la  $X^2$  calculada y el p-valor. Las distribuciones entre años se han comparado mediante el test de Mann-Witney, y en ningún caso se ha encontrado diferencias significativas entre años

**Tabla S2.5.** Correlaciones entre pares de caracteres vegetativos en las diferentes poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale* durante 2015. Los valores en negrita son los que presentan un valor de  $p < 0.05$  para el coeficiente de correlación de Pearson(r)

**Tabla S2.6.** Distancia geográfica en línea recta en km entre las ocho poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale*.

**Tabla S2.7.** Distancia fenotípica entre poblaciones de *Prospero autumnale* estudiadas en 2015. Para el cálculo de las distancias fenotípicas se han usado los rasgos NES, LES, LIN, NFL, DBU.

**Tabla de datos de las variables fenotípicas estudiadas en las poblaciones de *P. autumnale*:**

<https://bio165.ugr.es/descargas/descargar/387/>

**Tabla S2.1.** Valores medios de los caracteres vegetativos medidos en las poblaciones estudiadas de *P. autumnale* en 2015. Los estándar

Población	N	Número de escapos		Longitud del escapo		Longitud inflorescencia		Tamaño planta		Longitud del pedicelo	
		media	es	media	es	media	es	media	es	media	es
Palma	39	1.26	0.08	173.9	7.63	78.2	4.03	252.1	10.6	14.61	0.53
Tapia	35	1.17	0.06	109.66	4.69	52.19	3.35	161.81	7.28	13.82	0.6
Umbral	67	1.36	0.07	105.3	3.23	52.12	2.81	157.42	4.84	12.9	1.3
Torcal	31	1.16	0.07	102.46	4.03	48.75	2.57	151.21	5.24	11.1	0.41
Jobo	26	1.27	0.1	104.34	5.96	52.27	4.37	157.11	7.68	13.96	0.67
Tajea	35	1.54	0.09	138.78	5.06	74.59	4.61	213.37	8.07	14.28	0.61
Pinos	29	1.07	0.05	117.98	4.19	41.11	3.51	159.09	6.24	10.91	0.67
Chorro	33	1	0	126.01	5.6	41.61	1.94	167.62	6.75	13.53	0.6

**Tabla S2.2.** valores medios de los caracteres reproductivos medidos en las poblaciones estudiadas en 2015 de *P. autumnale*. Es: error estándar

Población	N	Número de frutos		Número de semillas		Número de semillas por fruto		Fructificación		Fert.
		media	es	media	es	media	es	media	es	
Palma	39	8.02	0.91	23.82	2.13	3.24	0.2	0.51	0.03	0.28
Tapia	35	7.49	0.71	18.9	2.34	1.33	0.14	0.51	0.04	0.22
Umbral	67	7.06	0.82	20.46	1.61	3.26	0.18	0.53	0.03	0.29
Torcal	31	7.74	0.92	17.64	2.99	1.35	0.17	0.57	0.04	0.23
Jobo	26	5.35	0.63	15.81	1.9	1.43	0.18	0.43	0.03	0.24
Tajea	35	12.8	1.06	13.03	2.02	0.69	0.11	0.63	0.04	0.12
Pinos	29	4.65	0.56	8.28	1.11	0.92	0.11	0.49	0.04	0.15
Chorro	33	3.03	0.27	9.68	0.77	1.34	0.13	0.42	0.04	0.22

**Tabla S2.3.** Coeficientes de variación de cada una de las variables medidas en las ocho poblaciones *autumnale* estudiadas durante 2015.

POB	NES	NFL	LES	LIN	LTO	LPE	DBU	DIN	NFR	NSE
Palma	39.68	58	27.41	32.2	26.26	22.79	28.02	43	70.69	55.88
Tapia	32.48	51.01	25.28	37.94	26.62	25.62	21.79	43.33	56.07	16.9
Umbral	41.91	60.23	25.08	44.15	25.15	82.64	26.79	46.15	95.18	12.22
Torcal	31.9	38	21.9	29.35	19.28	20.72	29.5	23.21	66.02	17.96
Jobo	41.73	62.89	29.14	42.66	24.93	24.57	34.46	36	59.63	19.61
Tajea	36.36	51.01	21.58	36.57	22.37	25.07	23.63	75.76	48.83	16.9
Pinos	24.3	32.15	19.14	45.95	21.12	32.91	17.23	32	64.84	18.57
Chorro	0	32.99	25.55	26.82	23.13	25.28	23.94	23.68	51.16	17.41

**Tabla S2.4.** Número de cromosomas B encontrados y parámetros de frecuencia en las distintas poblaciones de *P. autumnale* estudiadas. Las distribuciones de Bs en las distintas poblaciones se han comparado mediante el test de Kruskal-Wallis, dándose los valores de la  $X^2$  y los grados de libertad. Entre años se han comparado mediante el test de Mann-Witney, y en ningún caso se ha encontrado diferencias significativas entre años.

Año	Población	Número de cromosomas B						Prevalencia de B			Media de B		
		N	0B	1B	2B	3B	4B	Media	CI+95%	CI-95%	Media	CI+95%	CI-95%
2013	Palma	54	32	7	10	5	0	0,42	0,54	0,28	0,77	1,06	0,5
	Tapia	30	22	4	0	1	3	0,26	0,43	0,11	0,63	1,1	0,17
	Umbral	20	16	3	0	1	0	0,2	0,38	0,2	0,3	0,62	0,02
							$X^2 = 3.5148$	df = 2	p = 0.1725	$X^2 = 3.6745$	df = 2	p = 0.1593	
2015	Palma	29	13	2	10	2	2	0,55	0,74	0,37	1,24	1,75	0,77
	Tapia	24	20	2	2	0	0	0,17	0,32	0,014	0,25	0,49	0,007
	Umbral	45	38	5	1	1	0	0,15	0,26	0,05	0,22	0,39	0,05
	Torcal	15	11	2	2	0	0	0,25	0,47	0,31	0,38	0,73	0,02
							$X^2 = 11.168$	df = 3	p = 0.01085	$X^2 = 14.113$	df = 3	p = 0.00275	

**Tabla S2.5.** Correlaciones entre pares de caracteres vegetativos en las diferentes poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale* durante 2015. Los valores en negrita son los que presentan un valor de  $p < 0.05$  para el coeficiente de correlación de Pearson(r)

Pares de rasgos	Palma	Tapia	Umbral	Torcal	Jobo	Tajea	Pinos	Chorro
NES-NFL	<b>0.466</b>	<b>0.839</b>	<b>0.499</b>	<b>0.537</b>	<b>0.591</b>	<b>0.705</b>	<b>0.568</b>	
NES-LES	-0.065	0.229	0.178	-0.32	<b>0.4</b>	0.006	-0.326	
NES-LIN	0.186	<b>0.454</b>	<b>0.341</b>	0.214	0.142	0.301	0.276	
NES-LPE	0.134	0.216	-0.036	-0.215	-0.092	0.129	0.113	
NES-DBU	<b>0.48</b>	<b>0.524</b>	<b>0.503</b>	0.322	<b>0.52</b>	<b>0.38</b>	-0.122	
NES-NFR	<b>0.463</b>	<b>0.551</b>	<b>0.426</b>	<b>0.598</b>	0.225	<b>0.51</b>	<b>0.537</b>	
NES-SFR	-0.043	-0.273	<b>-0.316</b>	-0.014	-0.228	<b>-0.365</b>	-0.029	
NFL-LES	0.195	<b>0.406</b>	0.137	0.068	0.16	0.2	0.124	<b>0.419</b>
NFL-LIN	<b>0.512</b>	<b>0.54</b>	<b>0.769</b>	<b>0.768</b>	<b>0.741</b>	<b>0.493</b>	<b>0.65</b>	<b>0.702</b>
NFL-LPE	0.122	<b>0.33</b>	0.039	0.075	0.14	0.195	<b>0.384</b>	0.13
NFL-DBU	<b>0.392</b>	<b>0.601</b>	<b>0.262</b>	<b>0.441</b>	<b>0.636</b>	<b>0.422</b>	0.285	<b>0.538</b>
NFL-NFR	<b>0.824</b>	<b>0.742</b>	<b>0.866</b>	<b>0.756</b>	<b>0.682</b>	<b>0.615</b>	<b>0.668</b>	0.25
NFL-SFR	<b>-0.441</b>	-0.225	<b>-0.32</b>	-0.146	<b>-0.383</b>	-0.302	-0.182	<b>-0.474</b>
LES-LIN	<b>0.614</b>	<b>0.634</b>	<b>0.28</b>	0.22	0.089	<b>0.391</b>	0.308	<b>0.477</b>
LES-LPE	<b>0.54</b>	<b>0.579</b>	0.11	0.214	0.313	<b>0.519</b>	<b>0.395</b>	0.264
LES-DBU	0.105	<b>0.516</b>	<b>0.363</b>	-0.029	<b>0.445</b>	0.155	0.107	<b>0.492</b>
LES-NFR	0.236	<b>0.4</b>	0.098	-0.16	-0.048	<b>0.392</b>	-0.052	0.108
LES-SFR	-0.13	0.015	<b>0.284</b>	-0.239	0.11	0.188	0.14	-0.138
LIN-LPE	<b>0.522</b>	<b>0.592</b>	0.125	<b>0.391</b>	<b>0.548</b>	<b>0.413</b>	<b>0.523</b>	<b>0.391</b>
LIN-DBU	<b>0.45</b>	<b>0.754</b>	<b>0.331</b>	<b>0.507</b>	<b>0.568</b>	<b>0.451</b>	0.271	<b>0.532</b>
LIN-NFR	<b>0.513</b>	<b>0.591</b>	<b>0.743</b>	<b>0.608</b>	<b>0.649</b>	<b>0.66</b>	<b>0.677</b>	0.205
LIN-SFR	<b>-0.315</b>	0.077	-0.178	-0.033	<b>-0.383</b>	0.092	0.118	-0.229
LPE-DBU	0.195	<b>0.454</b>	0.134	0.031	<b>0.398</b>	0.311	<b>0.443</b>	0.332
LPE-NFR	0.133	0.309	-0.068	-0.022	0.311	0.253	<b>0.376</b>	0.316
LPE-SFR	-0.082	0.124	0.208	0.116	<b>-0.224</b>	0.226	0.156	0.236
DBU-NFR	0.296	<b>0.427</b>	0.128	0.18	0.437	<b>0.447</b>	0.089	-0.062
DBU-SFR	-0.25	-0.218	-0.07	-0.323	-0.375	-0.253	-0.29	-0.183
NFR-SFR	-0.311	0.231	<b>-0.27</b>	<b>0.373</b>	0.009	0.07	0.32	0.22
<b>Media</b>	<b>0.205</b>	<b>0.372</b>	<b>0.199</b>	<b>0.176</b>	<b>0.228</b>	<b>0.272</b>	<b>0.233</b>	<b>0.216</b>

**Tabla S2.6.** Distancia geográfica en línea recta en km entre las ocho poblaciones estudiadas de *Prospero autumnale*.

	Palma	Tapia	Umbral	Torcal	Chorro	Tajea	Pinos
Tapia	7,474						
Umbral	6,545	3,396					
Torcal	26,973	25,046	22,217				
Chorro	51,424	49,091	45,500	24,576			
Tajea	6,023	11,158	12,221	31,580	57,315		
Pinos	11,151	16,428	17,792	37,643	62,552	6,182	
Jobo	9,303	15,879	13,837	22,814	47,768	12,319	17,404

**Tabla S2.7.** Distancia fenotípica entre poblaciones de *Prospero autumnale* estudiadas en 2015. Para el cálculo de las distancias fenotípicas se han usado los rasgos NES, LES, LIN, NFL, DBU,

	Palma	Tapia	Umbral	Torcal	Jobo	Tajea	Pinos
Tapia	69.34						
Umbral	73.47	5.59					
Torcal	77.42	8.89	5.22				
Jobo	74.36	6.3	3.9	6.36			
Tajea	36.29	37.7	41.84	45.86	42.63		
Pinos	67.64	15.79	17.67	18.08	18.53	42.4	
Chorro	61.08	21.6	24.31	25.84	25.15	39.53	8.82

## Capítulo 3

# Los cromosomas B del citotipo AA de la planta *Prospero autumnale* están enriquecidos en algunas familias de DNA satélite y transposones, cuya abundancia sugiere que el B llegó por introgresión desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>

### Resumen

La planta asparagácea *Prospero autumnale* constituye un complejo de especies morfológicamente crípticas que se diferencian principalmente por el número de cromosomas y el tamaño genómico. Se han descrito cuatro citotipos diploides y otros cuatro tetraploides. En los diploides, denominados AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>, se han encontrado cromosomas B cuya composición en DNA repetitivo ha sido analizada mediante hibridación in situ para DNA ribosómico 5S y 35S, y para un DNA satélite denominado PaB6. No obstante, hasta ahora no se había realizado un análisis cuantitativo del contenido en DNA repetitivo en estos cromosomas B. En este capítulo abordamos esta tarea para determinar la abundancia relativa de diferentes tipos de familias de DNA repetitivo en los cromosomas estándar (A) de los tres citotipos que albergan cromosomas B, y en individuos con B y sin B del citotipo AA. Para ello, hemos realizado secuenciación masiva de DNA genómico obtenido de 6 individuos: cuatro del citotipo AA (dos OB y dos con B), uno del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y otro del citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>, estos dos últimos carentes de cromosomas B. En primer lugar, nuestro análisis del satelitoma de la especie ha mostrado la presencia de 42 familias de DNA satélite, siendo una de ellas específica del cromosoma B del citotipo AA. La presencia de este satélite en los cromosomas A de los otros dos citotipos sugiere la posibilidad de que el B pudo haberse originado en cualquier citotipo. Además, las abundancias de los satélites de la superfamilia SF6 apuntan a B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> como el citotipo de procedencia de este cromosoma B. Los cromosomas B del citotipo AA resultaron estar enriquecidos en unas pocas familias de elementos repetitivos correspondientes a los satélites mencionados arriba más unos pocos elementos de tipo LTR, tanto Copia como Gypsy. En conjunto, las abundancias observadas sugieren orígenes independientes para el citotipo AA (a partir del B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, como se ha propuesto anteriormente) y para su cromosoma B. Ambos orígenes se produjeron durante el Pleistoceno, el de AA al quedar aislados sus antecesores (similares a B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>) en la Península Ibérica, como refugio glacial, mientras que el B llegó posteriormente al

citotipo AA procedente del B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> mediante introgresión, durante otro de los períodos de expansión geográfica asociados a los períodos interglaciares.

## Introducción

Los cromosomas B son elementos genéticos supernumerarios dispensables probablemente derivados de los cromosomas A pero que no recombinan con éstos (Beukeboom 1994, Camacho 2005), aunque también se ha propuesto su origen como resultado de hibridación intra- o interespecífica (Sapre and Deshpande 1987, Perfectti and Werren 2001, Camacho 2005, Jones et al. 2008, Ruban et al. 2017). Los cromosomas B se comportan como parásitos genómicos en la mayoría de las ocasiones, ya que suelen tener mecanismos de acumulación en la línea germinal que les permiten transmitirse a una tasa superior a la mendeliana (Jones 1991, 2017). Se han encontrado en el 15 % de los eucariotas, incluyendo muchas especies de animales, plantas y hongos (Jones and Rees 1982; Jones and Houben 2003; Camacho 2005; Jones 2017).

Es un hecho ampliamente constatado que los cromosomas B son ricos en DNA repetitivo de varios tipos, especialmente DNA satélite, DNA ribosómico y transposones (Camacho 2005). Mediante hibridación in situ se demostró la existencia de rDNA en los cromosomas B de algunas especies de plantas como, por ejemplo, *Crepis capillaris* (Maluszynska and Schweizer 1989), *Brachycome dichrosomatica* (Donald et al. 1995, Leach et al. 2004) y *Aegilops* (Ruban et al. 2014), y también de especies animales como *Haplochromis obliquidens* (Poletto et al. 2010) y *Eyprepocnemis plorans* (López-León et al. 1994, Ruiz-Estevez et al. 2012). Pero el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS; Egan et al. 2012, Goodwin et al. 2016, Ruban et al. 2017) y de herramientas bioinformáticas para el estudio a fondo del DNA repetitivo, tales como RepeatExplorer (Novák et al. 2010), ha permitido realizar estudios genómicos detallados en organismos no modelo, y así comenzar a abrir la caja negra del contenido en DNA de los cromosomas B, incluso cuantitativamente. Por ejemplo, en la planta *Plantago lagopus* se ha estimado que el DNA satélite PlsatB, que sólo es visible citológicamente en el cromosoma B, representa el 3.3 % del genoma en individuos con 1B y sólo el 0.09 % en individuos 0B (Kumke et al. 2016), sugiriendo que este DNA satélite es un componente mayoritario del B. Este hecho fue muy patente para el DNA satélite LmiSat02-176 de la langosta *Locusta migratoria*, que representa el 55 % del contenido en DNA del cromosoma B de esta especie (Ruiz-Ruano et al. 2018).

Otros ejemplos de análisis recientes, usando la tecnología NGS, se han reportado en especies animales como *Abraxis flavolineata* (Bueno et al. 2013), *Astyanax paraneae* (Silva et al. 2014), *Astatotilapia latifasciata* (Valente et al. 2014, Coan and Martis 2018), *Moenkhausia costae* (Utsonomia y col. 2016), *Eumigus monticola* (Ruiz-Ruano et al. 2017) y *Drosophila melanogaster* (Hanlon et al. 2018), y en plantas como *Secale cereale*

(Martis et al. 2012), *Prospero autumnale* (Emazdade et al. 2014 ), *Plantago lagopus* (Kour et al. 2014, Kumke et al. 2016, Dhar et al. 2019), maíz (Huang et al. 2016) y *Aegilops speltoides* (Ruban et al. 2014). Estos trabajos han revelado gran cantidad y tipos de elementos repetidos en los cromosomas B, sobre todo DNA satélite, transposones, retrotransposones LTR, DNA ribosómico, genes de histonas e incluso genes transcripcionalmente activos (Ma et al. 2016, Navarro-Dominguez et al. 2017).

En algunas especies se han observado secuencias repetitivas de DNA que parecen ser exclusivas de los cromosomas B, ya que no dan señal de FISH en los cromosomas A de la misma especie, lo que sugeriría un posible origen interespecífico del B. Los primeros casos fueron descritos en centeno para los DNAs satélites D1100 y E3900 (Sandery et al. 1990, Blunden et al. 1993). También se han reportado satélites específicos de los cromosomas B en la compuesta *Brachycome dichromatica*, denominados Bd49, Bdm29 y Bdm54 (Houben et al. 1997), y en el maíz, tales como CL-1 (Cheng and Lin 2004), ZmBs (Lamb et al. 2005) y Stark B (Lamb et al. 2007), éste último derivado de retrotransposones al igual que los elementos D1100 y E3900 del centeno. En la mayoría de los casos, sin embargo, los elementos repetitivos se localizan tanto en los cromosomas B como en los A, y estos casos pueden ser informativos sobre los cromosomas A que pudieron dar origen intraespecífico al cromosoma B. Así, por ejemplo, en el saltamontes *Eumigus monticola* se ha observado que el autosoma S8 comparte cuatro familias de DNA satélite con el cromosoma B, dos de las cuales son exclusivas de ambos cromosomas, sugiriendo así el posible origen del B a partir del S8 (Ruiz-Ruano et al. 2017). Igualmente, en *Locusta migratoria* se han propuesto los autosomas 8 y 9 como ancestros del B debido a que los genes para histonas se encuentran solamente en el cromosoma B y en el autosoma 8, y el satélite LmiSat53-47 se encuentra sólo en el B y en el autosoma 9 (Ruiz-Ruano et al. 2018). En el pez *Moenkhausia sanctaefilomenae* se han encontrado dos tipos de cromosomas B que contienen las mismas secuencias de DNA repetido compartidas con una región de la pareja de autosomas número 6 de la misma especie, sugiriendo que éste pudo ser el que dio origen a estos Bs (Utsunomia et al. 2016). Sin embargo, en el pez *Characidium gomesi* se ha propuesto que los Bs derivaron de los cromosomas sexuales (Serrano-Freitas et al. 2020).

Es un hecho bien constatado que los elementos transponibles (TE) son los elementos repetidos más abundantes en vegetales, variando desde el 3 % del genoma en *Utricularia gibba* hasta el 85 % en el maíz (Lee and Kim 2014). Su abundancia en plantas se ha asociado al tamaño del genoma (Bennetzen and Devos 2005, Zedek et al. 2010, Wendel et al. 2016), y se ha comprobado que juegan un papel importante en la adaptación al estrés abiótico y otras condiciones ambientales (Federoff 2000, Feschotte 2008, Lisch 2013, Li et al. 2018), así como en procesos de evolución y diversificación de distintas especies de angiospermas (Federoff 2000, Oliver et al. 2013, Wendel et al. 2016). Sobre esta base, se ha propuesto que los elementos transponibles se comportan

como una importante fuerza evolutiva que ha configurado en gran medida la estructura y composición de los genomas vegetales (Kejnovsky et al. 2012, El Baidouri et al. 2013, Lisch 2013).

*Prospero autumnale* es un complejo de especies que incluye cuatro citotipos diploides (AA, B<sup>5</sup>B<sup>5</sup>, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>) que se diferencian en el número cromosómico estándar, el tamaño genómico, y el patrón de distribución de DNA ribosómico y de un DNA satélite denominado PaB6 (Jang et al. 2013, Emadzade et al. 2014). Se han descrito frecuentes casos de poliploidía (Ainsworth 1981, Ebert 1993, Speta 1993, 2000) y de cromosomas B, que se han encontrado en tres de los cuatro citotipos diploides. El DNA satélite PaB6 está presente en los citotipos AA, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, y también en sus cromosomas B (Jang et al. 2013). Sin embargo, aún carecemos de una descripción exhaustiva de los diferentes DNA satélites presentes en esta especie, lo que permitiría intentar determinar el origen de estos cromosomas B.

El objetivo principal de nuestro trabajo es caracterizar la composición molecular de los cromosomas B de *P. autumnale* del citotipo AA, aplicando metodologías NGS y análisis bioinformáticos, en tres citotipos diploides, cuyas abundancias diferenciales en individuos con B y sin B nos permitan obtener indicios sobre el origen del cromosoma B. Los resultados indicaron la presencia de varios elementos repetitivos en el cromosoma B (del citotipo AA) cuya abundancia es más similar a la que muestran en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> que en el propio AA, por lo que sugerimos que los cromosomas B llegaron al citotipo AA mediante introgresión desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.

## **Material y Métodos**

### ***Material vegetal***

En otoño de 2014 recogimos 28 bulbos de *Prospero autumnale* (Asparagaceae) pertenecientes al citotipo AA, que se encontraban en floración en la localidad de La Palma (Granada, España, altitud = 761m s.n.m., y coordenadas geográficas 37° 7' 7" N y 4° 17' 1" O). A continuación, colocamos estos bulbos en hidrocultivo para que desarrollaran raíces que, posteriormente y una vez cortadas, fueron tratadas con colchicina al 0,1 % durante 4 horas, a temperatura ambiente, con objeto de obtener metafases mitóticas y poder averiguar el número de cromosomas B de cada una de ellas. Después del tratamiento con colchicina, fijamos las raíces en una mezcla de etanol: ácido acético (3:1) y las guardamos a 4°C hasta su estudio.

Para la tinción de los cromosomas, primero tratamos las raíces de cada bulbo con CIH 1N durante 1 minuto, a 60 ° C, y posteriormente las teñimos con orceína lactopropiónica durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Sobre un portaobjetos,

cortamos el meristemo de una raíz y lo colocamos en una gota de orceína lactopropiónica, y luego maceramos el meristemo y colocamos un cubreobjetos sobre el que ejercimos presión para aplastar la preparación y eliminar el exceso de colorante. Posteriormente observamos las preparaciones al microscopio óptico para determinar el número de cromosomas B de cada individuo.

Del material analizado, seleccionamos cuatro individuos, dos sin cromosomas B (códigos: AA-0B1 y AA-0B2), otros dos con cromosomas B, uno de ellos con 2B (AA-2B) y otro con 7B (AA-7B), siendo este último el individuo con mayor número de Bs que apareció en la muestra. De estas plantas, tomamos muestras de hojas y las secamos en bolsas de celofán en un ambiente con silicagel. Además, realizamos el mismo procedimiento con otros dos individuos OB, uno perteneciente al citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> procedente de Creta (Grecia) (individuo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B) y el otro al citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> procedente de Apulien (Italia) (individuo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B), que nos fueron enviados por la Dr<sup>a</sup> Hanna Scheneeweiss del laboratorio de Botánica Sistemática y Evolutiva de la Universidad de Viena. La Tabla 3.1 muestra un resumen de las características genéticas de estos seis individuos.

**Tabla 3.1.** Características genéticas de los Individuos analizados. El tamaño genómico fue calculado a partir de los valores C en pg reportados en Jang et al. (2013), transformados en Gb teniendo en cuenta que 1 pg= 0.978 Gb (según Doležel et al. (2003).

Población	Individuo	Citotipo	Nº As	Nº Bs	Tamaño de librería (nt)	Tamaño genómico (Gb)	Cobertura
La Palma (España)	AA-0B1	AA	14	0	4,540,761,636	15.35	0.30
La Palma (España)	AA-0B2	AA	14	0	20,383,546,241	15.35	1.33
La Palma (España)	AA-2B	AA	14	2	11,484,200,712	16.39	0.70
La Palma (España)	AA-7B	AA	14	7	5,536,435,594	18.99	0.29
Creta (Grecia)	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> -0B	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>	12	0	11,261,923,603	12.26	0.92
Apulien (Italia)	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> -0B	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	14	0	7,736,887,909	8.7	0.89

### **Extracción y secuenciación del DNA**

A partir de aproximadamente 100 mg de las hojas desecadas de cada uno de los individuos anteriormente seleccionados procedimos a su trituración en un mortero con nitrógeno líquido hasta convertirlas en un polvo fino. Posteriormente utilizamos el kit comercial “GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit” de Sigma-Aldrich (ahora Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción del DNA. Una vez aislado, procedimos a su cuantificación mediante un nanodrop (Tecan’s Infinite 200 NanoQuant) para determinar su cantidad y utilizamos 5 µl para evaluar su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Las muestras fueron secuenciadas en dos tandas distintas por proveedores externos: i) los individuos AA-0B1 y AA-7B mediante la plataforma Illumina HiSeq2000 por la empresa Macrogen (Corea del Sur), obteniendo lecturas de longitud 2x101 nucleótidos, y ii) los individuos AA-0B2, AA-2B, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B fueron secuenciados mediante la plataforma Illumina X Ten en la empresa Admera Health (Estados Unidos). Las coberturas de secuenciación oscilaron entre 0.29 y 1.33x (Tabla 3.1).

### ***Análisis bioinformático del satelitoma de *P. autumnale****

Para la catalogación de todos los DNAs satélites que fuese posible encontrar en el genoma de *P. autumnale*, que constituyen el satelitoma de la especie, utilizamos la herramienta SatMiner, desarrollada por Ruiz-Ruano et al. (2016), que permite identificar las familias de DNA satélite presentes en un genoma, incluyendo las que son extremadamente raras. Los scripts e instrucciones para la ejecución del protocolo se encuentran disponibles libremente en el repositorio GitHub: <https://github.com/fjruizruano/satminer>.

El método se describe en Ruiz-Ruano et al. (2016) y en esencia consiste en la realización de varias rondas de clusterización mediante RepeatExplorer (Novák et al. 2010) seguidas del filtrado de lecturas contenedoras del DNA satélite, incrementando de esta forma la probabilidad de encontrar familias raras del mismo (Ruiz-Ruano et al. 2016). A continuación, lo exponemos resumidamente, constando de los siguientes pasos:

#### ***1.- Detección del DNA satélite***

Teniendo en cuenta que el número de lecturas para la ejecución de una ronda de RepeatExplorer está computacionalmente restringido a unos pocos millones de éstas, y con el objetivo de intentar identificar el mayor número posible de familias de DNA satélite, satMiner incluye el filtrado de lecturas que muestran alta similitud con otras secuencias previamente conocidas.

El primer paso del proceso consiste en el descarte de las lecturas de baja calidad presentes en las librerías de Illumina. Este paso se realiza con el software Trimmomatic, eliminando los adaptadores y seleccionando sólo lecturas pareadas de 2 x 100 o 2 x 101 nucleótidos con todos ellos cumpliendo > Q20 como criterio de calidad. En caso de que algún nucleótido no cumpla con esta condición, se descarta la pareja de lecturas en donde está incluido. Después seleccionamos, para una primera ronda de RepeatExplorer (RE), 100.000 parejas de lecturas escogidas aleatoriamente con el software SeqTk, y luego ejecutamos RE con las opciones por defecto y la base de datos de secuencias repetidas por defecto.

Como los clústeres con bajos números de lecturas son difíciles de distinguir como DNA satélite, al quedar enmascarados por los muy abundantes, seleccionamos la mitad

de los clústeres obtenidos en la primera ronda y extrajimos sus secuencias como un archivo FASTA. RepeatExplorer agrupa las lecturas con alta similitud en clústeres cuya estructura genómica se representa mediante grafos. Cuando los clústeres contienen elementos satélites, sus grafos tienen forma de anillo o esfera (Novák et al. 2010). De los clústeres obtenidos, seleccionamos manualmente aquellos cuyos grafos tenían esta forma y con valores de densidad (número medio de enlaces por lectura) mayores de 0.1. De cada clúster seleccionado, elegimos el contig que presentaba un mayor grado de cobertura y con él realizamos un dotplot mediante el programa Geneious v4.8. Si éste detectaba la estructura en tándem, cortábamos el contig en monómeros para luego alinearlos y generar un monómero consenso para cada contig, que fue guardado para su posterior anotación.

A continuación, y con objeto de realizar una segunda ronda de detección de DNA satélite mediante RE, donde tuviésemos mayor probabilidad de encontrar satélites menos abundantes, elegimos una nueva colección de lecturas pareadas, que filtramos para eliminar las que contuvieran secuencias de los tipos detectados previamente, usando el software Deconseq v0.4.3 con las opciones dataset. Es recomendable duplicar en cada ronda de SatMiner el número de lecturas utilizadas para RE (100.000, 200.000, 400.000, etc.). Así obtenemos otro archivo FASTA para procesar con RepeatExplorer y repetimos los pasos anteriores mencionados para la primera ronda. Llevaremos a cabo tantas rondas de filtrado y RE como sean necesarias hasta que dejen de aparecer nuevos elementos satélites. Para este trabajo se realizaron un total de 6 rondas de RE para la librería AA-0B1 y otras tantas para la AA-7B, usando para la última ronda, en ambos casos, 3.200.000 parejas de lecturas.

## 2.- Análisis del satelitoma.

Las secuencias consenso de todos los DNAs satélites encontrados fueron clasificadas en subfamilias, familias y superfamilias, teniendo en cuenta el grado de identidad en sus secuencias, según los criterios propuestos por Ruiz-Ruano et al. (2016). Para determinar la homología entre estas secuencias consenso, utilizamos la herramienta RepeatMasker (Smit AFA, Hubley R & Green P. *RepeatMasker Open-4.0*. 2013-2015 <<http://www.repeatmasker.org>) que agrupa las secuencias consenso por su homología, y luego las analizamos mediante su alineamiento con Geneious. Cuando el grado de identidad era superior al 95% las secuencias se consideran de la misma subfamilia, si la identidad era del 80%, o mayor, se consideran una misma familia, y si el grado de identidad era inferior al 80, las secuencias se consideran de familias distintas y pertenecientes a la misma superfamilia. Todas estas clasificaciones se realizaron con un script de Python (rm\_homolog.py).

Una vez identificados y clasificados los satélites, realizamos una selección de 5 millones de lecturas que cumplieran con las condiciones de calidad mencionadas anteriormente, es decir > Q20. Usando como referencia las secuencias consenso de los

satélites encontrados, llevamos a cabo una estimación de su abundancia y divergencia mediante RepeatMasker (Smit et al. 2013-2015) que nos proporcionó dos tipos de archivos por librería, "align" y "divsum". Los archivos "divsum" contienen las estimas de divergencia para cada DNA satélite, expresados como porcentajes de divergencia aplicando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura (1980). Esta divergencia está expresada por subfamilias.

Para obtener datos por familia, modificamos el fichero "align" para que los DNAs satélites de la misma familia tengan el mismo nombre, usando un script propio. De esta forma se origina un nuevo archivo "divsum" con la información resumida por familias. Así obtenemos la abundancia total de cada familia de DNA satélite por individuo, expresada como el número de nucleótidos que se alinearon con la secuencia de referencia. La normalización de los datos se realizó dividiendo luego cada una de las estimas de abundancia entre el número total de nucleótidos de cada librería, resultando así una estima de su abundancia en el genoma (proporción genómica).

Para asignar el nombre definitivo de cada familia de DNA satélite seguimos los criterios propuestos por Ruiz-Ruano et al. (2016) de la siguiente forma: las tres primeras letras del nombre son una abreviatura de la especie, en nuestro caso Pau, seguido del término "Sat", un número de referencia desde 1 en adelante en orden decreciente de abundancia y, finalmente, la longitud (en número de nucleótidos) del monómero consenso. El contenido en A + T y la longitud de monómero que se tuvieron en cuenta en el caso de DNA repetido en tándem con más de una subfamilia, fue el de aquella que presentaba una mayor abundancia en el genoma. Las familias de DNA satélite agrupadas por superfamilias (SF) fueron numeradas en función de la abundancia conjunta en el genoma. RepeatMasker además proporciona una tabla con estimas de la abundancia de cada DNA satélite (expresada como proporción genómica) en intervalos de divergencia del 1 %, que son muy útiles para construir "repeat landscapes".

Para estimar la abundancia comparada de satélites en las 6 bibliotecas, primero acortamos las lecturas de 2x150 nt en los extremos 3' para obtener lecturas de 2x101 nt de largo, al igual que las otras lecturas más cortas evitando así los sesgos causados por la diferente longitud de lectura entre bibliotecas. Para ello, utilizamos el programa `fastx_trimmer` de la suite FASTX-Toolkit (A. Gordon y G. Hannon, "Fastx-Toolkit", FASTQ/A shortreads herramientas de preprocesamiento (no publicado: <http://hannonlab.cshl.edu/fastx-Toolkit>, 2010). Luego seleccionamos 5 millones de pares de lecturas con `seqtk` (<https://github.com/lh3/seqtk/>) en las 6 bibliotecas, por separado, y calculamos la abundancia y divergencia mediante alineamientos con RepeatMasker.

### ***Estimas generales de abundancia de DNA repetitivo***

Para el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas mediante NGS, en este trabajo hemos empleado dos estrategias de las varias que se han desarrollado en los últimos

años (Ruban et al. 2017). La primera consiste en la detección de elementos repetitivos mediante RE, que permite identificar y anotar, en primera instancia, los repetitivos obtenidos y, en función de la forma del grafo generado, asignarlos a repetitivos en tandem (DNA satélite y familias multigénicas) o bien repetitivos dispersos (eminentemente transposones). A continuación, utilizamos el método "Coverage ratio analysis" (Ruban et al. 2017), que se aplica mediante el mapeo de lecturas con RepeatMasker, pero que nosotros llevamos a cabo usando SSAHA2 (Ning et al. 2001). Usando muestras equilibradas de lecturas de las diferentes librerías, y utilizando réplicas biológicas, por las que las diferencias en cobertura de los mapeos observados en diferentes librerías se pueden transformar en diferencias de abundancia de los elementos repetitivos entre tipos de genomas.

Antes de la ejecución de RE, añadimos las secuencias de todos los satélites encontrados al construir el satelitoma de *P. autumnale* a la base de datos que íbamos a usar como referencia, añadiendo también el DNAr 5S que observamos no estaba presente en la base de datos. Debido a la diferente longitud de las lecturas obtenidas en nuestras dos rondas de secuenciación Illumina, recortamos el final de las lecturas de 151 nt para dejarlas como el resto en 101. De esta forma, utilizamos lecturas de la misma longitud. Mediante RE realizamos un ensamblaje de las lecturas que integran cada grafo construido y su anotación mediante una búsqueda en la base de datos de elementos repetidos RepBase (<https://www.girinst.org/replib>) usando el programa RepeatMasker (Smit et al. 2013-2015). Esto nos permitió obtener una colección de clusters y contigs en cada librería que, posteriormente, fueron usados como referencia para el mapeo de lecturas de cada librería mediante SSAHA2 (Ning et al. 2001). Para ello hemos utilizado una serie de protocolos que se encuentran depositados en un repositorio libre (<https://github.com/firuizruano/whatGene>). En resumen, el protocolo aplicado aquí consistió en disminuir la redundancia mediante el programa CD-HIT-EST (Li and Godzik 2006), agrupando aquellas secuencias que mostraban una similitud igual o mayor del 80 % en al menos el 80 % de las secuencias, mediante alineamientos locales y el algoritmo *greedy* (opciones -M 0 -aS 0.8 -c 0.8 -G 0 -g 1). A continuación, se mapearon los contigs generados por RepeatExplorer contra las secuencias seleccionadas usando SSAHA2 (Ning et al. 2001) y considerando mapeos de al menos 40 nt y un 80 % de identidad. Este software tiene la ventaja de mapear lecturas con alta variación con respecto a la referencia y además acepta lecturas mapeadas parcialmente, con lo que se pierde menos información de mapeo que con otros tipos de software. Finalmente, expresamos los resultados de estos mapeos en porcentaje del genoma, dividiendo el número de nucleótidos mapeados entre el tamaño de la librería.

### **Cuantificación de la abundancia de DNA repetitivo en el cromosoma B**

Para obtener una estima de la proporción que representa el cromosoma B con respecto al genoma normal haploide (que en términos de cantidad de DNA sería el valor C), medimos la longitud de los cromosomas A y B en 10 células en metafase mitótica y en cada una calculamos la proporción que representa la media de los cromosomas B medidos con respecto a 1/2 de la suma de todos los cromosomas medidos (para que equivalga al valor C). Esto indicó que un cromosoma B representa el 6.78 % de C (SD= 0.44 %, CV= 6.55 %). Dado que el valor C del citotipo AA de *P. autumnale* se ha estimado en 7.6773 Gb (Jang et al. 2013), podemos inferir que el cromosoma B contiene 0.52 Gb de DNA. Teniendo en cuenta estos valores, calculamos primero el contenido en DNA de los individuos con diferente número de Bs, luego el umbral teórico que tendría que superar un elemento repetitivo para considerarse sobreabundante en los individuos con B, calculado como la proporción entre el tamaño del genoma de cada individuo con B y el genoma 0B, y finalmente la fracción relativa de los cromosomas A y B en los genomas +B ( $w_A$  y  $w_B$ ) (Tabla 3.2) que, posteriormente, fue usado para obtener estimas de la proporción de los elementos sobreabundantes en el B.

**Tabla 3.2.** Tamaño genómico (en Gb) de individuos con diferente número de cromosomas B, umbral  $B^+/B^-$  que debería superar un contig para estar presente en el cromosoma B, y peso relativo que representan las dos dotaciones de cromosomas A y los cromosomas B en cada tipo de individuo, calculados teniendo en cuenta el contenido de ambos (7.6773 Gb por cada conjunto de cromosomas A y 0.52 Gb por cromosoma B).

no. Bs	Tamaño del genoma	Umbral $B^+/B^-$	$w_A$	$w_B$
0	15.35		1	0
1	15.87	1.034	0.9673	0.0327
2	16.39	1.068	0.9366	0.0634
3	16.91	1.102	0.9078	0.0922
4	17.43	1.135	0.8807	0.1193
5	17.95	1.169	0.8552	0.1448
6	18.47	1.203	0.8312	0.1688
7	18.99	1.237	0.8084	0.1916
4.5	17.69	1.152	0.8678	0.1322

Tras el mapeo de lecturas con SSAHA2, y para obtener una estima de la cantidad de DNA repetitivo que los diferentes contigs de la base de datos de referencia suponen para el cromosoma B, utilizamos el método de Ruiz-Ruano et al. (2018). Este método adscribe toda la diferencia en abundancia entre +B y 0B a su presencia en el cromosoma B y que, ponderada por los pesos relativos que los cromosomas A y B ( $w_A$  y  $w_B$ ) representan en un genoma portador de cromosomas B (ver Tabla 3.2), nos permite

calcular la abundancia de cada contig en los individuos +B (AB+ en las Tablas S3.1-S3.3). Dividiendo luego entre el número de Bs (4.5 si lo hacemos con el promedio de los dos individuos utilizados), obtenemos la abundancia del contig en un cromosoma B (A1B en las mencionadas Tablas) expresada como proporción del DNA contenido en éste.

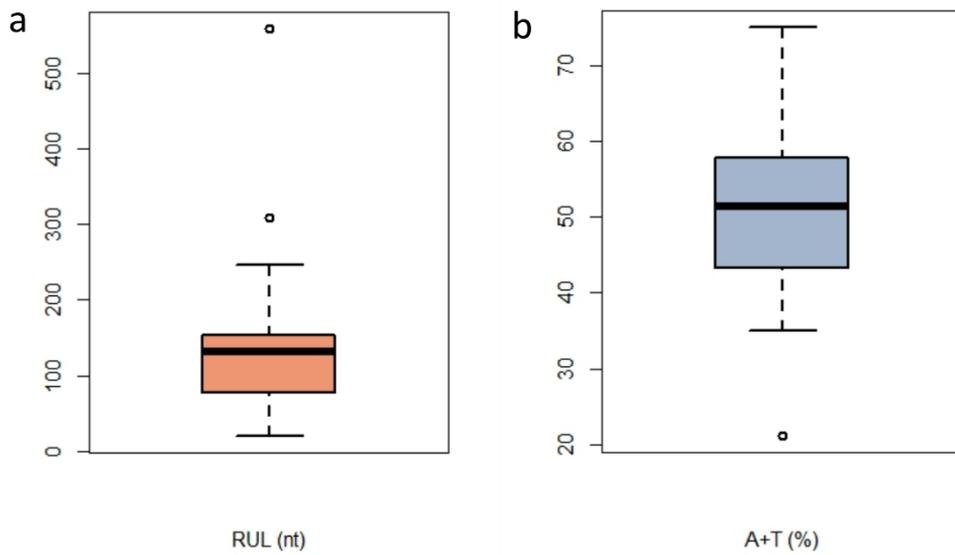
### ***Análisis estadístico***

Los análisis estadísticos realizados para este trabajo se han realizado mediante el uso combinado del software Statistica 6.0 (StatSoft Inc.), hojas de cálculo Excel, y con el software libre R versión 4.0.0 (R Development Core Team 2007) y RStudio y el paquete ggplot2 (Wickham et al. 2020) para la realización de los gráficos.

## **Resultados**

### ***Análisis del satelitoma de *P. autumnale* en individuos con y sin cromosomas B***

El análisis mediante seis rondas de satMiner de dos librerías, una obtenida a partir de un individuo sin B (AA-0B1) y la otra a partir de un individuo con 7 Bs (AA-7B), ambos colectados en 2014 en la población de La Palma, revelaron la existencia de 77 subfamilias de elementos repetitivos en tándem (satélites), agrupadas en 42 familias y 8 superfamilias. Las características principales de las secuencias consenso de estas 42 familias se muestran en la Tabla 3.3. La longitud de la unidad repetitiva (RUL) variaba entre 20 y 550 pb (media: 137.2, SE= 13.9, mediana= 131.5), con un contenido en A+T que variaba entre el 21 % y el 75 % (media= 50.7, SE= 1.59; mediana= 51.4) (Figura 3.1). Las abundancias fueron altamente variables entre familias, estando comprendidas entre 0 (en los cromosomas A para un satélite específico del B) y 0.49 % del genoma (media = 0.021, SE= 0.012; mediana = 0.0045, Q1= 0.00093, Q3 = 0.014) en el individuo 0B, y entre 0.0003% y 0.32% (media= 0.027, SE= 0.009; mediana= 0.009) en el individuo 7B.



**Figura 3.1.** Distribución de las dos propiedades principales de las secuencias consenso de las familias que constituyen el satelitoma de *P. autumnale*. a) la longitud de la unidad repetitiva (RUL, en nucleótidos, Q1= 77, Q3= 153); b) la proporción de A+T (en porcentaje, Q1= 43.24, Q3= 57.7).

**Tabla 3.3.** Características de las 42 familias de DNA satélite encontradas en las librerías AA-0B1 y AA-7B. RUL= longitud de la unidad repetitiva. En negrita se destacan las cuatro familias que constituyen la superfamilia SF6, sobrerrepresentada en la librería AA-7B.

Superfamilia	Familia	RUL (nt)	A+T (%)	AA-0B1		AA-7B	
				Abundancia	Divergencia (%)	Abundancia	Divergencia (%)
SF1	PauSat01A-76	76	75	4.88E-03	4.69	2.02E-03	4.87
	PauSat02A-141	141	61.7	8.23E-04	22.9	8.44E-04	22.82
	PauSat03A-214	214	41.12	5.26E-04	13.21	5.57E-04	13.55
	PauSat04A-119	119	42.86	2.76E-04	9.06	2.97E-04	10.04
SF3	PauSat05A-150	150	52.67	2.11E-04	0.59	1.57E-04	1.16
	PauSat06A-53	53	41.51	2.05E-04	18.26	2.11E-04	18.26
	PauSat07A-181	181	65.75	1.96E-04	5.08	1.86E-04	4.64
SF2	PauSat08A-213	213	44.13	1.64E-04	1.86	2.62E-04	2.12
SF2	PauSat09A-140	140	53.57	1.63E-04	8.41	3.55E-04	13.32
SF1	PauSat10A-170	170	70	1.56E-04	19.53	1.46E-04	19.76
SF2	PauSat11A-114	114	45.61	1.39E-04	3.88	1.24E-04	4.14
	PauSat12A-43	43	51.16	1.34E-04	14.15	1.03E-04	14.24
	PauSat13A-208	208	48.56	1.21E-04	4.17	1.65E-04	4.14
	PauSat14A-135	135	43.7	1.17E-04	7.07	1.56E-04	7.44
SF4	PauSat15A-143	143	57.34	1.12E-04	6.79	7.56E-05	7.28
SF2	PauSat16A-153	153	51.63	8.49E-05	7.53	1.93E-04	15.4
	PauSat17A-111	111	52.25	7.41E-05	7.75	6.70E-05	8.15
SF4	PauSat18A-136	136	61.03	6.49E-05	12.77	5.00E-05	13.32
	PauSat19A-77	77	35.06	5.98E-05	9.35	4.51E-05	10.08
	PauSat20A-142	142	59.86	4.84E-05	14.67	3.23E-05	14.67
	<b>PauSat21A-559</b>	559	55.46	4.81E-05	13.36	3.25E-03	4.02
SF5	PauSat22A-123	123	57.72	4.17E-05	7.81	2.98E-05	7.96
SF5	PauSat23A-133	133	61.65	3.69E-05	6.13	2.14E-05	6.77
SF8	PauSat24A-131	131	58.02	3.36E-05	15.21	2.41E-05	14.92
SF5	PauSat25A-128	128	57.81	2.69E-05	12.62	1.55E-05	14.47
	PauSat26A-77	77	46.75	2.46E-05	6.32	3.65E-05	5.95
SF7	PauSat27A-132	132	37.12	2.20E-05	8.35	1.63E-05	9.16
SF5	PauSat28A-129	129	59.69	2.07E-05	11.78	1.52E-05	11.55
	<b>PauSat29A-114</b>	114	55.26	1.79E-05	12.48	5.55E-04	6.13
SF2	PauSat30A-153	153	50.33	1.53E-05	6.55	1.24E-05	9.11
SF7	PauSat31A-63	63	38.1	1.08E-05	8.83	1.55E-05	10.25
SF2	PauSat32A-143	143	48.95	9.30E-06	11.07	1.11E-05	8.69
SF7	PauSat33A-64	64	35.94	7.94E-06	4.97	7.34E-06	6.9
SF6	<b>PauSat34A-309</b>	309	56.63	7.75E-06	10.84	6.65E-04	2.95
	PauSat35A-20	20	50	7.47E-06	7.04	9.22E-06	6.44
SF7	PauSat36A-99	99	42.42	7.03E-06	9.04	8.94E-06	9.33
SF7	PauSat37A-67	67	46.27	5.17E-06	10.25	4.83E-06	9.16
SF7	PauSat38A-66	66	40.91	2.74E-06	9.99	3.08E-06	8.06
SF8	PauSat39A-33	33	21.21	2.50E-06	1.24	1.28E-04	6.75
SF7	PauSat40A-37	37	43.24	2.12E-06	24.11	7.20E-06	14.79
SF6	<b>PauSat41A-247</b>	247	55.47	1.78E-06	13.06	2.64E-04	3.65
	PauSat42A-216	216	54.63	0.00E+00	0	1.13E-04	4.14
Total				8.91E-03		1.13E-02	

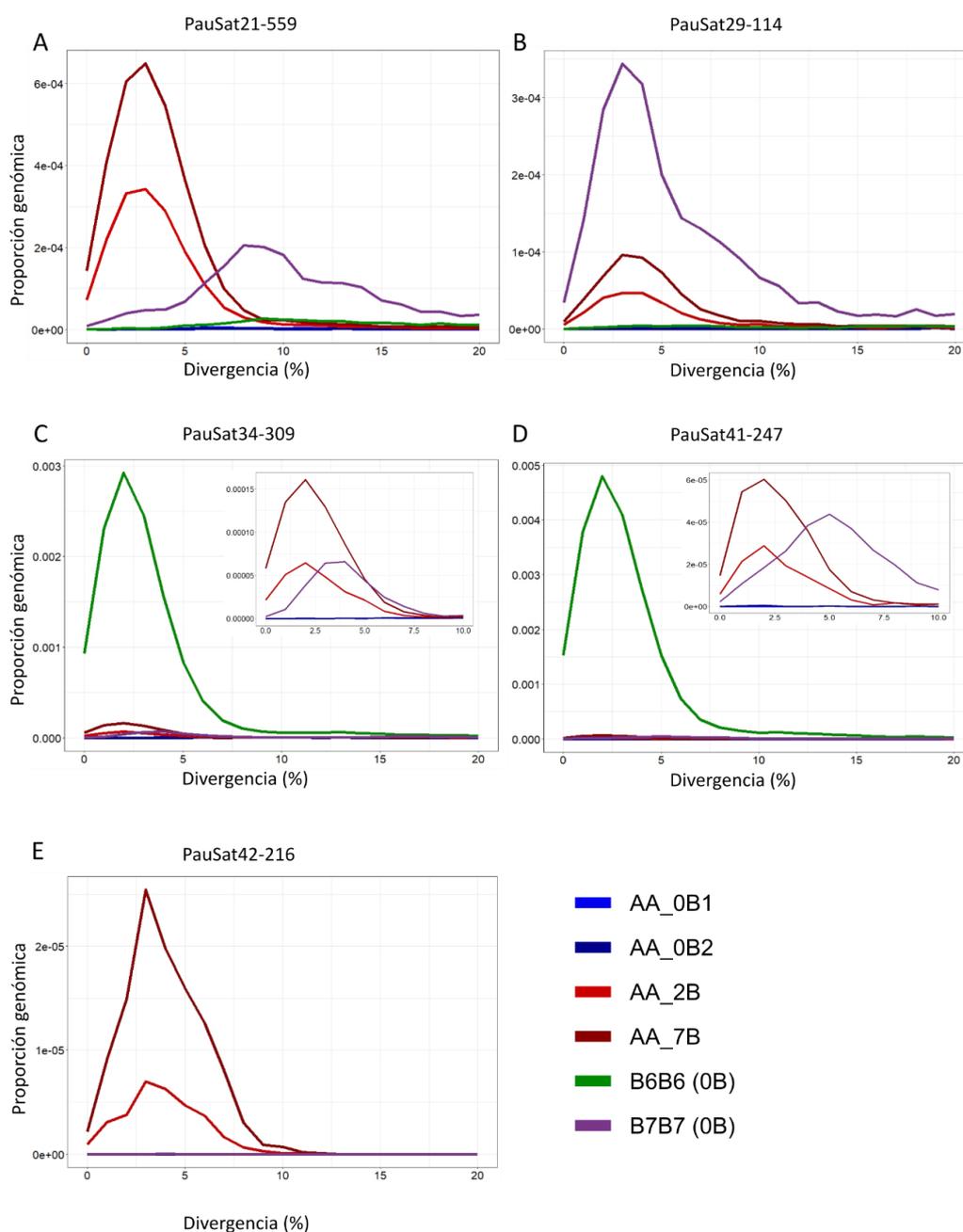
Para realizar un análisis comparativo más amplio entre librerías con B y sin B, secuenciamos otras cuatro librerías (AA-0B2, AA-2B, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B) y cuantificamos simultáneamente la abundancia de las 42 familias de satélites en las seis librerías mediante mapeo con RepeatMasker. Con objeto de buscar satélites que pudieran ser especialmente abundantes en los cromosomas B, calculamos el cociente genómico +B/0B (gFC) para cada familia, dividiendo la abundancia en cada individuo portador de B entre la abundancia promedio en los dos individuos 0B de la misma población. Esto confirmó que PauSat42 estaba ausente en los dos individuos 0B (AA-0B1 y AA-0B2), reforzando la conclusión de que este satélite es específico del B, y reveló la presencia de otras cuatro familias de satélites que mostraban una abundancia al menos un orden de magnitud mayor en los individuos +B en comparación con los 0B. Estas fueron PauSat21, PauSat29, PauSat34 y PauSat41, es decir, las cuatro familias que constituyen la superfamilia SF6 (ver Tabla 3.3). Además, calculamos los valores gFC entre citotipos, en ausencia del cromosoma B, es decir, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>/AA y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>/AA, y éstos revelaron que los cuatro satélites sobreabundantes en el B (PauSat21, PauSat29, PauSat34 y PauSat41) también eran mucho más abundantes en los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> que en el citotipo AA, sobre todo en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. Además, la familia PauSat42, que es específica del cromosoma B, dado que no la encontramos en las librerías AA-0B, estaba, sin embargo, presente en los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> (Tabla 3.4). Estos resultados indican que los cromosomas B encontrados en el citotipo AA muestran mayor similitud en la abundancia de estos satélites con los cromosomas A del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> (y en menor medida B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>) que con los cromosomas A de su propio citotipo AA, sugiriendo que los cromosomas B llegaron a este último citotipo desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.

**Tabla 3.4.** DNAs satélites encontrados en *P. autumnale*. Las subfamilias están diferenciadas por letras mayúsculas consecutivas. gFC=cociente de los dos individuos OB del citotipo AA. Estos repetitivos fueron ensamblados, tras 6 rondas de SatMiner, entre los 42 clusters diferentes ensamblados.

Nombre		Individuo						av_AA_OB	av_AA+B	gFC
		AA_OB1	AA_OB2	AA_2B	AA_7B	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>			
PauSat01A-76		4.10E-03	1.49E-03	1.31E-03	1.66E-03	1.51E-06	2.76E-05	2.80E-03	1.49E-03	0
PauSat01B-48		7.76E-04	3.22E-04	2.63E-04	3.66E-04	2.95E-07	1.14E-05	5.49E-04	3.14E-04	0
PauSat02A-141	SF1	4.73E-05	5.06E-05	4.82E-05	6.42E-05	8.54E-05	8.90E-05	4.90E-05	5.62E-05	1
PauSat03A-214		9.09E-06	9.79E-06	1.08E-05	9.86E-06	1.07E-05	5.83E-07	9.44E-06	1.04E-05	1
PauSat03B-213		6.11E-06	7.88E-06	8.14E-06	1.00E-05	9.73E-05	4.70E-05	6.99E-06	9.08E-06	1
PauSat04A-119		2.79E-05	2.91E-05	2.64E-05	2.93E-05	9.12E-06	1.39E-05	2.85E-05	2.78E-05	0
PauSat04B-103		9.30E-07	5.55E-07	5.56E-07	2.68E-07	3.49E-07	7.86E-07	7.43E-07	4.12E-07	0
PauSat04C-119		2.17E-05	2.27E-05	2.09E-05	2.12E-05	4.20E-06	2.18E-06	2.22E-05	2.10E-05	0
PauSat04D-119		2.24E-05	1.97E-05	2.38E-05	2.38E-05	5.72E-06	6.03E-06	2.11E-05	2.38E-05	1
PauSat04E-119		9.89E-06	6.37E-06	8.68E-06	1.17E-05	1.17E-06	7.63E-07	8.13E-06	1.02E-05	1
PauSat05A-150		2.11E-04	0.00E+00	0.00E+00	1.57E-04	0.00E+00	0.00E+00	1.05E-04	7.86E-05	0
PauSat06A-53	SF3	5.37E-06	8.24E-06	7.38E-06	6.94E-06	1.13E-05	1.12E-05	6.81E-06	7.16E-06	1
PauSat06B-65	SF3	2.24E-05	1.52E-05	1.64E-05	2.19E-05	2.74E-05	4.89E-05	1.88E-05	1.92E-05	0
PauSat07A-181		1.20E-04	6.60E-05	8.03E-05	1.16E-04	6.58E-05	3.67E-05	9.30E-05	9.83E-05	0
PauSat07B-199		7.53E-05	5.84E-05	4.70E-05	6.95E-05	3.97E-05	4.58E-05	6.68E-05	5.82E-05	0
PauSat08A-213	SF2	8.24E-05	8.14E-05	8.96E-05	1.29E-04	1.03E-04	2.72E-04	8.19E-05	1.09E-04	1
PauSat08B-208	SF2	8.04E-05	8.64E-05	9.85E-05	1.27E-04	2.27E-04	1.02E-04	8.34E-05	1.13E-04	1
PauSat09A-140	SF2	8.76E-05	7.28E-05	7.41E-05	9.07E-05	4.91E-05	6.15E-05	8.02E-05	8.24E-05	0
PauSat09B-140	SF2	6.09E-05	6.06E-05	6.36E-05	7.28E-05	2.43E-04	2.65E-04	6.07E-05	6.82E-05	1
PauSat10A-170	SF1	1.71E-05	1.26E-05	1.32E-05	1.65E-05	9.62E-06	7.21E-06	1.49E-05	1.49E-05	0
PauSat10B-167	SF1	2.11E-05	1.99E-05	1.56E-05	1.73E-05	3.15E-06	8.04E-06	2.05E-05	1.64E-05	0
PauSat11A-114		3.65E-05	1.99E-05	2.37E-05	3.09E-05	1.53E-06	8.74E-07	2.82E-05	2.73E-05	0
PauSat11B-113		3.88E-06	2.66E-06	1.71E-06	3.52E-06	0.00E+00	0.00E+00	3.27E-06	2.62E-06	0
PauSat12A-43		9.14E-06	6.94E-06	4.72E-06	6.08E-06	1.45E-05	2.00E-05	8.04E-06	5.40E-06	0
PauSat13A-208	SF2	1.14E-04	1.28E-04	1.35E-04	1.58E-04	1.13E-05	3.79E-06	1.21E-04	1.47E-04	1
PauSat14A-135	SF2	5.82E-05	6.57E-05	6.77E-05	7.61E-05	1.01E-05	8.73E-06	6.19E-05	7.19E-05	1

PauSat14B-198	SF2	2.85E-05	3.18E-05	3.07E-05	3.68E-05	1.83E-05	1.06E-05	3.02E-05	3.37E-05	1
PauSat14C-188	SF2	2.71E-05	2.61E-05	3.36E-05	3.82E-05	7.62E-05	7.54E-05	2.66E-05	3.59E-05	1
PauSat15A-143	SF4	1.08E-05	5.89E-06	8.81E-06	1.05E-05	0.00E+00	0.00E+00	8.32E-06	9.64E-06	1
PauSat15B-140	SF4	8.60E-06	5.19E-06	2.49E-06	3.96E-06	6.05E-07	1.68E-07	6.90E-06	3.23E-06	0
PauSat15C-142	SF4	1.09E-05	7.06E-06	4.68E-06	5.61E-06	0.00E+00	1.00E-07	9.00E-06	5.14E-06	0
PauSat16A-153	SF2	2.33E-05	1.98E-05	2.10E-05	2.81E-05	7.99E-06	5.44E-06	2.16E-05	2.45E-05	1
PauSat16B-153	SF2	2.70E-05	2.61E-05	2.47E-05	3.10E-05	1.83E-05	1.31E-05	2.66E-05	2.79E-05	0
PauSat17A-111		3.57E-05	2.70E-05	2.65E-05	3.34E-05	7.38E-05	7.33E-05	3.13E-05	3.00E-05	0
PauSat17B-83		2.32E-05	1.40E-05	1.74E-05	1.94E-05	1.77E-05	4.56E-05	1.86E-05	1.84E-05	0
PauSat17C-27		1.49E-05	1.32E-05	1.18E-05	1.38E-05	6.04E-05	6.12E-05	1.41E-05	1.28E-05	0
PauSat18A-136		4.44E-05	3.29E-05	3.50E-05	3.59E-05	6.27E-06	1.18E-05	3.86E-05	3.55E-05	0
PauSat18B-137		2.05E-05	1.62E-05	1.10E-05	1.41E-05	7.33E-07	2.12E-06	1.83E-05	1.25E-05	0
PauSat19A-77		1.82E-05	1.31E-05	1.58E-05	1.46E-05	3.11E-06	2.73E-06	1.56E-05	1.52E-05	1
PauSat19B-77		6.56E-06	6.92E-06	6.52E-06	4.36E-06	2.12E-06	4.55E-06	6.74E-06	5.44E-06	1
PauSat20A-142	SF4	1.18E-05	4.39E-06	5.51E-06	7.37E-06	3.24E-06	2.15E-06	8.09E-06	6.44E-06	0
PauSat20B-144	SF4	1.47E-06	8.71E-07	1.78E-06	1.89E-06	9.99E-07	4.47E-07	1.17E-06	1.84E-06	1
PauSat21A-559	SF6	4.81E-05	2.48E-05	1.74E-03	3.23E-03	2.21E-03	3.73E-04	3.65E-05	2.49E-03	4
PauSat22A-123	SF5	2.31E-05	1.81E-05	1.82E-05	1.86E-05	6.35E-07	4.11E-07	2.06E-05	1.84E-05	0
PauSat22B-127	SF5	1.84E-05	1.33E-05	1.07E-05	1.10E-05	3.98E-06	4.93E-06	1.58E-05	1.09E-05	0
PauSat23A-133	SF5	1.47E-05	1.06E-05	9.78E-06	9.17E-06	2.18E-06	3.30E-06	1.26E-05	9.48E-06	0
PauSat23B-136	SF5	1.21E-05	6.61E-06	4.28E-06	4.57E-06	4.75E-07	4.92E-07	9.34E-06	4.43E-06	0
PauSat24A-131	SF8	2.26E-05	1.53E-05	1.76E-05	1.55E-05	8.97E-07	8.99E-07	1.89E-05	1.66E-05	0
PauSat24B-132	SF8	1.10E-05	6.80E-06	1.20E-05	8.54E-06	1.74E-06	1.18E-06	8.89E-06	1.03E-05	1
PauSat25A-128	SF5	2.66E-05	1.92E-05	1.55E-05	1.53E-05	1.64E-05	1.62E-05	2.29E-05	1.54E-05	0
PauSat26A-77		1.53E-05	1.05E-05	9.36E-06	1.62E-05	7.93E-06	1.79E-05	1.29E-05	1.28E-05	0
PauSat26B-77		6.28E-06	5.27E-06	6.60E-06	7.44E-06	8.36E-06	6.80E-06	5.78E-06	7.02E-06	1
PauSat26C-77		2.49E-06	1.52E-06	3.28E-06	1.02E-05	5.86E-07	1.05E-06	2.01E-06	6.76E-06	1
PauSat26D-77		4.83E-07	9.80E-07	5.95E-07	2.59E-06	6.25E-06	2.51E-05	7.32E-07	1.59E-06	0
PauSat27A-132	SF7	1.33E-05	1.14E-05	7.57E-06	9.42E-06	7.64E-06	1.27E-05	1.23E-05	8.50E-06	0
PauSat27B-100	SF7	4.93E-06	3.78E-06	3.60E-06	4.41E-06	2.93E-06	3.12E-06	4.35E-06	4.00E-06	0
PauSat27C-132	SF7	2.16E-06	1.72E-06	2.80E-06	1.49E-06	1.05E-06	1.76E-06	1.94E-06	2.15E-06	1
PauSat27D-132	SF7	1.64E-06	1.22E-06	1.26E-06	9.57E-07	1.17E-06	9.86E-07	1.43E-06	1.11E-06	0

PauSat28A-129	SF5	1.99E-05	1.41E-05	9.11E-06	1.48E-05	5.85E-06	9.68E-06	1.70E-05	1.20E-05	0
PauSat29A-114	SF6	1.77E-05	4.70E-06	2.76E-04	5.59E-04	2.32E-03	7.06E-05	1.12E-05	4.18E-04	2
PauSat30A-153	SF2	3.60E-05	3.01E-05	3.47E-05	3.10E-05	2.45E-05	1.64E-05	3.30E-05	3.29E-05	1
PauSat31A-63	SF7	6.78E-06	8.38E-06	8.99E-06	8.80E-06	1.87E-05	6.95E-06	7.58E-06	8.89E-06	1
PauSat32A-143	SF2	4.70E-06	4.47E-06	5.60E-06	7.02E-06	8.70E-05	4.05E-05	4.59E-06	6.31E-06	1
PauSat33A-64	SF7	5.18E-06	1.54E-06	2.25E-06	1.71E-06	5.54E-07	1.58E-07	3.36E-06	1.98E-06	0
PauSat33B-66	SF7	1.35E-06	8.81E-07	5.28E-07	9.63E-07	8.81E-07	1.90E-07	1.11E-06	7.46E-07	0
PauSat33C-66	SF7	1.30E-06	7.04E-07	4.00E-06	4.49E-06	1.98E-06	8.91E-07	1.00E-06	4.25E-06	4
PauSat33D-66	SF7	6.34E-08	0.00E+00	9.90E-08	0.00E+00	1.90E-07	0.00E+00	3.17E-08	4.95E-08	3
PauSat34A-309	SF6	7.91E-06	4.54E-06	2.70E-04	6.69E-04	3.53E-04	1.23E-02	6.23E-06	4.69E-04	4
PauSat35A-20	SF3	5.72E-06	8.16E-06	6.54E-06	6.96E-06	1.05E-05	1.03E-05	6.94E-06	6.75E-06	0
PauSat36A-99	SF7	6.93E-06	7.02E-06	4.94E-06	8.93E-06	5.08E-06	4.45E-06	6.98E-06	6.94E-06	0
PauSat37A-67	SF7	2.95E-06	2.74E-06	2.19E-06	2.96E-06	5.65E-06	1.64E-06	2.85E-06	2.57E-06	0
PauSat37B-67	SF7	2.13E-06	1.19E-06	1.54E-06	1.77E-06	8.41E-07	1.49E-06	1.66E-06	1.66E-06	0
PauSat38A-66	SF7	2.71E-06	1.81E-06	2.07E-06	3.01E-06	6.47E-06	1.75E-07	2.26E-06	2.54E-06	0
PauSat39A-33	SF8	2.50E-06	1.20E-05	1.66E-05	1.28E-04	9.13E-06	1.38E-05	7.23E-06	7.23E-05	2
PauSat40A-37	SF7	1.86E-06	2.48E-06	3.17E-06	6.99E-06	1.81E-06	2.26E-06	2.17E-06	5.08E-06	1
PauSat41A-247	SF6	1.78E-06	2.64E-06	1.18E-04	2.70E-04	2.67E-04	2.07E-02	2.21E-06	1.94E-04	5
PauSat42A-216		0.00E+00	0.00E+00	3.22E-05	1.13E-04	4.26E-08	4.46E-08	0.00E+00	7.26E-05	4
		0.669%	0.317%	0.538%	0.880%	0.671%	3.511%	0.493%	0.709%	



**Figura 3.2.** Distribución de la abundancia (eje Y) de secuencias que muestran diferentes valores de divergencia (eje X) para las cinco familias de DNA satélite que son sobreabundantes en los individuos con B, con respecto a los 0B del mismo citotipo (AA). Se representan también las curvas correspondientes a los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>. Observe cómo la curva del individuo con 7B está siempre por encima de la del 2B. Note también cómo los cuatro primeros satélites (que constituyen la superfamilia SF6) son más abundantes en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> que en AA (donde las curvas están pegadas al eje de abscisas).

Para analizar esta posibilidad en mayor profundidad, construimos “repeat landscapes” para cada satélite en las seis librerías (ver Figura 3.2), representando la abundancia de las secuencias que mostraban diferentes valores de divergencia. Los repeat landscapes ponen de manifiesto los eventos de amplificación pasada, visualizados en forma de pico cuya posición en el eje horizontal (DIVPEAK) indica si estos eventos fueron recientes o antiguos, cuando el pico se coloca en valores bajos o altos de DIVPEAK, respectivamente. Además, calculamos la proporción de secuencias que mostraban valores de divergencia dentro del 5% alrededor de DIVPEAK, y este parámetro, denominado tamaño relativo del pico (RPS) (Tabla 3.5), indica el grado de homogeneización del satélite (Camacho y col., enviado). Teniendo esto en cuenta, los repeat landscapes de los 5 satélites que mostraron sobreabundancia en los individuos con B, y presumiblemente en el cromosoma B (Figura 3.2), indicaron varios hechos interesantes:

- 1) En los cromosomas A (librerías 0B, en tonos azules), PauSat21-559 (Fig. 3.2A) mostró un pico de amplificación sólo en la librería B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B, pero los dos individuos portadores de B (en tonos rojos) también mostraron un pico, pero centrado en una divergencia más baja (3 %), sugiriendo la amplificación reciente de este satélite en el cromosoma B. De hecho, en comparación con el promedio de abundancia en los dos individuos AA-0B, este satélite era 48 y 89 veces más abundante en AA-2B y AA-7B, respectivamente, 61 veces en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B y sólo 10 veces más abundante en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B (ver Tabla 3.4), indicando mayores similitudes entre AA-B<sup>+</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B.
- 2) PauSat29-114 (Fig. 3.2B) mostró un patrón similar a PauSat21-559, excepto que los picos observados en las librerías AA-B<sup>+</sup> coincidían aproximadamente con los de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B (Tabla 3.4). Además, PauSat29-114 era 24 y 49 veces más abundante en AA-2B y AA-7B, respectivamente, que en AA-0B, mientras que este satélite era 206 veces más abundante en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B que en AA-0B, y sólo 6 veces más abundante en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B (Tabla 3.4).
- 3) PauSat34-309 (Fig. 3.2C) mostró la mayor abundancia en la librería B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B con un pico de amplificación que coincidía con los de las librerías AA-B<sup>+</sup>, mientras que la librería B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B mostraba el pico a mayor divergencia. Además, PauSat34-309 era 43 y 108 veces más abundante en AA-2B y AA-7B, respectivamente, que en AA-0B, mostraba una sobreabundancia similar en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B (57 veces mayor que en AA-0B), pero ésta era muchísimo mayor (2009 veces) en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B (Tabla 3.4), indicando que este satélite se ha amplificado mucho más en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> que en AA-B<sup>+</sup>.
- 4) PauSat41-247, previamente denominado PaB6 (Emadzade et al. 2014) fue el satélite más abundante en el citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B (Fig. 2D), con un pico de amplificación coincidente con los de AA-B<sup>+</sup>, mientras que el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B mostró el pico a mayor divergencia (Tabla 3.5). La abundancia de PauSat41-247

en AA-2B y AA-7B fue 52 y 120 veces mayor que en AA-0B, mientras que en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B mostró una magnitud similar (119) pero en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B fue casi cuatro órdenes de magnitud mayor que en AA-0B (Tabla 3.4), indicando que los niveles de amplificación en AA-B<sup>+</sup> fueron más similares con los de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B que con los de B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B.

- 5) PauSat42-216 (Fig. 3.2E) no mostró recuentos en las librerías AA-0B (Tabla 3.4), pero mostró picos de amplificación en AA-B<sup>+</sup> que indicaban que esta familia es específica del cromosoma B en el citotipo AA. Sin embargo, este satélite se mapeó en las bibliotecas B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B, aunque con una abundancia extremadamente baja (Tabla 3.4). De hecho, este satélite fue 757 y 2653 veces más abundante en AA-2B y AA-7B, respectivamente, que en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B.

Una vez conocido el satelitoma de *P. autumnale*, incorporamos las secuencias consenso de esta colección de satélites a la base de datos de DNA repetitivo por defecto, y realizamos los mapeos necesarios para obtener estimas cuantitativas del contenido en DNA repetitivo de los cromosomas B de esta especie, tal como detallamos en la siguiente sección.

**Tabla 3.5.** Características de abundancia (Abun) y divergencia (Div) de los satélites sobreabundantes en el cromosoma B de *P. autumnale*.

Familia	Librería	Abun	Div
PauSat21A-559	AA-0B1	4.81E-05	13.4
	AA-0B2	2.48E-05	13.8
	AA-7B	3.25E-03	4.4
	AA-2B	1.75E-03	4.5
	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> -0B	2.22E-03	13.6
	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> -0B	3.64E-04	15.5
PauSat29A-114	AA-0B1	1.79E-05	12.6
	AA-0B2	4.70E-06	17.2
	AA-7B	5.55E-04	6.5
	AA-2B	2.75E-04	6.2
	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> -0B	2.33E-03	7.9
	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> -0B	7.00E-05	14.4
PauSat34A-309	AA-0B1	7.75E-06	11.1
	AA-0B2	4.54E-06	9.7
	AA-7B	6.65E-04	3.4
	AA-2B	2.67E-04	3.8
	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> -0B	3.49E-04	7.3
	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> -0B	1.23E-02	3.7
PauSat41A-247	AA-0B1	1.78E-06	14.0
	AA-0B2	2.64E-06	9.2
	AA-7B	2.64E-04	4.1
	AA-2B	1.16E-04	4.6
	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> -0B	2.62E-04	6.6
	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> -0B	2.07E-02	3.7
PauSat42A-216	AA-0B1	0.00E+00	
	AA-0B2	0.00E+00	
	AA-7B	1.13E-04	4.5
	AA-2B	3.22E-05	4.3
	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup> -0B	4.26E-08	4.5
	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> -0B	4.46E-08	4.5

### **Cuantificación de la abundancia de DNA repetitivo en el cromosoma B**

El mapeo de lecturas con SSAHA2 de los 281 clústeres ensamblados y los 7544 contigs contenidos en ellos (Tabla S3.1) sobre la base de datos de DNA repetitivo completada con las secuencias del satelitoma indicó una elevada proporción de repetitivo en las seis librerías analizadas, constituyendo éste el 80.2 % en AA-0B, el 81 % en AA-B, el 75.7 % en B6B6-0B y el 73.4 % en B7B7-0B (Tabla 3.6). Los elementos repetitivos más abundantes fueron LTR/Copia y LTR/Gypsy que, en conjunto, representaron casi el 75 % del genoma en los citotipos AA y un poco menos (67 %) en los otros dos citotipos.

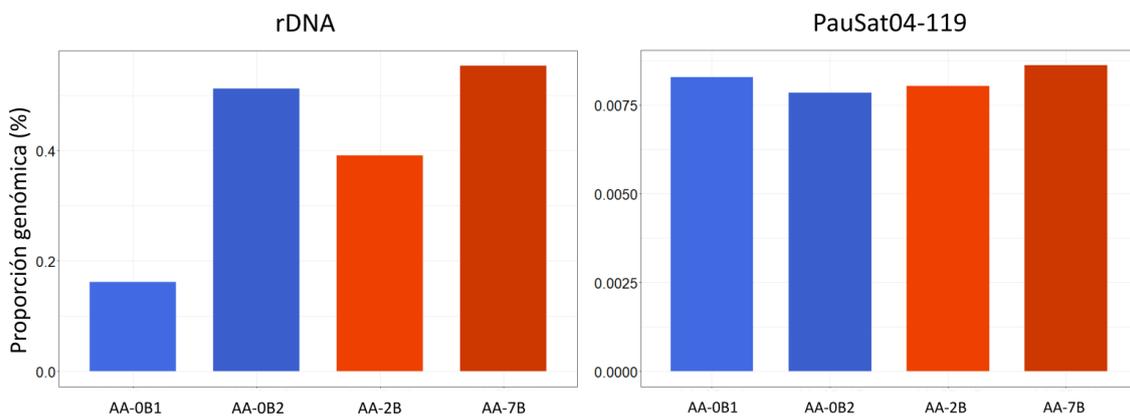
**Tabla 3.6.** Abundancia de las principales familias de DNA repetitivo en individuos con y B del citotipo AA, y en individuos 0B de los citotipos B6B6 y B7B7. av= average

Familia	AA_0B1	AA_0B2	av_AA_0B	AA_2B	AA_7B	av_AA_B*	B7B7	B6B6
DNA_TEs	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
LTR/Copia	48.4%	47.2%	47.8%	46.8%	50.0%	48.4%	41.9%	41.0%
LTR/Gypsy	25.4%	25.4%	25.4%	25.1%	25.9%	25.5%	25.3%	26.5%
Plastid	3.2%	2.4%	2.8%	3.2%	0.3%	1.7%	0.6%	0.2%
rDNA/45S	0.2%	0.5%	0.3%	0.4%	0.6%	0.5%	0.5%	0.4%
Satellite	0.7%	0.3%	0.5%	0.5%	0.9%	0.7%	0.7%	3.5%
Unknown	3.0%	3.3%	3.1%	3.6%	4.3%	3.9%	4.2%	3.9%
TOTAL	81.0%	79.3%	80.2%	79.8%	82.2%	81.0%	73.4%	75.7%

El análisis comparativo de las abundancias de estos elementos repetitivos en los individuos con 2B (umbral gFC= 1.068) y 7B (umbral gFC= 1.237) reveló que 572 contigs superaron el umbral de sobreabundancia en ambos individuos (Tabla S3.2), sugiriendo su presencia en el cromosoma B. En conjunto, la sobreabundancia en los dos individuos con B (que, en promedio, tenían 4.5 Bs) con respecto a 0B fue del 1 % considerando los 7544 contigs, implicando un incremento en DNA repetitivo del 0.23 % por B (Tabla S3.1). En cambio, en los 572 contigs que mostraron ser sobreabundantes en los individuos con B (Tabla S3.2), el incremento fue del 79.8 % (17.7 % por cromosoma B). Por tanto, el genoma de los individuos con B está muy enriquecido en estos 572 contigs, y es muy probable que estos contigs estén presentes en el cromosoma B.

Cuando los 572 contigs sobreabundantes en el cromosoma B se agruparon por tipos quedaron englobados en 29 categorías diferentes y que supusieron el mencionado 6.29% del B (Tabla S3.3). Sin embargo, dos de esos contigs mostraron menor abundancia en alguno de los individuos con B que en alguno de los individuos sin B (Figura 3.3), por lo que fueron descartados. Por tanto, finalmente quedaron 27 familias de DNA repetitivo que mostraron una sobreabundancia clara en los individuos con cromosomas B y que representaron el 6 % del DNA total del B (Tabla 3.7). Se observa que los elementos más abundantes en el B son transposones de tipo LTR/Copia (especialmente

Tork) y LTR/Gypsy), además de una variedad de elementos no anotados que pueden ser exclusivos de *Prospero*, o bien elementos ligeramente degenerados difíciles de anotar, pero todavía reconocibles como elementos repetidos. Además, destaca la presencia en el B de cuatro familias de satélites que muestran homología entre sí (constituyendo la superfamilia SF6), que ya encontramos en el análisis del satelitoma como elementos sobreabundantes en el B. Además, esta lista incluye otras 11 familias de satélites entre las que destaca PauSat42 que sólo fue encontrada en los individuos con cromosomas B y en los citotipos B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> (ver Tabla S3.3), como ya observamos en la sección anterior. Es de resaltar que los elementos más sobreabundantes en los individuos con B son las cuatro familias de satélites pertenecientes a la SF6 (ver valores de gFC en Tabla 3.7), sugiriendo la amplificación de estas familias en el cromosoma B, tal como muestran también las Tablas 3.4 y 3.5.



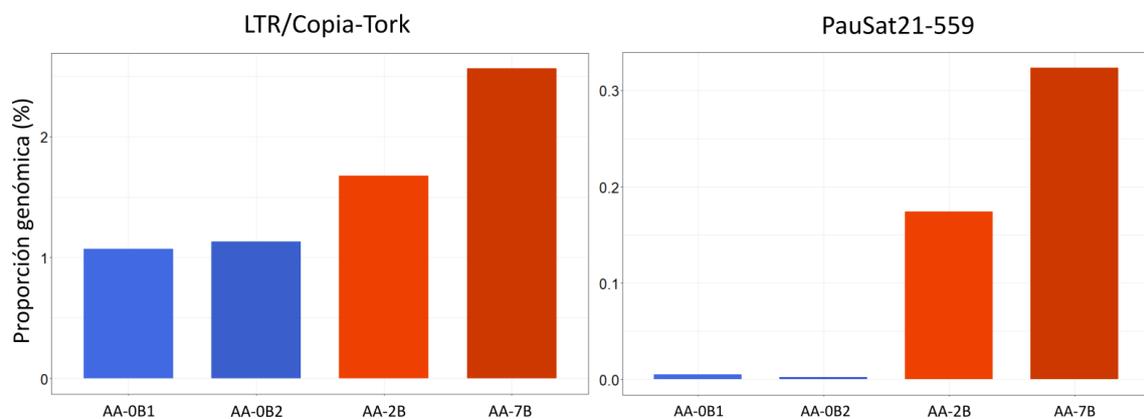
**Figura 3.3.** Familias de DNA repetitivo descartadas como presentes en el cromosoma B debido a que su abundancia en alguno de los individuos OB era mayor que en alguno de los individuos con cromosoma B.

**Tabla 3.7.** Abundancia de las 27 familias de DNA repetitivo que mostraron sobreabundancia en los individuos con B con respecto a los individuos sin B. gFC\_2B es el cociente entre la abundancia en el individuo 2B y el promedio de los dos individuos sin B (ver valores en Tabla S3.3). gFC\_7B es el mismo valor anterior para el individuo con 7B. AB+ es la abundancia promedio en los individuos con B y A1B la abundancia por cromosoma B (expresada como proporción del DNA contenido en el B). Prop/DNArep= Proporción con respecto al DNA repetitivo total detectado en el B. En color rojo se indican las cuatro familias de satélites pertenecientes a la superfamilia 6 (SF6).

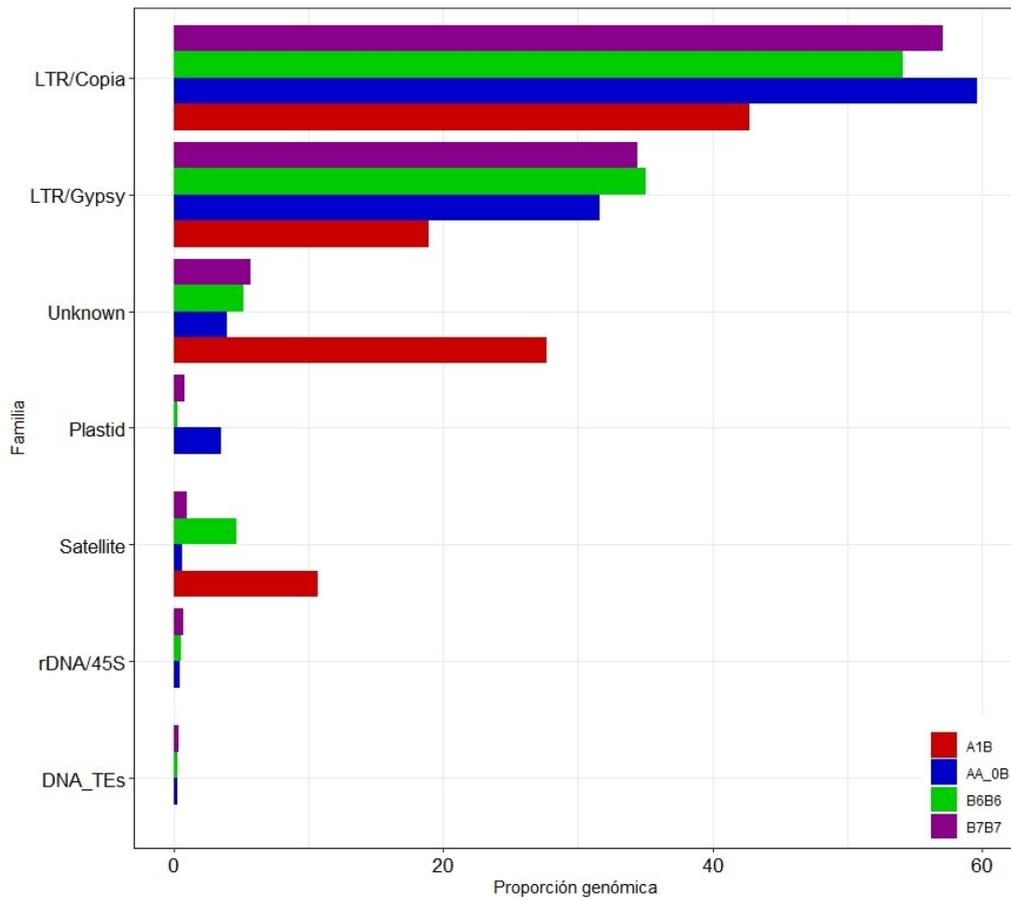
Familia	gFC_2B	gFC_7B	AB+	A1B	Prop/DNArepB
LTR/Copia	1.2	1.6	0.010713	0.002381	4.0%
LTR/Copia-Ale	1.2	1.5	0.001059	0.000235	0.4%
LTR/Copia-Angela	1.1	1.3	0.001607	0.000357	0.6%
LTR/Copia-Bianca	1.4	2.1	0.001103	0.000245	0.4%
LTR/Copia-Ikeros	1.1	1.3	0.000744	0.000165	0.3%
LTR/Copia-SIRE	1.2	1.6	0.011886	0.002641	4.4%
LTR/Copia-Tork	1.5	2.3	0.088036	0.019564	32.7%
<b>Total LTR/Copia</b>				<b>2.6%</b>	<b>42.7%</b>
LTR/Gypsy	1.2	1.4	0.029572	0.006572	11.0%
LTR/Gypsy-Athila	1.1	1.4	0.009070	0.002015	3.4%
LTR/Gypsy-TatRetand	1.2	1.4	0.003651	0.000811	1.4%
LTR/Gypsy-Tekay	1.1	1.4	0.008604	0.001912	3.2%
<b>Total LTR/Gypsy</b>				<b>1.1%</b>	<b>18.9%</b>
PauSat03B-213	1.2	1.4	0.000023	0.000005	0.0%
PauSat08AB-213	1.1	1.5	0.000594	0.000132	0.2%
PauSat13A-208	1.1	1.3	0.000313	0.000070	0.1%
PauSat14C-188	1.3	1.4	0.000097	0.000022	0.0%
PauSat20B-144	1.5	1.6	0.000006	0.000001	0.0%
<b>PauSat21A-559</b>	47.7	88.7	0.018572	0.004127	6.9%
PauSat26BC-77	1.3	2.3	0.000053	0.000012	0.0%
<b>PauSat29A-114</b>	24.7	50.0	0.003085	0.000686	1.1%
PauSat32A-143	1.2	1.5	0.000018	0.000004	0.0%
PauSat33C-66	4.0	4.5	0.000026	0.000006	0.0%
<b>PauSat34A-309</b>	43.3	107.4	0.003507	0.000779	1.3%
PauSat39A-33	2.3	17.7	0.000500	0.000111	0.2%
PauSat40A-37	1.5	3.2	0.000024	0.000005	0.0%
<b>PauSat41A-247</b>	53.4	122.4	0.001454	0.000323	0.5%
PauSat42A-216	∞	∞	0.000549	0.000122	0.2%
Total DNA satélite				<b>0.6%</b>	<b>10.7%</b>
Unknown	4.2	9.7	0.074644	<b>1.7%</b>	<b>27.7%</b>
TOTAL				6.0%	

El patrón habitual de sobreabundancia de estos elementos era el mostrado en la Figura 3.4, con abundancias mayores en individuos con B que sin B, y mayores en 7B que en 2B (obsérvese también cómo gFC\_7B es mayor que gFC\_2B en la Tabla 3.7). Agrupando las 27 familias en 7 tipos de mayor rango, la abundancia relativa de DNA repetitivo en los cromosomas B del citotipo AA (A1B, i.e., proporción de repetitivo en el DNA del B), en los cromosomas A de este citotipo (AA-0B) y en los citotipos B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B (Figura 3.5), se observa que, en general, los cromosomas B se encuentran empobrecidos en TEs y enriquecidos en DNA satélite y elementos repetitivos no

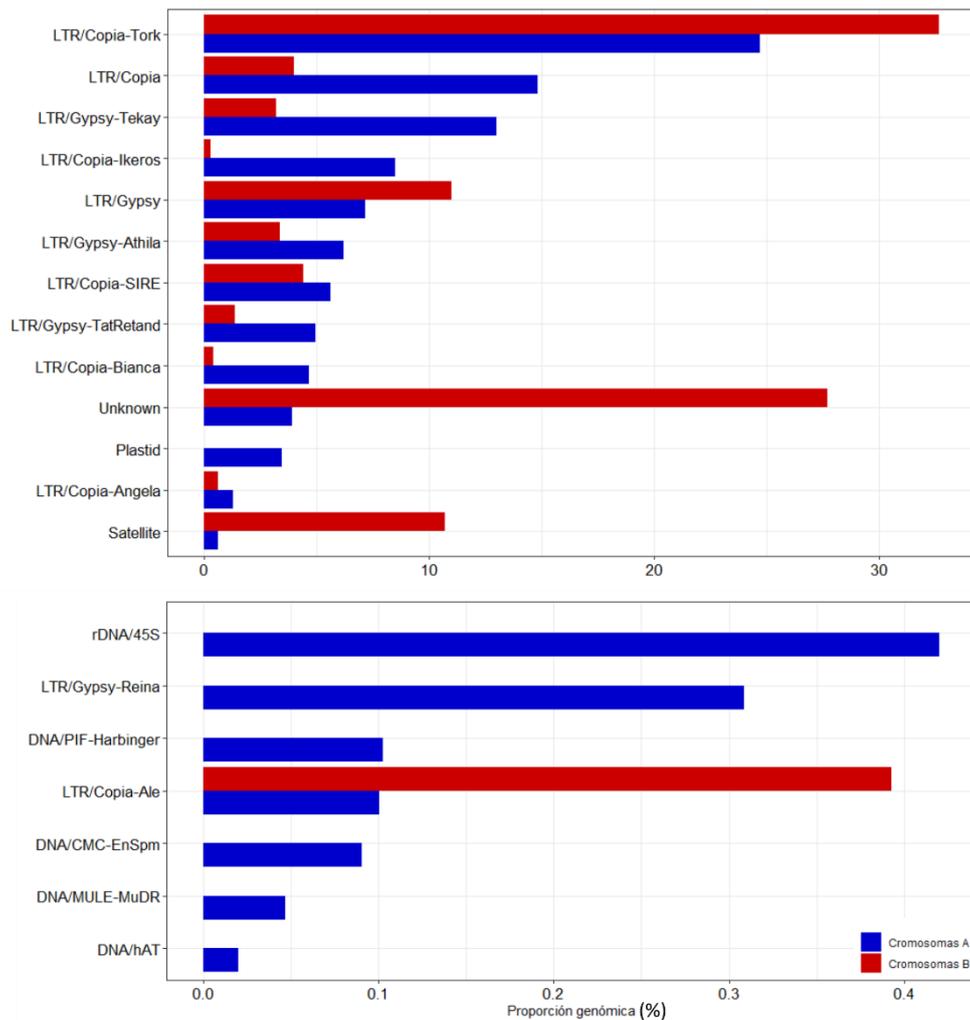
identificados (clase unknown), con respecto a las abundancias en los individuos sin B de los tres citotipos. Sin embargo, cuando se hace esa misma comparación entre individuos con y sin cromosomas B del citotipo AA, pero distinguiendo entre diferentes familias de TEs, se observa que algunos tipos de TEs están sobrerrepresentados en el cromosoma B, sobre todo elementos LTR/Copia/Tork y LTR/Gypsy, y, con menor abundancia, LTR/Copia/Ale (Figura 3.6). El resto de las familias encontradas en los cromosomas A están, sin embargo, infrarrepresentadas en los cromosomas B.



**Figura 3.4.** Patrón de diferencias en abundancia entre los dos individuos sin B (a la izquierda) y los dos con B (a la derecha). Obsérvese cómo la abundancia era mayor en los últimos y mayor en 7B que en 2B



**Figura 3.5.** Abundancia de las siete clases principales de DNA repetitivo en los cromosomas B del citotipo AA, y en los cromosomas A de los citotipos AA, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. Obsérvese que, en comparación con los cromosomas A, el cromosoma B está empobrecido en elementos transponibles y enriquecido en DNA satélite y elementos no anotados.



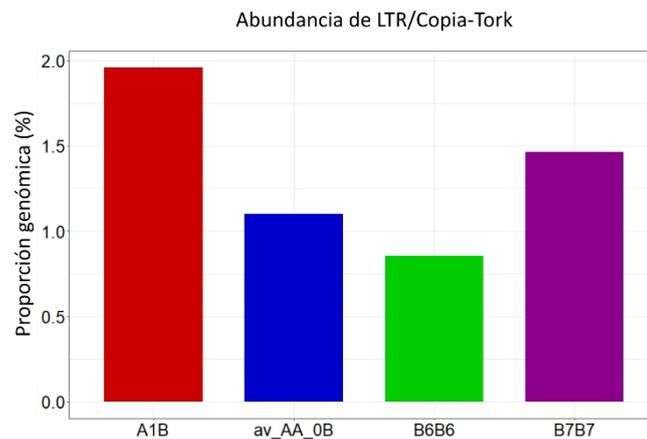
**Figura 3.6.** Proporción de los diferentes tipos de DNA repetitivo conocidos en los cromosomas A y B de *P. autumnale*.

### **Origen de los cromosomas B**

Para averiguar si los transposones que son sobreabundantes en el cromosoma B apoyan la hipótesis del origen del B en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, hemos realizado una serie de análisis de correlación de Spearman entre la abundancia de repetitivos en el B y la que se observa en cada uno de los tres citotipos (en individuos carentes de cromosomas B). Hicimos estos análisis a dos niveles: con todos los contigs (77 de satélites y 6660 anotados como TEs); y con los que son sobreabundantes en los individuos con B (18 y 490, respectivamente). Como muestra la Tabla 3.8, la abundancia del DNA satélite en el cromosoma B mostró la mayor correlación con su abundancia en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, pero la de los TEs mostró la mayor correlación con la observada en el citotipo AA, y el resultado fue igual en los dos niveles analizados. Esto podría ser un reflejo de la diferente movilidad intragenómica de estos dos tipos de elementos repetitivos, de forma que los TEs activos llegaron a todos los cromosomas (A y B) del citotipo AA, tendiendo a igualar su contenido, mientras que los satélites, por su menor movilidad entre cromosomas,

reflejan mejor el contenido original del cromosoma B, con excepción de las posibles amplificaciones que puedan haber ocurrido tras la llegada del B al citotipo AA. Una forma de comprobar esta hipótesis sería analizar el contenido de los cromosomas B existentes en poblaciones de citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.

En conjunto, estos resultados indican que la abundancia de transposones en los cromosomas B está correlacionada con la de los cromosomas A, mientras que la del DNA satélite parece reflejar el posible origen de los cromosomas B. No obstante, es de resaltar que el elemento LTR/Copia/Tork fue muy sobreabundante en el cromosoma B, con respecto a los cromosomas A del citotipo AA, y que este elemento fue más abundante en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> que en AA (Figura 3.7), reforzando la posibilidad del origen del B en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.



**Figura 3.7.** Abundancia del transposón LTR/Copia-Tork en los cromosomas A de los tres citotipos y en el cromosoma B de AA. Observe que este elemento muestra la mayor abundancia en el B y en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.

**Tabla 3.8.** Análisis de correlación de Spearman entre la abundancia de contigs repetitivos en el cromosoma B y la observada en los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y AA. El mayor valor de correlación es marcado, en cada caso, en negrita. Obsérvese que la abundancia del DNA satélite en el cromosoma B está más correlacionado con la de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, tanto para los 77 contigs observados como para los 18 que son sobreabundantes en los individuos con B. Por el contrario, la abundancia de los TEs muestra mayor correlación con la abundancia en los cromosomas A del citotipo AA, sobre todo para los 490 contigs sobreabundantes en +B.

Contigs analizados		Citotipo	N	rS	t(N-2)	P
SatDNA	Todos	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	77	<b>0.60</b>	6.52	<0.000001
		B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>	77	0.45	4.41	0.000034
		AA	77	0.18	1.57	0.121195
	Sobreabundantes en +B	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	18	<b>0.56</b>	2.72	0.015111
		B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>	18	0.54	2.56	0.020783
		AA	18	0.33	1.38	0.185133
TEs	Todos	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	6660	0.55	53.72	<0.000001
		B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>	6660	0.52	49.53	<0.000001
		AA	6660	<b>0.58</b>	58.31	<0.000001
	Sobreabundantes en +B	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	490	0.50	12.77	<0.000001
		B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>	490	0.53	13.90	<0.000001
		AA	490	<b>0.77</b>	26.82	<0.000001

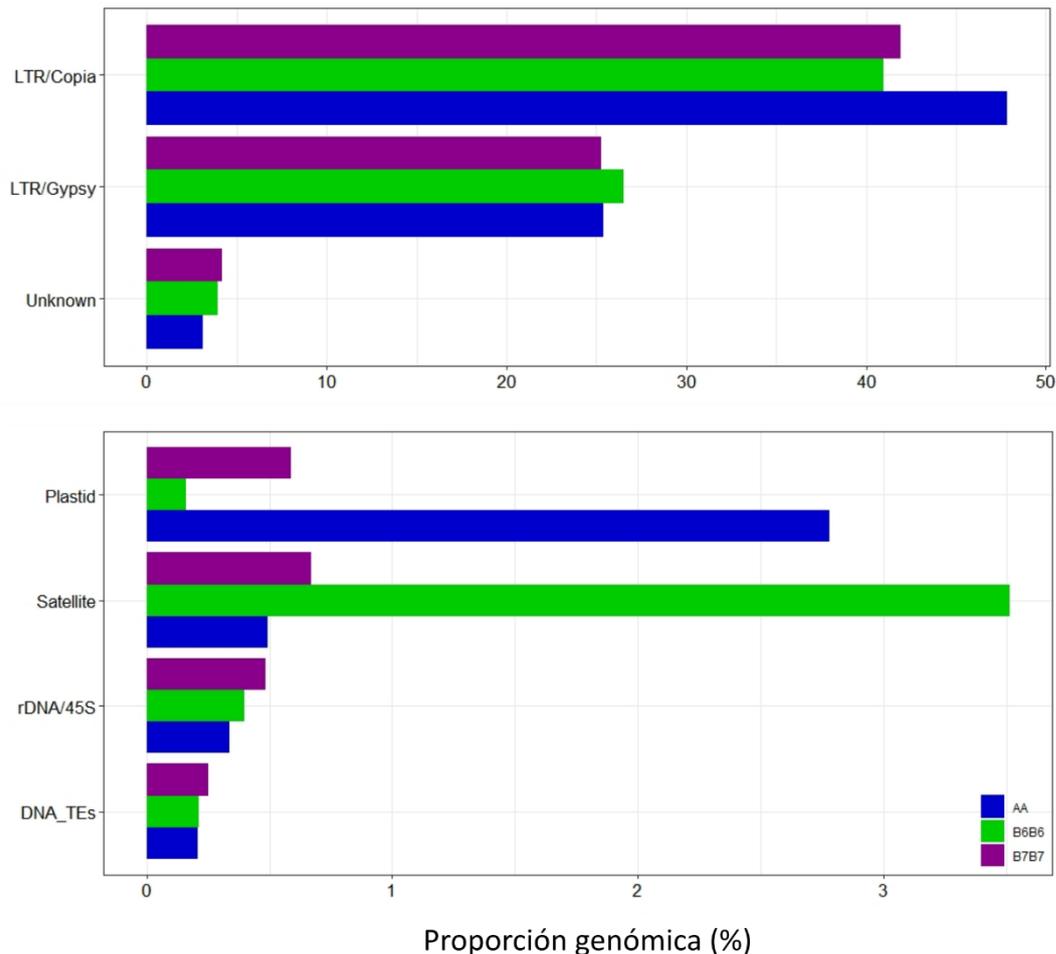
## Discusión

### ***El contenido en DNA repetitivo del genoma de *P. autumnale* no explica las diferencias en tamaño genómico entre los tres citotipos diploides***

El tamaño del genoma de los eucariotas presenta un impresionante rango, siendo 60.000 veces mayor en la especie con el genoma más grande que en la que muestra el más pequeño (Elliott and Gregory 2015). Aunque en menor medida, también se conocen especies que muestran notable variación intraespecífica, como son los casos del maíz (*Zea mays*), del complejo de especies de rotíferos *Branchionus plicatilis* y del escarabajo *Tribolium castaneum* (Blommaert 2020). Así, diferentes líneas de maíz muestran diferencias en tamaño genómico debido a diferentes proporciones de transposones (Tenailon et al. 2011). En los rotíferos *A. plicatilis*, las variaciones en el tamaño genómico entre miembros del complejo de especies (Stelzer et al. 2011) también parecen estar asociadas con diferencias en la proporción de transposones (Blommaert et al. 2019). En el caso de *T. castaneum*, se han descrito diferencias sustanciales en la cantidad de DNA satélite entre poblaciones (Feliciello et al. 2014).

Además de los cambios en la cantidad de DNA repetitivo, mencionados arriba, las variaciones en el tamaño genómico dependen de otros factores tales como la

poliploidía, la duplicación génica, los cromosomas B y los segmentos cromosómicos supernumerarios, siendo la poliploidía el que los produce a mayor escala (Blommaert 2020). Sin embargo, los resultados de esta tesis sobre tres citotipos diploides de la planta *P. autumnale* descartan que las diferencias se deban a poliploidía y, como veremos a continuación, a las diferencias observadas en el contenido en DNA repetitivo.



**Figura 3.8.** Abundancia de las siete clases principales de DNA repetitivo en los tres citotipos de *P. autumnale*. Observe que, en comparación con los otros citotipos, el AA se caracteriza por tener más LTR/Copia y más DNA plastidial, y el B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> por tener mayor proporción de DNA satélite.

*P. autumnale* constituye un complejo de especies crípticas en su morfología, que se diferencian en el número de cromosomas y en la cantidad de DNA genómico (Vaughan et al. 1997, Jang et al. 2013). Nuestra cuantificación de elementos repetitivos

mediante técnicas de NGS y análisis *in silico*, en los citotipos AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>, también refleja estas diferencias genómicas, sobre todo en la clase y abundancia de los distintos tipos de elementos repetidos (ver Tabla 3.6). Como se observa también en la Figura 3.8, las diferencias más sobresalientes son las mayores proporciones genómicas de elementos LTR/Copia y DNA plastidial en el citotipo AA, y la mayor proporción de DNA satélite en el B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>. Las diferencias en DNA plastidial recuperado pueden reflejar diferencias en el estado metabólico de las hojas de partida y, por lo tanto, no son relevantes para el objetivo de este estudio. No obstante, el resto de las diferencias son insuficientes para explicar las diferencias en tamaño genómico entre los tres citotipos, analizadas mediante citometría de flujo por Jang et al. (2013), incluyendo el hecho de que mediante esta técnica no se contabilizan los plastos que son casi el 3 % más abundantes en AA, pero esta diferencia no justifica las diferencias en tamaño genómico observadas por estos autores: 4.34 pg, 6.27 pg y 7.85 pg en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y AA, respectivamente (Tabla 3.9). Estos autores propusieron que B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> era el citotipo ancestral y que los citotipos AA y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> derivaron de éste. Como ambos tienen mayor tamaño genómico que B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, propusieron que ambos experimentaron un incremento en tamaño genómico, que fue del 44 % en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y del 81 % en AA (Tabla 3.9).

Sin embargo, los incrementos en DNA repetitivo que hemos observado nosotros explican sólo una parte ínfima de estos incrementos en tamaño genómico, ya que eran sólo del 3 % en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y del 9 % en AA. Por tanto, descartada la poliploidía y el bajo poder explicativo de los cambios en la cantidad de DNA repetitivo, resulta enigmática la variación en los tamaños del genoma estimadas por Jang et al. (2013). Posibles explicaciones podrían ser de tipo metodológico, debido a que los citotipos analizados por nosotros no proceden de las mismas poblaciones que los estudiados por estos autores, y podría darse el caso de que las diferencias en el contenido de DNA repetitivo sean mayores en las poblaciones analizadas por Jang et al. (2013). Otras posibles diferencias que podrían contribuir a las variaciones observadas en los tamaños genómicos son la existencia de diferencias entre poblaciones en la incidencia de duplicaciones génicas, en la longitud de los intrones, en la proporción de DNA repetitivo degenerado imposible de identificar con los métodos actuales, aunque la enorme proporción de DNA repetitivo encontrado por nosotros (75-80 %) deja poco margen para esta posibilidad, y en la tasa de delección de DNA repetitivo entre citotipos. Todo ello hace de *P. autumnale* una especie adecuada para el estudio de los cambios moleculares que explican la variación intraespecífica en el tamaño del genoma. Existen evidencias claras de que el tamaño genómico en eucariotas está correlacionado con la cantidad de DNA repetitivo, y de que conforme éste aumenta se observan mayores proporciones de transposones (Elliott and Gregory 2015). Sin embargo, esta conclusión no parece cumplirse en *P. autumnale* y será interesante plantear futuras investigaciones para desvelar esta incógnita.

**Tabla 3.9.** Comparación del tamaño genómico y la proporción de DNA repetitivo entre los tres citotipos de *P. autumnale* analizados en este trabajo. Los tamaños genómicos fueron tomados de Jang et al. (2013), y las proporciones de DNA repetitivo pueden encontrarse en las Tablas 3.5 y S3.1.

	Citotipo			B <sup>6</sup> B <sup>6</sup> /B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	AA/B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>
	B <sup>7</sup> B <sup>7</sup>	B <sup>6</sup> B <sup>6</sup>	AA		
Tamaño genómico (pg)	4.34	6.27	7.85	44%	81%
DNA repetitivo (%)	73.4%	75.7%	80.2%	3%	9%

### **Acumulación de elementos repetitivos en los cromosomas B**

Nuestros resultados han revelado que los cromosomas B de *P. autumnale* están enriquecidos en varios tipos de DNA repetitivo, principalmente transposones y satélites. Entre ellos, cabe destacar los elementos LTR de la superfamilia Copia, que comprenden el 42.7 % del DNA repetitivo detectado en el B, siendo Tork la familia más abundante de todas (32.7 %) seguida de SIRE (4.4 %) y otras cuatro familias que no llegaban al 1 % cada una (ver Tabla 3.7). Además, el 18.9 % del DNA repetitivo del B son elementos transponibles de la superfamilia LTR/Gypsy, siendo los más abundantes los pertenecientes a las familias Athila (3.4 %), Tekay (3.2 %) y TatRetand (1.4 %). Finalmente, el 10.7 % del DNA repetitivo del cromosoma B es DNA satélite de 15 familias diferentes, aunque las más sobreabundantes respecto a los cromosomas A son las cuatro pertenecientes a la superfamilia 6 (PauSat21A-559, PauSat29A-114, PauSat34A-309 y PauSat41A-247). Aun así, sólo las tres primeras sobrepasaban el 1 % del DNA repetitivo total detectado en el B, siendo PauSat21A-559 el más abundante en el B (6.9 %). Finalmente, un 27.7 % del repetitivo que mostraba sobreabundancia en el B no fue anotado (clase "unknown"), por lo que se trata de repetitivos que fueron reconocidos y ensamblados como tales por RepeatExplorer pero que no mostraron la suficiente homología con los elementos de la base de datos utilizada como referencia. Esto puede ser debido a la presencia en el genoma de *P. autumnale* de elementos transponibles particulares de este taxón que están aún sin identificar o bien elementos conocidos pero que están parcialmente degenerados debido a sustituciones nucleotídicas e inserciones de otros elementos repetitivos (principalmente transposones) que los hace irreconocibles respecto a su similitud con otros elementos anotados. Con todo, el carácter dispensable de los cromosomas B les hace susceptibles de la acumulación de este tipo de "basura genómica" (en el sentido de junk DNA, Graur et al. 2015) en mayor medida que en los cromosomas A. En conjunto, si comparamos los porcentajes observados en los cromosomas A y en el B (ver Figura 3.6 y Tabla 3.10) se hace evidente que sólo cuatro clases de elementos, además de la clase "unknown" que era 7 veces más abundante en el B, mostraron mayores porcentajes de DNA repetitivo en el B que en los A, y éstos fueron LTR/Copia/Tork (32 % más abundante en el B), una clase de elementos

LTR/Gypsy que no pudieron clasificarse por debajo del nivel de superfamilia (53 %), el DNA satélite (17 veces más abundante en el B) y LTR/Copia Ale (4 veces).

De todos estos elementos sobreabundantes en el B, los que más destacan son los satélites de la SF6, especialmente PauSat21-559 que es 113 veces más abundante en el B que en los cromosomas A (ver Tabla S3.3). La única estimación cuantitativa del contenido en DNA repetitivo de un cromosoma B realizada hasta el momento, que sea comparable a la que hemos realizado en *P. autumnale*, es la del saltamontes *Locusta migratoria* (Ruiz-Ruano et al. 2018), y los valores resultan muy diferentes entre las dos especies. Así, estos autores encontraron que el 95 % del DNA contenido en el cromosoma B de *L. migratoria* es repetitivo, una proporción muy superior al 64 % encontrado en los cromosomas A de esa especie. Además, el 65 % del B de *L. migratoria* está constituido por DNA satélite, con una sola familia representando el 55 % del DNA del B. Asimismo, estos autores encontraron una quimera de transposones localizada en una región intersticial del cromosoma B, constituida por hasta 29 tipos diferentes de transposones. Finalmente, la comparación del contenido de los cromosomas A y B los llevó a la conclusión de que los cromosomas B de *L. migratoria* están enriquecidos en DNA satélite (como hemos descrito arriba) y empobrecidos en elementos transponibles, un resultado que no coincide con las observaciones cualitativas anteriores en otros organismos (ver Camacho 2005). El caso de *P. autumnale* contrasta drásticamente con el anterior, ya que nosotros hemos detectado sólo el 6 % de DNA repetitivo en el B y el 80 % en los A. Aun así, este cromosoma B también ha demostrado estar enriquecido en DNA satélite, sobre todo de la SF6, y muestra un empobrecimiento general en transposones, con la excepción de los elementos Tork, Ale y Gypsy mencionados arriba. La pequeña proporción de DNA repetitivo en el B de *P. autumnale* contrasta también con la idea generalizada de los cromosomas B como elementos heterocromáticos llenos de DNA repetitivo (para revisión, ver Camacho 2005).

**Tabla 3.10.** Abundancia de los principales elementos repetitivos sobreabundantes en los cromosomas B, y su abundancia en los cromosomas A y del contenido en el B (A1B) y del genoma, respectivamente. B/A= cociente entre la abundancia en los cromosomas B y A. Prop/DNArep= proporci

Family	AA_0B_14	AA_0B_17	AA_2B_17	AA_7B_14	B7B7	B6B6	av_AA0B	A1B
DNA/hAT	0.000168463	0.000153371	0.000147638	0.00015611	8.71248E-05	0.000103931	0.000161	
DNA/MULE-MuDR	0.000367618	0.000380797	0.000357682	0.000378492	0.000825333	0.000424855	0.000374	
DNA/CMC-EnSpm	0.000728102	0.000717988	0.000695336	0.00083472	0.000727304	0.000898884	0.000723	
LTR/Copia-Ale	0.00078511	0.000821516	0.000854067	0.000953986	0.001384274	0.001087907	0.000803	0.0002
DNA/PIF-Harbinger	0.000767649	0.000875571	0.000820026	0.000758246	0.000856015	0.000718594	0.000822	
LTR/Gypsy-Reina	0.002287343	0.002662898	0.002672754	0.001777059	0.004112885	0.00273177	0.002475	
rDNA/45S	0.001617382	0.005120857	0.003911265	0.005533516	0.004839194	0.00396603	0.003369	
Satellite	0.006693437	0.003174376	0.005381189	0.008799509	0.006714896	0.035111076	0.004934	0.0064
LTR/Copia-Angela	0.010071262	0.010178718	0.010057187	0.011777576	0.009766487	0.009085607	0.010125	0.0003
Plastid	0.031985804	0.023595587	0.031548949	0.003164624	0.005877793	0.001608236	0.027791	
Unknown	0.02987171	0.032990954	0.036033788	0.042586577	0.042014029	0.039197634	0.031431	0.0165
LTR/Copia-Bianca	0.037109566	0.037332475	0.036154507	0.03760845	0.030438562	0.03431673	0.037221	0.0002
LTR/Gypsy-TatRetand	0.036822567	0.042591054	0.043834557	0.040007353	0.04604617	0.030649942	0.039707	0.0008
LTR/Copia-SIRE	0.046948763	0.043423402	0.043252436	0.049881732	0.035485474	0.040024986	0.045186	0.0026
LTR/Gypsy-Athila	0.050590903	0.049128476	0.048347792	0.053623938	0.036789474	0.036860646	0.04986	0.0020
LTR/Gypsy	0.058586806	0.056500221	0.057210211	0.064688534	0.057447242	0.066571707	0.057544	0.0065
LTR/Copia-Ikeros	0.070601887	0.065503717	0.060550318	0.066697071	0.049226046	0.061230975	0.068053	0.0001
LTR/Gypsy-Tekay	0.10525369	0.102953646	0.098960767	0.099139242	0.108151782	0.12824841	0.104104	0.0019
LTR/Copia	0.121559874	0.11645835	0.111995651	0.12631832	0.100009433	0.127496596	0.119009	0.0023
LTR/Copia-Tork	0.197289304	0.198702149	0.20551217	0.20715574	0.192814935	0.136442509	0.197996	0.0195
TOTAL	0.810107241	0.793266125	0.798298291	0.821840794	0.733614452	0.756777024	0.801687	0.0598

Podríamos pensar que esa baja proporción de repetitivo pudiera haber resultado de la existencia de más de un tipo de cromosomas B en la población, de forma que los dos Bs del individuo 2B no fueran totalmente equivalentes a los 7 del individuo 7B, ya que nuestro método de selección de contigs sobreabundantes en el B incluye un umbral que cada individuo debe pasar y que depende de su número de Bs. Nuestro cálculo de la abundancia en el B (A1B) lo hicimos para el promedio (4.5 Bs) e indicó un 6 % de DNA repetitivo en el B. Si hubiéramos relajado este filtro de modo que el umbral fuese superado por un sólo individuo, el cálculo con el promedio hubiera dado un 4.3 % más de DNA repetitivo. Y si hubiéramos realizado los cálculos independientemente para cada individuo, hubiéramos obtenido el 14.5 % con el individuo 2B y el 11.3 % con el 7B. Como vemos, en ambos casos la proporción de DNA repetitivo del B es muy baja y muy inferior al 80 % de los cromosomas A del citotipo AA.

Otra posible justificación de la baja proporción de DNA repetitivo observada en el B de *P. autumnale* es que éste contenga mucho DNA degenerado. Si el 80 % de los cromosomas A es DNA repetitivo, no todo el 20 % restante corresponde a genes, ya que supone unas 1.5 Gb que excede, con mucho, el tamaño de los genomas completos de muchos eucariotas. Por tanto, es de esperar que esta parte incluya también pseudogenes y otros tipos de DNA degenerado. Pero sería muy sorprendente que la proporción de este tipo de DNA en el B alcanzara el 94 %, teniendo en cuenta, además, que el B de esta especie también contiene genes (ver capítulo 4 de esta tesis) y que el número medio de copias por genoma haploide observado para los 133 contigs génicos que mostraron sobreabundancia en los cromosomas B era 1.5 en 0B y 61.5 en +B, sugiriendo que los genes del B están ampliamente repetidos. Sería interesante investigar qué parte del 94 % no repetitivo del B sería explicada por las duplicaciones génicas, aunque, a priori, también parece insuficiente. Otras posibles explicaciones serían que el B es joven y no tiene por qué estar especialmente enriquecido en DNA repetitivo, que irá acumulando DNA degenerado por mutación y transposición de TEs que no es fácil de detectar con la metodología que hemos aplicado.

### **Origen del cromosoma B del citotipo AA**

El análisis del satelitoma de *Prospero autumnale* ha proporcionado interesantes detalles sobre el origen de los cromosomas B en las poblaciones AA del sur de la Península Ibérica. En total, el satelitoma de esta especie está constituido por 42 familias de satélites, cinco de las cuales mostraron sobreabundancia superior a un orden de magnitud en los genomas con cromosomas B, siendo uno de ellos específico del cromosoma B (PauSat42-216). Por otra parte, la comparación de la abundancia de los

42 satélites entre las plantas OB del citotipo AA y los citotipos B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, también OB, reveló que los 5 satélites que eran sobreabundantes en el B del citotipo AA también lo eran en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> con respecto a AA. Esto indica que el satDNA del cromosoma B es más parecido al de los cromosomas A de estos dos citotipos que a los del propio citotipo AA donde se encuentra el B, sugiriendo así que este cromosoma B podría proceder de uno de los citotipos de tipo B. El hecho de que el citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> sólo se encuentra en Creta mientras que el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> se distribuye por toda Europa (Jang et al. 2013), incluyendo la Península Ibérica, hace más probable que el origen de este cromosoma B fuera por introgresión desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.

Aunque la mayoría de los cromosomas B estudiados en diferentes especies parecen proceder de su propio genoma hospedador (ver revisión en Camacho 2005), también se han encontrado ejemplos de cromosomas B que se han originado por introgresión desde especies relacionadas, incluyendo la demostración experimental de Perfectti and Werren (2001). Este es el caso del cromosoma PSR ("paternal sex ratio") de la avispa *Nasonia vitripennis*, que parece haberse originado por hibridación con una especie relacionada del género *Trichomalopsis* (McAllister and Werren 1997, Benetta et al. 2020), o el cromosoma B de la abeja *Partamona helleri*, donde la presencia en varias especies del mismo género de un marcador SCAR específico del B sugirió la posibilidad de su introgresión interespecífica (Tosta et al. 2014). Lo mismo podemos decir del género de plantas *Coix*, cuyos cromosomas B también se han originado por hibridación interespecífica (Sapre and Deshpande 1987), o en el género *Cestrum* en donde se han encontrado una gran variedad de familias de DNA repetido, y se han descrito cromosomas B en varias especies, así como en un híbrido interespecífico (Vanzela et al. 2017). Nuestros resultados en *P. autumnale* son similares a los mencionados, pero al nivel intraespecífico, aunque el DNA satélite y los TEs ofrecen versiones diferentes de la historia evolutiva del cromosoma B, dado que el primero apunta en la dirección de una introgresión del B desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> al AA, posterior al origen del citotipo AA, mientras que los elementos LTR/Copia/Tork, que son los TEs más abundantes en AA y en el B (ver Tabla 3.10) y son más abundantes en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> que en AA y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> (ver Figura 3.7), sugieren una oleada de actividad y distribución intragenómica posterior a la llegada del B al citotipo AA, alcanzando así tanto a los cromosomas A como al B. Esta diferencia es lógica debido a que estos dos tipos de elementos repetitivos muestran claras diferencias en su tasa de movilidad intragenómica que, cuando es alta, puede complicar mucho la reconstrucción del origen del B. De hecho, el DNA satélite ha proporcionado información valiosa sobre el origen de algunos cromosomas B, como es el caso de algunos estudios recientes mediante secuenciación NGS e hibridación in situ fluorescente (FISH). Es el caso, por ejemplo, del saltamontes *Eumigus monticola* (Ruiz-Ruano et al. 2017) donde el autosoma S8 comparte dos familias de DNA satélite en exclusiva con el cromosoma B, o en *Locusta migratoria* donde se ha sugerido que los cromosomas 8 y 9 del complemento estándar pudieran participar como ancestros del B por compartir con él,

en exclusiva, el clúster de los genes para histonas y un DNA satélite (Ruiz-Ruano et al. 2018). En el pez *Moenkhausia sanctaefilomenae* se ha encontrado dos tipos de cromosomas B que contienen DNA ribosómico 18S, genes de la histona H3 y dos familias de satDNA, que sólo se encuentran juntas en el cromosoma 6, sugiriendo que éste puede ser el cromosoma A que dio origen de estos cromosomas B (Utsunomia et al. 2016). Análisis similares sobre DNA repetitivo en el caso del pez *Characidium gomesi* sugirieron que los cromosomas B podrían haber derivado de los cromosomas sexuales (Serrano-Freitas et al. 2020). En el caso de *P. autumnale*, la hipótesis del origen del B del citotipo AA mediante introgresión desde el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> podría ponerse a prueba mediante futuros análisis de FISH de los cinco satélites sobreabundantes en los cromosomas A y B de los diferentes citotipos, así como mediante el análisis del contenido en DNA repetitivo y genes en cromosomas B de diferentes poblaciones del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. Esto permitiría poner a prueba, además, la hipótesis de Jang et al. (2016) que propone el origen recurrente de los cromosomas B de *Prospero autumnale*, y su posible compatibilidad con la introgresión que proponemos nosotros. Estos autores realizaron análisis de FISH para los DNAs ribosómicos 5S y 35S, y para un satélite denominado PaB6 que coincide en secuencia con nuestro PauSat41-247, un miembro de la superfamilia SF6 que daba bandas FISH en todos los Bs que analizaron en los citotipos AA, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. Jang et al. (2016) observaron que los Bs que mayor variación mostraban en el contenido de los DNAs repetitivos analizados eran los del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, con 8 tipos diferentes de Bs frente a uno sólo en el AA. Esta observación es compatible con el posible carácter ancestral de los Bs de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y, por tanto, con la hipótesis de su introgresión posterior hacia el AA. Además, Jang et al. hicieron hibridación genómica in situ (GISH) entre B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y los otros dos citotipos. Los resultados les llevaron a concluir el origen recurrente e independiente de los cromosomas B de *P. autumnale* en los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y AA. Nuestros resultados son complementarios en cuanto que indican que el B de AA está enriquecido en varios TEs de tipo LTR/Copia (Tork y Ale) y LTR/Gypsy cuya abundancia ha aumentado simultáneamente en los cromosomas A y B del citotipo AA, y cuya localización dispersa en los cromosomas explica la coloración intermedia de los cromosomas B en los resultados de GISH de la Figura 4d de Jang et al. (2016).

Se ha estimado que el género *Prospero* se originó hace 6-7 Ma (Ali et al. 2011) y que *P. autumnale* surgió hace sólo 1 Ma (Emadzade et al., sin publicar, mencionado en Jang et al. 2016). Esto delimita el origen de esta especie y sus cuatro citotipos dentro de los sucesivos períodos glaciares e interglaciares del Pleistoceno (Parker et al. 1991, Jang et al. 2013). El citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> es el más extendido geográficamente, y probablemente sea el ancestral del que han derivado los demás (Jang et al. 2013).-Como el citotipo AA es simpátrico con B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> en la Península Ibérica, es concebible que pudiera haber ocurrido un evento de hibridación entre los dos citotipos. Es plausible que los cambios climáticos asociados a las glaciaciones del Pleistoceno pudieran haber facilitado los eventos de hibridación que dieron lugar primero al aislamiento y diferenciación del citotipo AA en

la mitad sur de la Península Ibérica y después a la introgresión que inició la presencia del cromosoma B en este citotipo. Además, la presencia de un satélite específico del B (PauSat42-216), que no dio conteos de abundancia en los dos individuos OB del citotipo AA, pero sí lo hizo en el individuo OB del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, aboga por el origen del B separado del origen del citotipo AA, ya que, de haber derivado junto con el B sería de esperar que este satélite también estuviera presente en los cromosomas A del citotipo AA, y no lo está. Esta observación, y el hecho de que los cuatro satélites de la SF6 (especialmente PauSat21-559) son muy escasos en AA y muy abundantes en el B y en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, apoyan el origen del B mediante introgresión. Además, nuestros resultados actuales serían compatibles tanto con que el B se hubiera originado en el mismo momento de la introgresión, a partir de los cromosomas B de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, o bien que fuese introgresado posteriormente. Estas hipótesis alternativas podrían someterse a prueba analizando el contenido génico y en DNA repetitivo de los cromosomas B encontrados en poblaciones del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> localizadas en varias regiones geográficas europeas.

## Referencias

- Ali SS, Yu Y, Pfosser M, Wetschnig W. 2011. Inferences of biogeographical histories within subfamily Hyacinthoideae using S-DIVA and Bayesian binary MCMC analysis implemented in RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies). *Annals of Botany* 109:95–107.
- Benetta ED, Antoshechkin I, Yang T, Nguyen H Q M, Ferree P M and Akbari O S. 2020. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. *Science Advances*, 6(14), eaaz9808. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9808>
- Bennetzen JL, Ma J, Devos KM. 2005. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany* 95: 127–132. doi:10.1093/aob/mci008
- Beukeboom LW. 1994. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome conference. *Heredity* 73. 328-336.
- Blommaert J, Riss S, Hecox-Lea B, Mark Welch D B and Stelzer C P. 2019. Small, but surprisingly repetitive genomes: Transposon expansion and not polyploidy has driven a doubling in genome size in a metazoan species complex. *BMC Genomics*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5859-y>
- Blommaert J. 2020. Genome size evolution: towards new model systems for old questions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1933). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1441>

- Blunden R, Wilkes T J, Forster J W, Jimenez M M, Sandery M J, Karp A and Jones R N. 1993. Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome*, 36(4), 706–711. <https://doi.org/10.1139/g93-095>
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM and Cabral de Mello DC. 2013. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS One*. 2013 Jun 27; 8(6): e66532. doi: 10.1371/journal.pone.0066532.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. Pp. 223–286 in T. R. Gregory, ed. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, CA.
- Camacho J P M, Shaw M W, López-León M D, Pardo M C and Cabrero J. 1997. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*, 149(6), 1030–1050. <https://doi.org/10.1086/303364>
- Camacho JPM, Shaw MW, Cabrero J, Bakkali M, Ruiz-Estevéz M, Ruiz-Ruano FJ, Martín-Blázquez R and López-León MD. 2015. Transient microgeographic clines during B chromosome invasions. *The American Naturalist*. 186: 675–681.
- Cheng YM, Lin BY. 2004. Molecular organization of large fragments of maize B chromosome: indication of a novel repeat. *Genetics* 166:1947–1961
- Coan RLB and Martins C. 2018. Landscape of transposable elements focusing on the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genes* 9. 269. doi:10.3390/genes9060269
- Dhar MK, Kour J and Kave S. 2019. Origin, behaviour, and transmission of B chromosome with special references to *Plantago lagopus*. *Genes* 10, 152.
- Doležel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytom Part A* 51: 127–128 (2003).
- Donald TM, Leach CR, Clough A, Timmis JN. 1995. Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. *Heredity (Edinb)*.74 (Pt 5):556-61. doi: 10.1038/hdy.1995.77. PMID: 7759291.
- Ebert I, Greilhuber J, Speta F. 1996. Chromosome banding and genome size differentiation in *Prospero (Hyacinthaceae)*: Diploids. *Pl Syst Evol* 203, 143–177. <https://doi.org/10.1007/BF00985242>
- Egan AN, Schlueter J, Spooner DM. 2012. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany* 99(2): 175–185. doi:10.3732/ajb.1200020

- El Baidouri M and Panaud O. 2013. Comparative genomic paleontology across plant kingdom reveals the dynamics of TE driven genome evolution. *Genome Biol. Evol.* 5(5):954–965. doi:10.1093/gbe/evt025.
- Elliott T A and Gregory T R. 2015. What’s in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0331>
- Emadzade K, Jang TS, Macas J, Kovařík A, Novák P, Parker J, Weiss-Schneeweiss H. 2014. Differential amplification of satellite PaB6 in chromosomally hypervariable *Prospero autumnale* complex (Hyacinthaceae). *Ann Bot.* 114(8):1597-608. doi: 10.1093/aob/mcu178.
- Fedoroff N. 2000. Transposons and genome evolution in plants. *PNAS*, vol 97, nº 13:7002-7007.
- Feliciello I, Akrap I, Brajković J, Zlatar I, Ugarković Đ. 2014 Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Biol. Evol.* 7, 228–239. (doi:10. 1093/gbe/evu280)
- Feschotte C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet.* 9(5):397-405. doi: 10.1038/nrg2337.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics.* 17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49.
- Hanlon SL, Miller DE, Eche S, Hawley RS. Molecular analysis of *Drosophila melanogaster* B chromosomes reveals their origin, composition and structure doi: <https://doi.org/10.1101/386995>
- Houben A, Leach CR, Verlin D, Rofe R, Timmis JN. 1997. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma.* 106(8):513-9. doi: 10.1007/pl00007689. PMID: 9426283.
- Houben A, Verlin D, Leach CR, Timmis JN. 2001. The genomic complexity of micro-B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 110(7):451–459. doi 10.1007/s00412-001-0173-1
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S and Timmis JN. 2014. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 467–478. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1437-7>
- Huang W, Du Y, Zhao X and Jin W. 2016. B chromosomes contains active genes and impact the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant biology.* 16:88. DOI 10.1186/s12870-016-0775-7

- Jang TS, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leitch AR, Speta F and Weiss-Schneeweiss H. 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evol Biol* **13**, 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-136>
- Jang TS, Parker JS, Weiss-Schneeweiss H. 2016. Structural polymorphisms and distinct genomic composition suggest recurrent origin and ongoing evolution of B chromosomes in the *Prospero autumnale* complex (Hyacinthaceae). *New Phytologist* ;210(2):669-79. doi: 10.1111/nph.13778.
- Jones RN. 1991. B-chromosome drive. *The American Naturalist*, Vol. 137, No. 3, Symposium: The Genetics and Evolutionary Biology of Meiotic Drive, pp. 430-442
- Jones N. 2012. B chromosomes in plants. *Plant Biosystems*, Vol. 146 (3) :727–737.
- Jones N. 2017. New species with B chromosomes discovered since 1980. *The Nucleus* 60: 263–281. Doi: 10.1007/s13237-017-0215-6.
- Jones N and Houben A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *TRENDS in Plant Science* 8(9):417-23.
- Jones R N and Rees H. 1982. *B Chromosomes*. London: Academic Press.
- Jones RN and Houben A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *TRENDS in Plant Science* 8(9):417-23.
- Jones RN, Viegas W, Houben A.2008. A century of B chromosomes in plants: so what? *Annals of Botany* Volume 101, Issue 6:767–775, <https://doi.org/10.1093/aob/mcm167>
- Jones RN. 2012. B chromosomes in plants. *Plant Biosystems*, Vol. 146 (3) :727–737.
- Kejnovsky E, Hawkins JS, Feschotte C. 2012. Plant transposable elements: biology and evolution. In: Wendel J., Greilhuber J., Dolezel J., Leitch I. (eds) *Plant Genome Diversity* Volume 1. Springer, Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1130-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1130-7_2)
- Kour G, Kaul S and Dhar MK.. 2014. Molecular characterization of repetitive DNA sequences from B chromosome in *Plantago lagopus* L. *Cytogenet Genome Res.*142(2):121-8. doi: 10.1159/000356472
- Kumke K, Macas J, Fuchs J, Altschmied L, Kour J, Dhar MK and Houben A.2016. *Plantago lagopus* B chromosome is enriched in 5S rDNA-derived satellite DNA *Cytogenet Genome Res.* 148(1):68-73. doi: 10.1159/000444873.

- Lamb JC, Kato A, Birchler JA. 2005. Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma* 113:337–349
- Lamb J C, Riddle N C, Cheng Y-M, Theuri J and Birchler J A. 2007. Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Research*, 15(3), 383–398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429746>
- Lanzas P, Perfectti F, Garrido-Ramos MA, Ruíz-Rejón C, González-Sánchez M, Puertas M, Camacho JPM. 2018. Long-term monitoring of B-chromosome invasion and neutralization in a population of *Prospero autumnale* (Asparagaceae). *Evolution* 72(6):1216-1224. doi: 10.1111/evo.13501. Epub 2018 May 25. PMID: 29741266.
- Leach CR, Houben A and Timmis JN. 2004. The B chromosomes in *Brachycome*. *Cytogenet. Genome Res.* 106: 199-209.
- Lee SI, Kim NS. 2014. Transposable elements and genome size variations in plants. *Genomics Inform.*12(3):87-97. doi: 10.5808/GI.2014.12.3.87. Epub 2014 Sep 30. PMID: 25317107; PMCID: PMC4196380.
- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.*22(13):1658-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158. Epub 2006 May 26. PMID: 16731699.
- Li, ZW, Hou, XH, Chen, JF, Xu, YC, Wu, Q, González J, Guo, YL. 2018. Transposable elements contribute to the adaptation of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol Evol.* 10(8):2140-2150. doi: 10.1093/gbe/evy171.
- Lisch D. 2013. How important are transposons for plant evolution? *Nature Reviews Genetics.* 14(1):49-61. doi: 10.1038/nrg3374.
- López-León M, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison J, Hewitt G and Camacho J. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research*, 2(2), 87–92. <https://doi.org/10.1007/BF01553487>
- Ma W, Gabriel TS, Martis MM, Gursinsky T, Gursinsky T, Schubert V, Vrána J, Doležel J, Grundlach H, Altschmied L., Moghaddam U, Houben, A. 2016. Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog (Suppl. info). *New Phytologist.* <https://doi.org/10.1111/nph.14110>
- Maluszynska J, Schweizer D. 1989. Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity (Edinb)* 62 (Pt 1):59-65. doi: 10.1038/hdy.1989.8. PMID: 2732088.

- Marques A, Klemme S, Guerra M, Houben A . 2012. Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants. *Molecular cytogenetics*. 5(1):34. doi: 10.1186/1755-8166-5-34.
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, Gundlach H, Wicker T, Šimková H, Novák P, Neumann P, Kubaláková M, Bauer E, Haseneyer G, Fuchs J, Doležel J, Stein N, Mayer KF, Houben A. 2012. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(33):13343-6. doi: 10.1073/pnas.1204237109.
- McAllister B F, and Werren J H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106(4), 243–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254726>
- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano F J, Camacho J P M, Cabrero J and López-León M D. 2017. Transcription of a B chromosome CAP-G pseudogene does not influence normal Condensin Complex genes in a grasshopper. *Scientific Reports*, 7(June), 17650. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15894-5>
- Ning Z, Cox AJ, Mullikin JC. 2001. SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res*. 11(10):1725-9. doi: 10.1101/gr.194201. PMID: 11591649; PMCID: PMC311141.
- Novák P, Neumann P, Macas J. 2010. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*.15;11:378. doi: 10.1186/1471-2105-11-378. PMID: 20633259; PMCID: PMC2912890.
- Ohta S and Saruhashi Y. 1999. Geographical distribution of B chromosomes in *Aegilops mutica* Boiss., a wild relative of wheat. *Hereditas* 130 (2). 177-183.
- Oliver KR, McComb JA, Greene WK. 2013. Transposable elements: powerful contributors to angiosperm evolution and diversity. *Genome Biol Evol*.5(10):1886-901. doi: 10.1093/gbe/evt141. PMID: 24065734; PMCID: PMC3814199.
- Parker J, Jones G, Edgar, L. Whitehouse C. 1991. The population cytogenetics of *Crepis capillaris* IV. The distribution of B-chromosomes in British populations. *Heredity* 66, 211–218 (1991). <https://doi.org/10.1038/hdy.1991.27>
- Perfectti F and Werren J H. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution*, 55(5), 1069–1073. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055\[1069:tioobc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055[1069:tioobc]2.0.co;2)
- Poletto AB, Ferreira IA and Martins C. 2010. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genet* 11, 1 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-1>

- Ruban A, Fuchs J, Marques A, Schubert V, Soloviev A, Raskina O, Badaeva E, Houben A. 2014. B chromosomes of *Aegilops speltoides* are enriched in organelle genome-derived sequences. PLOS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090214>
- Ruban A, Schmutzer T, Scholz U, Houben A. 2017. How Next-Generation Sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. *Genes*, 8(11). pii: E294. doi: 10.3390/genes8110294.
- Ruiz-Estévez M, López-León M D, Cabrero J and Camacho J P M. 2012 B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PloS One*, 7(5), e36600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036600>
- Ruiz-Ruano F J, López-León M D, Cabrero J and Camacho J P M. 2016. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports*, 6(January), 28333. <https://doi.org/10.1038/srep28333>
- Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM. 2017. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma*.126(4):487-500. doi: 10.1007/s00412-016-0611-8.
- Ruiz-Ruano F J, Cabrero J, López-León M D, Sánchez A and Camacho J P M. 2018. Quantitative sequence characterization for repetitive DNA content in the supernumerary chromosome of the migratory locust. *Chromosoma*, 127(1), 45–57. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0644-7>
- Sandery M J, Forster J W, Blunden R and Jones RN. 1990. Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome*, 33(1985), 908–913. <https://doi.org/10.1139/g90-137>
- Sapre AB and Deshpande DS. 1987. Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridation. *Journal of heredity* 78. 3. 191-196. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110355>
- Semple JC. 1989. Geographical distribution of B chromosomes of *Xanthisma texanum* (Compositae: Astereae). II. Local variation within and between populations and frequency variation through time. *American Journal of Botany*, 76, No. 5 :769-776. DOI: 10.2307/2444424
- Serrano-Freitas É A, Silva DMZA.A. Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Oliveira C, Camacho JPM, Foresti F. 2020. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(1), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01615-2>

- Shaw MW. 1984. The population genetics of the B-chromosome polymorphism of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Biological Journal of the Linnean Society* 23:77–100.
- Silva DM, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JP, Porto-Foresti F, Foresti F. 2014. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS One*. Apr 15;9(4):e94896. doi: 10.1371/journal.pone.0094896
- Silva DMZ de A, Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Martín-Peciña M, Castro JP, Freire PP, Carvalho RF, Hashimoto DT, Suh A, Oliveira C, Porto-Foresti F, Artoni RF, Foresti F, Camacho JPM. 2021. Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish. *BMC Biology*, 19(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00991-9>
- Smit AFA, Hubley R and Green P. 2013-2015. *RepeatMasker Open-4.0*. <http://www.repeatmasker.org>
- Speta F. 1993. The autumn-flowering squills of the Mediterranean Region. *Proceedings of 5th Optima Meeting, Istanbul, Turkey*, 109–124.
- Speta F. 2000. Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Prospero* Salisb (Hyacinthaceae) auf der griechischen Insel Kreta. *Linzer Biologische Beitrage* 32: 1323–1326.
- Stelzer C P, Riss S and Stadler P. 2011. Genome size evolution at the speciation level: The cryptic species complex *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-90>
- Tenaillon M I, Hufford M B, Gaut B S and Ross-Ibarra J. 2011. Genome size and transposable element content as determined by high-throughput sequencing in maize and *Zea luxurians*. *Genome Biology and Evolution*, 3(1), 219–229. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr008>
- Tosta VC, Marthe JB, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM, Pompolo SG, Recco-Pimentel SM, Perfectti F, Campos LA, Camacho JP. 2014. Possible introgression of B chromosomes between bee species (genus *Partamona*). *Cytogenetic and Genome Research*, 144(3), 220–226. <https://doi.org/10.1159/000370171>
- Utsunomia R, Mazzoni D, de Silva ZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Hashimoto DT, Oliveira, Trifonov VA, Porto-Foresti F, Camacho JPM, Foresti F. 2016. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLOS ONE*. 11(3): e0150573. doi: 10.1371/journal.pone.0150573

- Valente GT, Conte MA, Fantinatt BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD and Martins C. 2014. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 31(8):2061–2072 doi: 10.1093/molbev/msu148
- Valente GT, Nakajima RT, Fantinatti BEA., Marques DF, Almeida RO, Simões RP, Martins C. 2017. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma.* 126(1):73-81. doi: 10.1007/s00412-016-0613-6.
- Vanzela ALL, de Paula AA, Quintas CC, Fernandes T, Baldissera J, de Souza TB. 2017. *Cestrum strigilatum* (Ruiz & Pavon, 1799) B chromosome shares repetitive DNA sequences with A chromosomes of different *Cestrum* (Linnaeus, 1753) species. *Comp. Cytogenet.* 2017, 11, 511–524.
- Wendel JF, Jackson SA, Meyers BC, Wing RA. 2016. Evolution of plant genome architecture. *Genome Biol.*17:37. doi: 10.1186/s13059-016-0908-1. PMID: 26926526; PMCID: PMC4772531.
- Werren JH and Beukeboom LW. 1993. Populations genetics of a parasitic chromosome theoretical analysis of PSR in subdivided populations. *The American Naturalist*, 142. No. 2. 228-241.
- Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen T L, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D. 2020. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics description A system for 'declaratively' creating graphics, based on ``The Grammar of Graphics''. URL <https://ggplot2.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/ggplot2> BugReports <https://github.com/tidyverse/ggplot2/issues>
- Wilson EB. 1907. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science.* Vol XXVI, no. 677
- Zedek F, Smerda J, Smarda P, Bureš P. 2010. Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. *BMC Plant Biol.*10:265. doi: 10.1186/1471-2229-10-265. PMID: 21118487; PMCID: PMC3095338.

## Material Suplementario

Tablas S y dirección web donde se encuentran alojadas.

<https://bio165.ugr.es/descargas/descargar/389/>

Tabla S3.1.

Tabla S3.2.

Tabla S3.3.

## Capítulo 4

# El cromosoma B de *Prospero autumnale* está enriquecido en genes del ciclo celular que se transcriben con preferencia a los que tienen otras funciones

### Resumen

La secuenciación masiva (NGS) ha revelado que los cromosomas B contienen genes codificadores de proteínas, abriendo la posibilidad de que el destino de estos parásitos genómicos dependa de la expresión de algunos de estos genes. La eficacia biológica de un cromosoma B depende, al menos en parte, de su modo de transmisión durante las divisiones celulares. Es esperable que los genes más útiles a un cromosoma B sean aquellos que puedan interferir en el control de las divisiones celulares, facilitando el impulso de transmisión del B. Resultados empíricos avalan la hipótesis anterior. En este trabajo analizamos el contenido génico de los cromosomas B de la planta *Prospero autumnale* mediante la secuenciación Illumina de seis librerías genómicas, incluyendo dos individuos OB y dos con B del citotipo AA, un individuo del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, otro del citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y de dos librerías de RNA extraído de hojas de un individuo OB y otro 2B del citotipo AA. Los resultados revelaron la presencia de 45 genes en el cromosoma B, 10 de los cuales codificaban para proteínas con funciones relacionadas con el ciclo celular, tales como el movimiento cromosómico mediante microtúbulos, la recombinación meiótica y la segregación cromosómica, que pueden ser cruciales para que el B presente impulso durante las divisiones celulares. Los 35 genes restantes, sin embargo, codificaban para proteínas implicadas en una variedad amplia de funciones, con poca relación entre sí, y que, en conjunto, podrían simplemente reflejar el contenido génico del cromosoma A que dio origen al B. Además, la mayoría de estos genes (27) mostraron la CDS truncada, indicando son pseudogénicos. Esto ocurrió también para 4 de los 10 genes del ciclo celular. Los genes del B solían mostrar muchas copias en el B, sobre todo algunos de los truncados, y un número muy elevado de SNPs específicos del B, lo que permitió cuantificar la tasa de transcripción de los genes del B en el individuo AA-2B. Encontramos que, en el B, los genes del ciclo celular presentaron mayores tasas de transcripción que los genes para otras funciones, sugiriendo un sesgo en el perfil transcripcional del B hacia los genes que pueden serle útiles para una transmisión eficaz.

## Introducción

Los cromosomas B suelen ser considerados parásitos genómicos que se mantienen en las poblaciones gracias a mecanismos de acumulación (drive o impulso). Hasta ahora no estaba claro si los cromosomas B eran pasajeros inertes que aprovechaban pasivamente ciertos mecanismos citológicos para acumularse o, por el contrario, eran activos partícipes de su acumulación y efectos sobre la eficacia biológica que, en este caso, dependerían de su contenido génico. Sin embargo, no se ha podido empezar a dar respuesta a esta disyuntiva hasta que hemos tenido acceso a la secuenciación de estos cromosomas, aunque ciertas pistas apuntaban a la presencia de genes codificadores activos. Los primeros genes detectados en los cromosomas B codificaban para RNA ribosómico (RNA), ya que se observaron nucleolos asociados a los cromosomas B del saltamontes *Dichroplus pratensis* durante la meiosis (Bidau 1986). Posteriormente se demostró, mediante hibridación in situ fluorescente (FISH), que esos cromosomas B contienen rDNA (Bidau et al. 2004). La primera demostración de la presencia de rDNA 45S, mediante FISH, en cromosomas B de plantas fue en *Crepis capillaris* (Maluszynska and Schweizer 1989), y ese hallazgo fue refrendado después en numerosas especies (para una revisión sobre la presencia de rDNA en cromosomas B de otras especies, ver Camacho (2005)). Lo más interesante, no obstante, fue la constatación de Ruiz-Estévez et al. (2012) de la funcionalidad del rDNA de los cromosomas B de *E. plorans*, ya que demostraron que las copias localizadas en el cromosoma B se transcriben y son capaces de producir un nucleolo asociado al cromosoma B.

Otros tipos de secuencias codificadoras encontradas en los cromosomas B son, por ejemplo, genes funcionales para resistencia a antibióticos en el hongo *Nectria haematococca* (Miao et al. 1991), el rDNA 5S en *Plantago lagopus* (Dhar et al. 2019, Kumke et al. 2016), el proto-oncogen C-KIT en tres especies de cánidos (Graphodatsky et al. 2005) o los genes para las histonas H3 y H4 del cromosoma B de *Locusta migratoria* (Teruel et al. 2010). Con la llegada de la secuenciación masiva, comenzaron a descubrirse múltiples genes en los Bs de varias especies de plantas y animales. El primer estudio se realizó en el centeno, cuyo cromosoma B se aisló mediante "flow sorting" y el DNA extraído se secuenció mediante 454, encontrándose miles de secuencias génicas, pseudogénicas y secuencias de DNA de orgánulos (Martis et al. 2012). Igualmente, en el pez *Astatotilapia latifasciata*, los cromosomas B contienen cientos de secuencias semejantes a genes, la mayoría fragmentados, aunque algunos genes estaban completos y al menos tres eran transcripcionalmente activos (Valente et al. 2014). Generalmente, las secuencias génicas de los Bs se pueden explicar como restos del contenido génico del cromosoma A que dio origen al B y también cómo el resultado de la transferencia génica horizontal posterior desde otros As (Banaei-Moghaddam et al. 2015). Recientemente, y gracias a la secuenciación del genoma completo de la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis*, se han encontrado 44 genes de proteínas en el cromosoma B de esta especie (denominado PSR por su efecto "paternal sex ratio")

(Benetta et al. 2020). Sin embargo, estos genes se parecen más a genes de otros organismos que a los de la propia especie, debido al origen interespecífico de este B (McAllister and Werren 1997). Uno de ellos (PSR-4317) tiene homología con un gen de bacterias y parece ser el responsable del impulso de este cromosoma B, tal como Benetta et al. (2020) demostraron mediante RNA de interferencia demostrando, por primera vez, que un gen de un cromosoma B es funcional y que la ventaja en la transmisión del B depende de uno de los genes que contiene.

En el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* se han encontrado 10 genes de proteínas, varios de los cuales codifican para proteínas relacionadas con el control del ciclo celular (Navarro-Dominguez et al. 2017a). En *Locusta migratoria* se han identificado 26 genes para proteínas en el cromosoma B, 15 de los cuales mostraron completa la región codificadora, y algunos se transcribían activamente. Especialmente interesante era el gen *apc1*, que induce transición rápida entre metafase-anafase, cuyos transcritos procedentes del B se identificaron por su variación específica en la secuencia, y se producían en mayor tasa en el ovario que los procedentes de los cromosomas A (Ruiz-Ruano et al. 2019), pudiendo así interferir en la división celular y ser responsable de uno o los dos tipos de impulso que muestra este B en machos y hembras (Pardo et al. 1994). En el lagarto *Anolis carolinensis*, Kichigin et al. (2019) encontraron dos genes relacionados con el control de la división celular y muchos pseudogenes. Igualmente, Makunin et al. (2018) encontraron, en varias especies de mamíferos, que los cromosomas B estaban enriquecidos en genes del ciclo celular y genes relacionados con el desarrollo, y propusieron que este tipo de genes pueden ser importantes para el establecimiento de los cromosomas B, siguiendo sugerencias anteriores de Valente et al. (2014) y Navarro-Dominguez et al. (2017a).

En este trabajo analizamos el contenido génico de los cromosomas B de *Prospero autumnale*, una planta liliácea cuyo origen se ha datado en un millón de años y en la que se ha descrito muy poca variación morfológica pero mucha variación cromosómica (Jang et al. 2013). Se han reportado cuatro citotipos diploides diferentes (AA, B<sup>5</sup>B<sup>5</sup>, B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>; Jang et al. 2013), siendo todos excepto el citotipo B<sup>5</sup>B<sup>5</sup> portadores de cromosomas B metacéntricos de tamaño muy parecido (Jang et al. 2016). Como resultado de los estudios de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas de DNA repetitivo y de hibridación genómica (GISH) que llevaron a cabo Jang et al. (2016) sobre los cromosomas B de diferentes citotipos, estos autores propusieron el origen recurrente de los cromosomas B de *P. autumnale*. En este trabajo hemos sometido a prueba esta hipótesis, en lo que respecta al cromosoma B del citotipo AA, que está restringido al sur de la Península Ibérica. Para ello, hemos realizado estudios genómicos y transcriptómicos en dos plantas con B y dos sin B del citotipo AA, y de dos plantas sin B pertenecientes a los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>. Los resultados no avalan el origen recurrente del B en distintos citotipos, ya que sugieren el origen único del B en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y su transferencia al citotipo AA mediante introgresión.

## **Material y Métodos**

### ***Material colectado para el estudio***

En otoño de 2014 recogimos 28 bulbos de *Prospero autumnale* (Asparagaceae) ( $2n=14$ , citotipo AA, tamaño de genoma =  $7.85 \pm 0.045$  pg) en floración, en la población Cuesta de La Palma (Granada, España, altitud = 761 m s.n.m. y coordenadas geográficas  $37^{\circ} 7' 7''$  N y  $4^{\circ} 17' 1''$  O). Además, en este estudio hemos utilizado 9 individuos de la misma población colectados por nosotros en 2017, así como un individuo del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> (procedente de Apulia, Italia) y otro del citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> (procedente de Creta, Grecia), que nos fueron enviados por la Dr<sup>a</sup> Hanna Weiss-Schneeweiss, de la Universidad de Viena.

### ***Determinación del número de cromosomas B en cada individuo***

Una vez en el laboratorio, colocamos las plantas en hidrocultivo para que desarrollaran raíces que posteriormente, y una vez cortadas, tratamos con colchicina al 0.1 % durante 4 horas a temperatura ambiente, con objeto de obtener metafases y poder averiguar el número de cromosomas B de cada una de ellas. Después del tratamiento con colchicina, fijamos las raíces en una mezcla de etanol:ácido acético (3:1) y las guardamos a 4 °C hasta su estudio al microscopio.

Para la tinción de los cromosomas, tratamos las raíces de cada bulbo con HCl 1N durante 1 minuto a 60 °C, y posteriormente las teñimos con orceína lactopropiónica durante 15 minutos a temperatura ambiente. Sobre un portaobjetos, cortamos las puntas de las raíces y colocamos una gota de orceína lactopropiónica sobre la misma para disgregarla. Luego colocamos un cubreobjetos y ejercimos presión para aplastar la preparación y eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, examinamos las preparaciones al microscopio óptico para determinar el número de cromosomas B en las células de cada individuo (Tabla S4.1).

### ***Extracción de ácidos nucleicos***

Del material recolectado seleccionamos cuatro individuos, dos de ellos 0B (AA-0B1 procedente de la muestra de 2014 y AA-0B2 procedente de la de 2017), uno 2B (AA-2B colectado en 2017) y otro 7B (AA-7B, de 2014, y que fue el individuo con mayor número de Bs que apareció en las muestras). De estas 4 plantas, y de las dos pertenecientes a los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> cortamos hojas que secamos en bolsas de celofán en un ambiente con silicagel para la posterior extracción de DNA. Para esta extracción, tomamos aproximadamente 100 mg de material foliar de cada individuo y lo trituramos en un mortero con nitrógeno líquido hasta convertirlas en un polvo fino. Posteriormente usamos el kit comercial de extracción de DNA "GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit" de Sigma-Aldrich (ahora Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción del DNA genómico (gDNA). Una vez aislado éste, lo cuantificamos mediante

un nanodrop (Tecan's Infinite 200 NanoQuant) y determinamos su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de 5 µl de cada muestra.

Por otra parte, a partir de hojas recién cortadas de los individuos AA-0B2 y AA-2B (100 mg de material fresco aproximadamente) realizamos una extracción de RNA usando el kit comercial "RNeasy Plant Mini Kit" de Quiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el RNA comprobamos la integridad de este haciendo correr 2 µl de cada muestra en gel de agarosa al 2 %. Además, cuantificamos la cantidad de RNA extraído en un nanodrop (Tecan's Infinite 200 NanoQuant).

### ***Secuenciación Illumina***

La secuenciación del gDNA fue realizada en dos fases. Primero, en 2014, generamos librerías genómicas para los individuos AA-0B1 y AA-7B que fueron secuenciadas por Macrogen Inc. (Corea del Sur) en un equipo Illumina HiSeq2000. Esta primera secuenciación generó lecturas pareadas de 2x101 nt, con los siguientes tamaños totales: 2 963 288 692 nt (2.96 Gb) para AA-0B1 y 3 088 344 266 nt (3.09 Gb) para AA-7B. Además, en 2017 generamos cuatro librerías genómicas más, dos del citotipo AA y una de los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> (librerías AA-0B2, AA-2B, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>) que fueron secuenciadas con la plataforma HiSeq X Ten por la empresa Admera Health (EEUU), con lecturas pareadas de 2x151 nt y de tamaño: AA-0B2= 27 146 712 238 nt (27.15 Gb), AA-2B= 15 446 397 946 nt (15.45 Gb), B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>= 10 366 112 430 nt (10.37 Gb) y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> = 15 269 922 805 nt (15.27 Gb).

Por otra parte, a partir de los RNAs extraídos generamos dos librerías de RNA que fueron secuenciadas mediante Illumina HiSeq4000 por la empresa BGI Tech Solutions (China), con lecturas pareadas de 2x150 nt de longitud, y con tamaños AA-0B2= 7 426 053 300 nt (7.43 Gb) y AA-2B= 7 098 914 100 nt (7.10 Gb).

### ***Ensamblaje de novo del transcriptoma, anotación, mapeo y selección de genes del B***

En esencia, el procedimiento bioinformático utilizado para buscar genes en los cromosomas B es similar al descrito en Ruiz-Ruano et al. (2019) y consiste en la búsqueda de secuencias codificadoras (CDSs) que muestran abundancia diferencial entre librerías con B y sin B. Como no hay disponibles genomas secuenciados de la especie, nuestro método consiste en mapear lecturas de gDNA sobre los contigs de un transcriptoma *de novo* construido *ex profeso* para la misma especie.

Para el ensamblaje del transcriptoma usamos las dos librerías mencionadas anteriormente, desarrollando scripts que depositamos en el repositorio público: <https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols> con instrucciones para su instalación y ejecución. Con este propósito ensamblamos las dos librerías de RNAseq con Trinity v2.5.0: <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/releases> (Haas et al 2013), con las opciones por defecto, incluyendo la normalización *in silico* con una cobertura máxima de 50x. Como únicamente estábamos interesados en conocer la presencia de genes

codificadores de proteínas en los Bs de *P. autumnale*, extrajimos los CDSs mayores de 100 aminoácidos usando el software Transdecoder (<https://github.com/TransDecoder>) y posteriormente redujimos la redundancia con CD-HIT-EST (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit>, Godzik 2006), con opciones de alta sensibilidad, y agrupando aquellas secuencias que mostraban el 80% o más de similitud en al menos el 80% de su longitud (opciones `-M 0 -aS 0.8 -c 0.8 -G 0 -g1`).

A continuación, anotamos las CDSs clusterizadas usando RepeatMasker: <https://www.repeatmasker.org/>, con la RepBase: <https://www.girinst.org/rebase/>, y el pipeline de Trinotate (<https://trinotate.github.io>), y luego con BLAST2GO: <https://www.blast2go.com/>, y la base de datos SWISS-PROT (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>; Boeckmann et al. 2003) para anotar contigs de genes codificadores de proteínas.

Para el mapeado de las lecturas genómicas y transcriptómicas, sobre el transcriptoma de referencia, hemos usado el software SSAHA2 (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/resources/software/ssaha2/>; Ning et al. 2001) porque permite el mapeo de lecturas que muestran alta variación con respecto a la referencia y acepta el mapeo parcial de lecturas. Esto es crucial para nuestro propósito, ya que las secuencias usadas como referencia carecen de intrones, que, si están presentes en las lecturas genómicas y puesto que, de no aceptarse el mapeo parcial, quedarían muchas lecturas sin mapear aun cuando tuvieran homología parcial con los extremos de los exones. En nuestro caso, aceptamos mapeos con al menos 40 nt con un 80 % de identidad mínima. Posteriormente marcamos el número de lecturas mapeadas por sitio a lo largo de la CDS usando la herramienta Pysamstats (<https://github.com/alimanfoo/pysamstats>) integrada en el script `bamm-coverage-join.py`. Además, el con el script `coverage-graphics.py` expresamos la cobertura de cada CDS, en cada librería, como el número de copias por genoma haploide usando el siguiente algoritmo:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de copias} = (\text{Cobertura} \times \text{Tamaño del genoma}) / \text{Tamaño de la librería}$$

Con el fin de eliminar contigs con cobertura demasiado baja, descartamos todos aquellos que tuvieran menos de 0.5 copias por genoma haploide en el promedio de los dos individuos con B.

Para seleccionar contigs candidatos a residir en los cromosomas B, hemos calculado primero el umbral que tendría que sobrepasar en abundancia un gen que estuviera presente en el B, suponiendo que en cada cromosoma B hubiera el mismo número de copias del gen que en cada cromosoma A. Por ejemplo, si un gen muestra una copia por cromosoma A (es decir, dos copias en un genoma diploide, como los que estamos analizando), los individuos con Bs deberían tener un incremento en cobertura, medido por el cociente  $+B/OB$  (gFC), de:

$[(\text{copias en As}) + (\text{copias en Bs})] / (\text{copias en As}) = (2+2) / 2 = 2$  en el individuo 2B, y  $(2+7) / 2 = 4.5$  en el 7B.

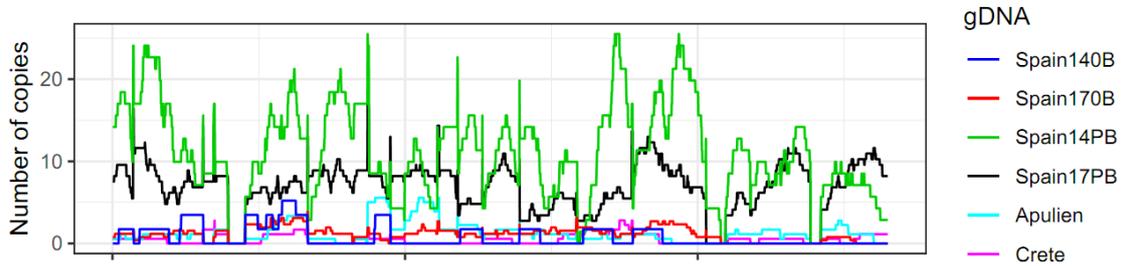
Cualquier contig que tuviese un valor de gFC mayor que estos umbrales, en los dos individuos, mostraría evidencia de estar presente en el cromosoma B.

Una vez obtenida la colección de contigs que sobrepasaban estos umbrales, realizamos su anotación con Trinotate (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>) y Blast2go (<https://www.blast2go.com/>) para quedarnos con la lista de contigs anotados. Aunque los no anotados podrían ser también interesantes, la carencia de esta información impide obtener su posible relación con las funciones biológicas que podrían ser de interés para el cromosoma B. Dado que algunos genes estaban representados por más de un contig, resumimos la información por genes y así obtuvimos la lista final de genes anotados del B.

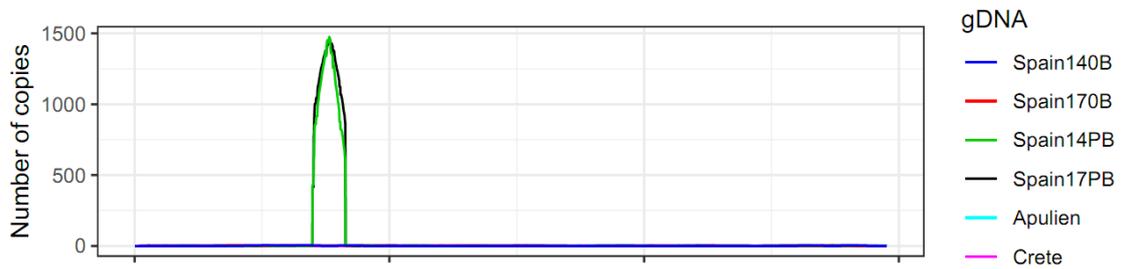
## Resultados

El mapeo de lecturas de las seis librerías de gDNA sobre las 34 722 CDSs del transcriptoma construido a partir de las librerías de RNA, reveló que 133 de ellos sobrepasaban el mínimo de 0.5 copias por genoma haploide en el promedio de los dos individuos 0B, y 87 superaban los umbrales de sobreabundancia mínima en cada uno de los dos individuos con B (2 y 4.5 para los individuos AA-2B y AA-7B, respectivamente). De ellos, 51 fueron anotados como genes de proteínas que correspondieron a 45 genes diferentes cuando los contigs del mismo gen fueron agrupados (Tabla 4.1 y Datos Suplementarios 1). El análisis gráfico de los patrones de mapeo indicó la existencia de dos tipos de genes en el B, 12 que mostraban mayor cobertura en +B a lo largo de toda CDS (genes no truncados) y 33 que mostraban caídas bruscas de cobertura dentro de la CDS (genes truncados) (ver ejemplos en la Figura 4.1). Interpretamos que los genes truncados representan copias pseudogénicas degeneradas en mayor o menor medida.

MER3\_ORYSJ\_TRINITY\_DN71184\_c0\_g1::TRINITY\_DN71184\_c0\_g1\_i3::g.155:



TMK3\_ARATH\_TRINITY\_DN70353\_c0\_g1::TRINITY\_DN70353\_c0\_g1\_i1::g.83



**Figura 4.1.** Los perfiles de cobertura de los genes de proteínas que mostraron sobreabundancia en individuos con B revelaron la existencia de genes cuya mayor cobertura en +B abarcaba la CDS completa (genes no truncados, gráfico de arriba para el gen MER3), y de otros genes que mostraban caídas bruscas de cobertura a un lado o los dos de la CDS (genes truncados, gráfico de abajo para el gen TMK3). La curva de cobertura del individuo 7B es mostrada en verde y la del 2B en negro. Spain140B= AA-0B1, Spain170B= AA-0B2, Spain14PB= AA-7B, Spain17PB= AA-2B, Apulien= B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>-0B, Crete= B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>-0B.

**Tabla 4.1.** Número de copias por genoma haploide para los 45 genes que mostraron sobreabundancia en los individuos de seis librerías analizadas. av\_AA-OB= promedio de los dos individuos OB del citotipo AA; gFC= cociente entre un individuo de AA y av\_AA-OB; CDS\_tr indica si la CDS estaba truncada sugiriendo la presencia de genes incompletos en el B; CC= ciclo celular. Consideró sobreabundante en +B (y, por tanto, que está en el B) si los gFC de 2B y 7B superaron los umbrales >2 y >7 respectivamente. Note que 33 de los genes del B (el 73 %) tenían la CDS truncada, aparentando ser copias pseudogenizadas (el 22 %) tienen funciones relacionadas con el ciclo celular.

Gen	AA-OB1	AA-OB2	AA-2B	AA-7B	B7B7	B6B6	av_AA-OB	gFC_2B	gFC_7B
ADK2_ARATH	1.057	0.260	1.730	3.727	1.712	0.356	0.658	2.63	5.66
ATG81_ARATH	1.269	2.226	12.262	12.193	3.022	4.780	1.748	7.02	6.98
CHR35_ARATH	1.087	0.806	2.751	4.848	0.081	0.406	0.947	2.91	5.12
CK2_ARATH	0.733	1.213	4.406	6.353	0.341	1.551	0.973	4.53	6.53
COG6_BOVIN	0.475	1.387	5.089	6.468	1.500	1.181	0.931	5.46	6.94
CSLE6_ORYSJ	0.429	1.843	7.165	6.496	0.283	0.255	1.136	6.31	5.72
CSLH3_ORYSJ	0.000	5.008	39.219	53.836	8.396	3.133	2.504	15.66	21.50
CYSKL_SCHPO	2.122	2.043	12.748	18.299	1.272	1.595	2.083	6.12	8.79
DIV_ANTMA	0.568	1.707	133.950	61.177	1.135	0.546	1.137	117.76	53.78
DTX51_ARATH	0.571	2.988	144.501	115.923	7.327	2.824	1.779	81.22	65.15
ECA1_ARATH	1.055	5.693	22.864	19.825	5.324	1.985	3.374	6.78	5.88
FB324_ARATH	0.942	0.462	22.626	19.209	3.636	3.186	0.702	32.23	27.36
FDL1_ARATH	4.615	5.474	355.730	366.551	14.600	5.334	5.044	62.034	64.11
FDL13_ARATH	2.408	4.486	73.568	50.083	12.935	4.796	3.447	21.34	14.53
JAL32_ARATH	0.263	3.901	446.159	381.132	3.143	1.844	2.082	214.29	183.00
KN14E_ORYSJ	1.144	2.430	32.880	57.654	1.439	1.259	1.787	18.40	32.26
KN14M_ORYSJ	0.957	0.932	5.617	9.365	0.527	0.680	0.944	5.95	9.92
KN14R_ARATH	0.551	0.557	3.326	3.320	0.082	0.412	0.554	6.00	5.99
LOXA_SOLLC	0.669	3.528	22.950	22.001	6.796	6.476	2.099	10.93	10.48
LRK59_ARATH	1.560	4.996	248.028	217.468	6.850	5.416	3.278	91.259	75.89
MAD1_ARATH	0.527	1.242	5.569	4.021	0.278	0.372	0.885	6.30	4.54
MCM7_ORYSI	2.341	2.981	12.236	17.489	1.723	1.211	2.661	4.60	6.57
MER3_ORYSJ	0.811	1.160	7.261	11.651	1.362	0.532	0.985	7.37	11.82

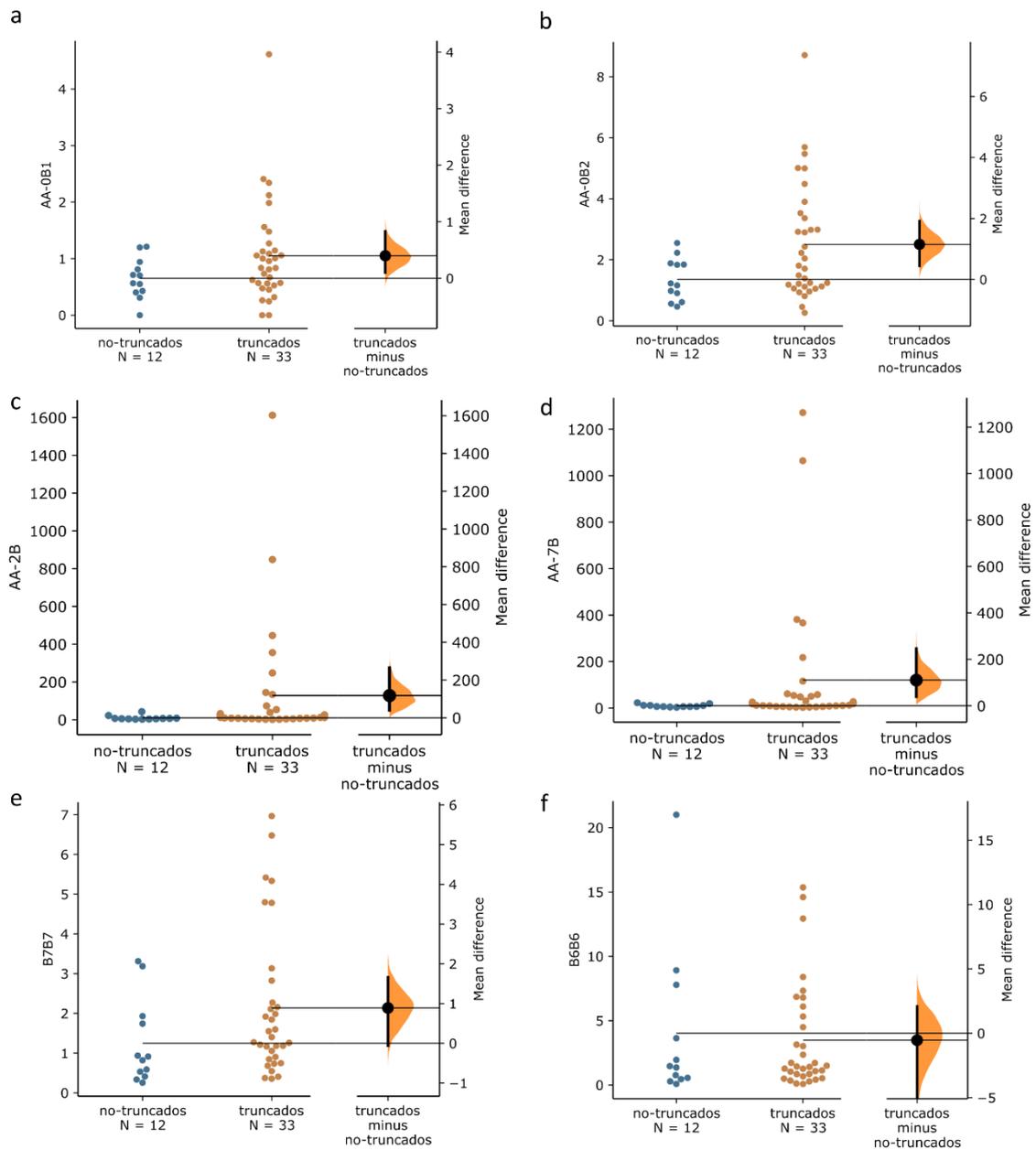
MIS12_ARATH	1.008	0.454	8.861	9.297	0.845	0.845	0.731	14.161	14.04
MSH4_ARATH	0.403	1.226	3.149	4.383	1.467	0.936	0.815	3.86	5.38
MSH5_ORYSJ	0.702	0.610	5.020	6.035	0.452	0.913	0.656	7.65	9.20
NAC74_ORYSJ	0.712	0.904	8.293	10.665	1.953	0.335	0.808	10.249	14.43
NAM2_HORVV	1.128	1.050	25.916	26.138	0.859	0.746	1.089	24.157	24.32
NUP88_ARATH	0.244	3.364	25.141	30.516	0.674	1.272	1.804	13.94	16.92
OHK4_ORYSJ	0.309	1.882	5.698	5.933	7.785	1.741	1.095	5.20	5.42
OHK6_ORYSJ	0.565	1.835	4.152	6.511	21.001	3.312	1.200	3.46	5.43
PIX13_ARATH	1.002	0.958	4.134	4.808	1.039	2.157	0.980	4.22	4.91
QWRF7_ARATH	1.478	2.917	848.549	1064.626	6.097	1.402	2.197	386.17	484.5
RS6_ASPOF	1.199	2.550	6.869	11.320	0.557	1.929	1.874	3.66	6.04
SF3_HELAN	1.985	8.709	26.456	27.589	15.359	6.964	5.347	4.95	5.16
SPT2_DROME	0.835	1.057	8.321	11.564	0.415	0.733	0.946	8.80	12.23
STR4A_ARATH	0.622	1.182	7.899	8.092	0.494	1.917	0.902	8.75	8.97
SYVM2_ARATH	0.836	1.242	9.519	9.959	0.115	1.056	1.039	9.16	9.59
TMK3_ARATH	0.451	1.125	53.900	48.064	1.406	1.167	0.788	68.41	61.00
TNPO1_ORYSJ	1.212	0.979	4.790	5.925	8.915	0.587	1.096	4.37	5.41
TYDC2_PAPSO	0.562	2.897	1612.342	1271.720	4.496	2.109	1.729	932.45	735.4
UBP22_ARATH	0.000	1.116	2.518	2.555	1.081	1.184	0.558	4.51	4.58
WDS_ARATH	0.318	1.486	8.190	10.494	1.264	0.903	0.902	9.062	11.62
Y4312_ARATH	0.000	2.229	43.002	22.725	0.763	0.819	1.115	38.58	20.39
ZFP7_ARATH	0.810	1.807	7.058	6.119	2.354	2.271	1.309	5.39	4.67
Promedio	0.945	2.198	96.720	90.536	3.626	1.898	1.572		

Como se observa en la Tabla 4.2, los números de copias por genoma haploide para estos 45 genes en las seis librerías analizadas son entre 1 y 2 en las que carecen de cromosomas B, pero muy superiores en las que poseen cromosomas B, concretamente dos órdenes de magnitud para la media y uno para la mediana. Esta discrepancia entre media y mediana se debe a que las distribuciones del número de copias están muy sesgadas debido a la existencia de una mayoría de genes que mostraban bajos números de copias y unos pocos que mostraban números muy altos.

**Tabla 4.2.** Estadística descriptiva del número de copias estimadas en las seis librerías analizadas para los 45 genes sobrerrepresentados en las librerías procedentes de individuos con cromosomas B. Note que las librerías con B muestran números de copias muy superiores a las sin B, con coeficientes de variación (CV) que triplican a los de AA-0B y B6B6 y que son algo más del doble que los de B7B7. Id= individuo, SD= desviación estándar, SE= error estándar, Q1= primer cuartil, Q3= tercer cuartil.

Id	Mean	SD	SE	CV	Median	Q1	Q3	Sesgo	Curtosis
AA-0B1	0.9	0.8	0.1	84%	0.8	0.5	1.1	2.5	9.6
AA-0B2	2.2	1.7	0.3	78%	1.7	1.1	2.9	1.7	3.6
AA-2B	96.7	275.6	41.1	285%	8.9	5.6	32.9	4.5	22.1
AA-7B	90.5	249.7	37.2	276%	11.6	6.4	30.5	4.0	16.0
B7B7	3.6	4.7	0.7	130%	1.4	0.7	5.3	2.0	4.0
B6B6	1.9	1.7	0.3	89%	1.3	0.7	2.2	1.6	1.8

Una comparación del número de copias entre genes truncados y no-truncados en las 6 librerías indicó que los genes truncados en el B muestran mayor número de copias que los no-truncados (Figura 4.2a-d), llegando estos últimos hasta 3 copias (por genoma haploide) en los individuos 0B en el citotipo AA y hasta 43 copias del gen Y4312 en los +B. Por otra parte, los truncados llegaban hasta 9 copias en AA-0B y hasta 1612 para TYDC2 en +B. Sin embargo, en los otros dos citotipos (B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>) no encontramos diferencias en el número de copias entre genes truncados y no-truncados (Figura 4.2e-f).



**Figura 4.2.** Comparación mediante gráficos Gardner-Altman del número de copias estimadas para los genes truncados y no-truncados del B en las 6 librerías analizadas. a) AA-OB1, b) AA-OB2, c) AA-2B, d) AA-7B, e) B7B7, f) B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>. Note que sólo en las librerías del citotipo AA (a-d) se observan diferencias entre genes truncados y no truncados, pero las diferencias son muy superiores en los individuos con B (cerca de 200 copias más en genes truncados) (c y d) que en los individuos OB, con sólo 1 ó 2 copias más en los genes truncados que en los no truncados (a y b).

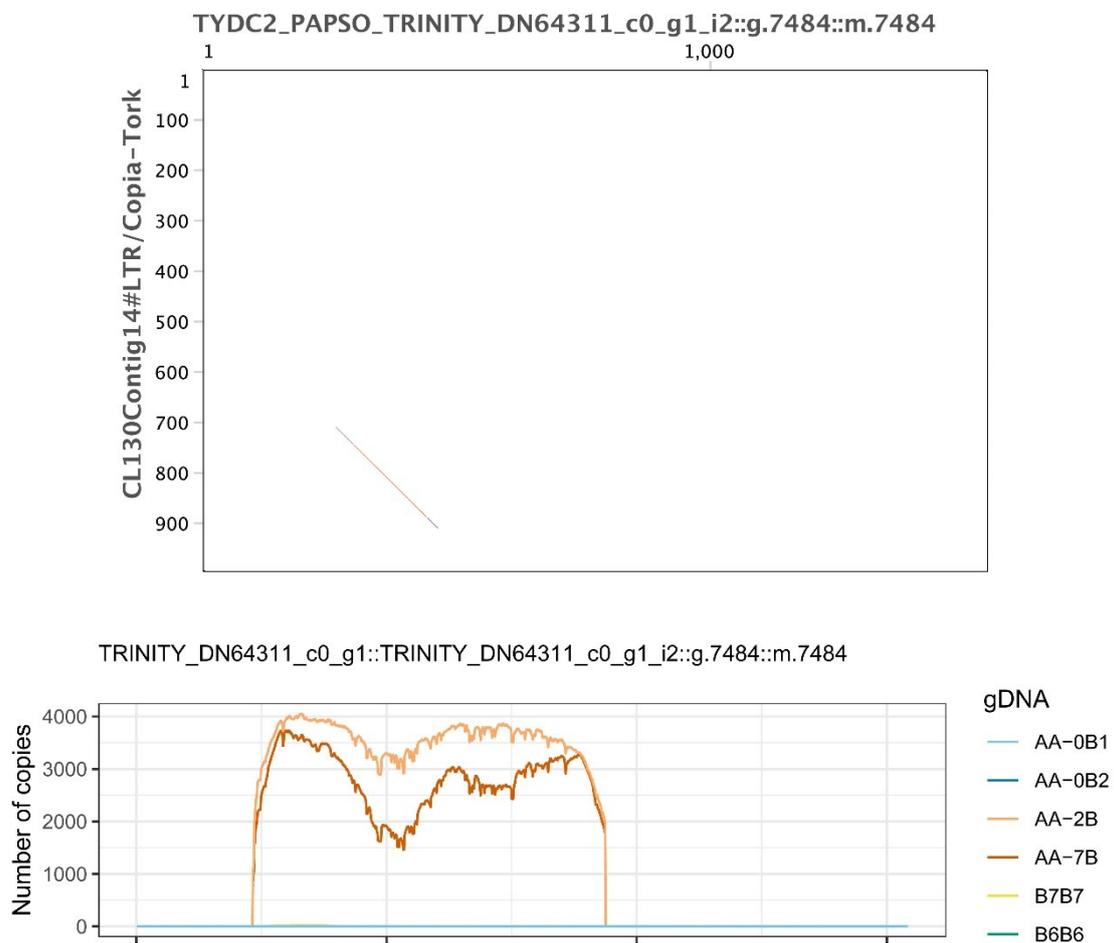
Cuando comparamos los genes truncados y no truncados, por separado, entre las seis librerías mediante tests de Gardner-Altman para muestras pareadas (Tabla 4.3) observamos que ambos tipos de genes mostraron mayor número de copias en AA-OB2 que en AA-OB1. Esta diferencia no se debe a la mayor cobertura en AA-OB2 porque el número de copias está normalizado con respecto al tamaño de librería. Otros factores que podrían contribuir a explicar esta diferencia podrían ser, por ejemplo:

- que la capacidad de detección fuese mayor en la librería con mayor cobertura,
- que hubiese diferencias sustanciales en el tamaño real del genoma en los individuos (por ejemplo, por un polimorfismo para algún repetitivo), puesto que normalizamos por un mismo tamaño genómico. Si el tamaño genómico de OB1 fuera en realidad 6.5 Gb, por ejemplo, estaríamos dividiendo por un número mayor de lo que le corresponde (el tamaño estimado de  $\sim 7$  Gb), el cociente sería más pequeño de lo que es en realidad, pues el tamaño genómico está en el denominador al normalizar)
- que hubiera sesgos durante la construcción de librerías y la secuenciación, ya que se han secuenciado en empresas distintas y mediante versiones de los kits de Illumina distintos.

Por el contrario, estas diferencias no se observaron entre los dos individuos con B, ya que no mostraron diferencias en el número de copias a pesar de que se esperarían 3.5 veces más copias en el individuo 7B que en el 2B. Creemos que la diferencia en el número de Bs quedó compensada por el mismo efecto responsable de las diferencias entre los OB ya que, en ambos casos, el mayor número de copias se observó en las secuenciaciones realizadas en 2017. Aun así, lo más destacable fue observar que, en el citotipo AA, el número de copias era muy diferente entre los individuos con B y sin B, y este hecho era mucho más notable en los genes truncados, para los que las diferencias eran un orden de magnitud mayores que para los genes no truncados (Tabla 4.3), sugiriendo que el número de genes no-truncados en el B muestra cierta estabilidad mientras que los truncados se encuentran amplificados y, en varios casos, alcanzan grados extremos llegando a más de mil copias (ver Tabla 4.1). Con respecto a los citotipos  $B^7B^7$  y  $B^6B^6$ , es de resaltar que  $B^7B^7$  mostraba mayor número de copias de genes no truncados (en promedio cerca de tres más) que AA-OB, y que los dos citotipos mostraban menos copias de genes truncados que los individuos +B del citotipo AA, con diferencias del mismo orden que las observadas entre +B y OB en el citotipo AA (Tabla 4.3).



Un hecho interesante fue observar que 9 de los 33 genes truncados mostraron homología parcial con elementos LTR/Copia/Tork y LTR/Copia/SIRE, que son los TEs más sobreabundantes en los genomas con B (ver capítulo 3). Estos 9 genes estaban entre los 10 genes truncados que mostraban mayor número de copias en 2B (entre 39 y 1612 copias) (Figura 4.3 y Tabla 4.1). Esto sugiere la posibilidad de que muchos de los genes del B han sido fragmentados por la inserción de TEs. También podría ocurrir que los propios TEs hubieran ayudado a la amplificación del número de copias de los genes truncados en el B si estos retrotransposones mostraran tendencia a retrotransponerse intracromosómicamente, tal como se ha descrito en *Eyrepocnemis plorans* para RTE (Montiel et al. 2015).



**Figura 4.3.** Dotplot comparando la secuencia de la CDS del gen TYDC2 con la del retrotransposón LTR/Copia/Tork (arriba) y perfil de mapeo del gen mostrando su truncación a ambos lados de la CDS (abajo). Observe la presencia de miles de copias de este trozo del gen en los genomas de los dos individuos con B.

### ***Funciones putativas de los 45 genes del B***

El análisis de las funciones biológicas en UniProt (<https://www.uniprot.org>) indicó que 10 de los genes estaban relacionados con el ciclo celular y los otros 35 con funciones diversas (Tabla 4.4). Las funciones que putativamente podrían verse afectadas por la expresión de los 10 genes del B implicados en el ciclo celular son: el ensamblaje del huso mitótico, la unión de los microtúbulos del huso mitótico al cinetocoro, el movimiento de los cromosomas basado en microtúbulos, la segregación mitótica de las cromátidas hermanas, y la recombinación y segregación meióticas de los cromosomas homólogos.

Los 4 genes no truncados (KN14R, MER3, MSH4 y MSH5) (ver Tablas 4.1 y 4.4) tienen implicación en el movimiento cromosómico basado en microtúbulos, en la recombinación meiótica y en la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis. Los 35 genes restantes muestran una mezcla heterogénea de posibles funciones que no parecen tener mucho sentido conjunto (Tabla 4.4), aunque no se puede descartar que alguno de estos genes pudiera interferir con algunos procesos metabólicos y desencadenar algunos efectos derivados de la presencia de los cromosomas B, tales como la expresión del gen de esterases reportada por Ruiz-Rejón et al. 1980 y Oliver et al. 1982). Considerando los 35 genes, las posibles funciones que podrían verse afectadas son: autofagia, transporte de proteínas (4 genes), biogénesis de la pared celular (2), desarrollo del embrión que termina en la latencia de la semilla (2), desarrollo del polen (2), determinación de asimetría dorsoventral y desarrollo de flores, desubiquitinación de proteínas, regulación de la transcripción (3), regulación del silenciamiento de genes, respuesta defensiva e inmune (3), traducción, transporte transmembrana de iones calcio, señalización activada por citoquinina y fosforilación de proteínas (2). Y en caso de que los truncados pudiesen actuar como fuente de RNA de interferencia, muchas de estas funciones podrían verse afectadas explicando así los efectos fenotípicos derivados de la presencia de este cromosoma B. No obstante, pensamos que el contenido génico del B probablemente refleja el contenido del cromosoma, o cromosomas, del genoma estándar a partir de los que se originó, sin que necesariamente tengan, en conjunto, un significado funcional. Sin duda, éste vendrá dado, en última instancia por la transcripción de los genes del B en cada tejido.

Tabla 4.4: Función de los 45 genes que mostraron sobreabundancia en los individuos con B. Se indica con un color rojo los genes que están implicados en el ciclo celular

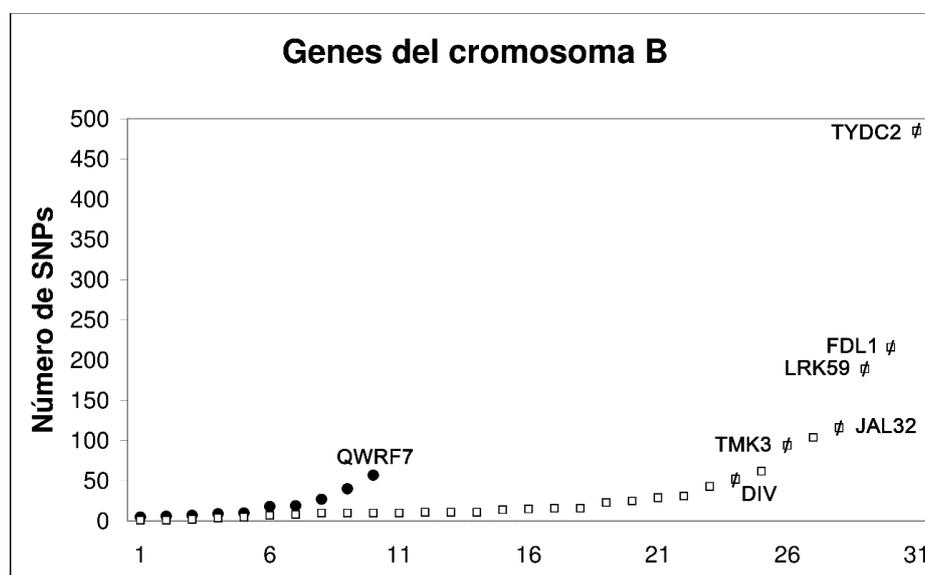
Gen	Función
ADK2_ARATH	Rescate de adenosina y AMP; proceso viral
ATG8I_ARATH	Autofagia; respuesta celular a la falta de nitrógeno; transporte de proteínas
CHR35_ARATH	Regulación del silenciamiento de genes
CK2_ARATH	Probable choline kinase 2
COG6_BOVIN	Glicosilación; transporte de proteínas
CSLE6_ORYSJ	Biogénesis de la pared celular
CSLH3_ORYSJ	Biogénesis de la pared celular
CYSKL_SCHPO	Proceso biosintético de cisteína a partir de serina
DIV_ANTMA	Determinación de asimetría dorsoventral; desarrollo de flores
DTX51_ARATH	Regulación negativa de la respuesta de defensa; morfogénesis de la raíz
ECA1_ARATH	Transporte transmembrana de iones calcio
FB324_ARATH	Proteína F-box At3g22700
FDL1_ARATH	Proteína F-box/FBD/LRR-repeat At1g13570
FDL13_ARATH	Proteína F-box/FBD/LRR-repeat At1g80470
JAL32_ARATH	Desarrollo del embrión que termina en la latencia de la semilla
KN14E_ORYSJ	Movimiento basado en microtúbulos
KN14M_ORYSJ	Movimiento basado en microtúbulos
KN14R_ARATH	Movimiento basado en microtúbulos
LOXA_SOLLC	Proceso biosintético de ácidos grasos; oxidación de lípidos
LRK59_ARATH	Respuesta defensiva ante bacterias y oomicetos
MAD1_ARATH	Unión de los microtúbulos del huso mitótico al cinetocoro
MCM7_ORYSI	Ciclo celular; iniciación de la replicación del DNA; desarrollo de polen
MER3_ORYSJ	Recombinación meiótica recíproca
MIS12_ARATH	Segregación mitótica de cromátidas hermanas
MSH4_ARATH	Segregación de cromosomas homólogos
MSH5_ORYSJ	Segregación de cromosomas homólogos y recombinación meiótica recíproca

NAC74_ORYSJ	Regulación de la transcripción
NAM2_HORVV	Regulación de la transcripción
NUP88_ARATH	Respuesta inmune innata; exportación de mRNA del núcleo; exportación/importación
OHK4_ORYSJ	Vía de señalización activada por citoquinina; fosforilación de prote
OHK6_ORYSJ	Vía de señalización activada por citoquinina; fosforilación de prote
PIX13_ARATH	Respuesta defensiva
QWRF7_ARATH	Ensamblaje del huso mitótico
RS6_ASPOF	Traducción
SF3_HELAN	Proteína SF3 específica del polen
SPT2_DROME	Regulación del ensamblaje de cromatina; regulación de la transcrip
STR4A_ARATH	Proteína con dominio Rhodanese
SYVM2_ARATH	Desarrollo del embrión que termina en la latencia de la semilla
TMK3_ARATH	Desarrollo del polen
TNPO1_ORYSJ	Importación de proteínas al núcleo
TYDC2_PAPSO	Proceso metabólico de aminoácidos celulares
UBP22_ARATH	Deubiquitinación de proteínas
WDS_ARATH	Proteína WDS con repeticiones WD
Y4312_ARATH	Probable receptor LRR serina-treonina protein kinasa
ZFP7_ARATH	Proceso metabólico de glucosinolatos

---

### **Variación nucleotídica en los genes del B que es específica de los individuos con B**

El análisis de SNPs en los 45 genes, detectó un total de 1 837 posiciones nucleotídicas variables en 42 de los 45 genes. Esta variación se caracterizaba porque, además de la variante nucleotídica típica de los individuos sin B, que denominamos Ref (de referencia), los dos individuos con B mostraban un nucleótido diferente en varias o muchas posiciones de cada gen (entre 6 y 542 sitios de la CDS). Los 1 837 SNPs cumplían la condición de mostrar cero conteos en el gDNA de los 4 individuos 0B (AA-0B1, AA-0B2, B6B6 y B7B7) así como en el RNA del individuo AA-0B2 (Tabla 4.5). El número de SNPs era, sin embargo, muy variable entre genes, y estaba correlacionado positivamente con el número de copias de esos genes estimado en los individuos con B (correlación de Spearman:  $r_s = 0.658$ ,  $t = 5.53$ ,  $P < 0.001$ ). Como muestra la Figura 4.4, uno sólo de los 10 genes con funciones relacionadas con el ciclo celular superaba los 50 SNPs por gen, mientras que 8 de los genes con otras funciones superaban ese valor, y 6 de ellos tenían la CDS truncada, sugiriendo que su secuencia está muy degenerada.



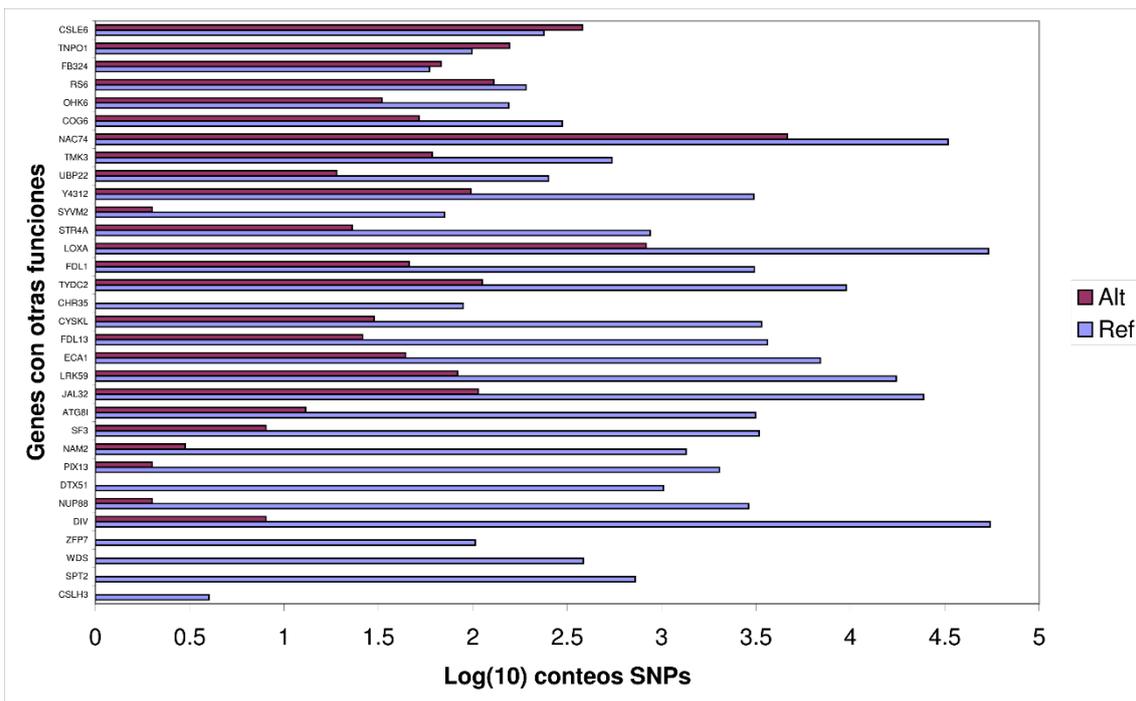
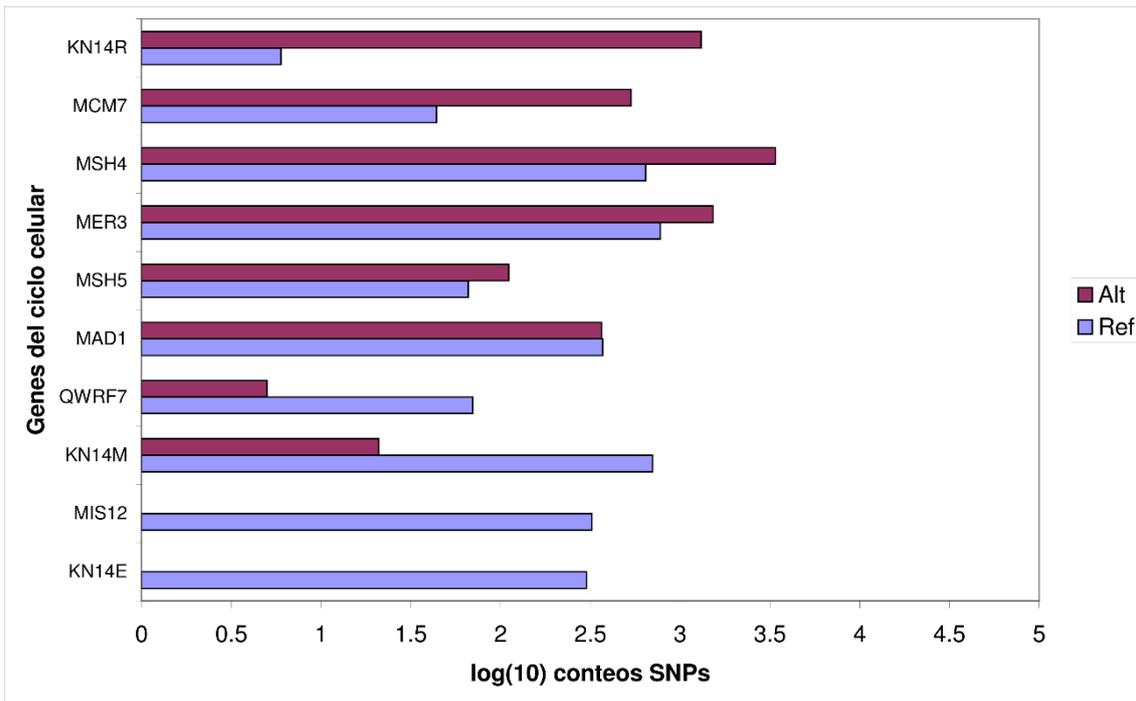
**Figura 4.4.** Distribución del número de SNPs específicos de los dos individuos con B, que estaban ausentes en los 4 individuos 0B analizados, en los genes del B con funciones relacionadas con el ciclo celular (círculos negros) y en los genes con otras funciones (cuadrados blancos). Se indican los nombres de los genes que mostraban más de 50 SNPs y tenían la CDS truncada.

### ***Transcripción de los genes del cromosoma B***

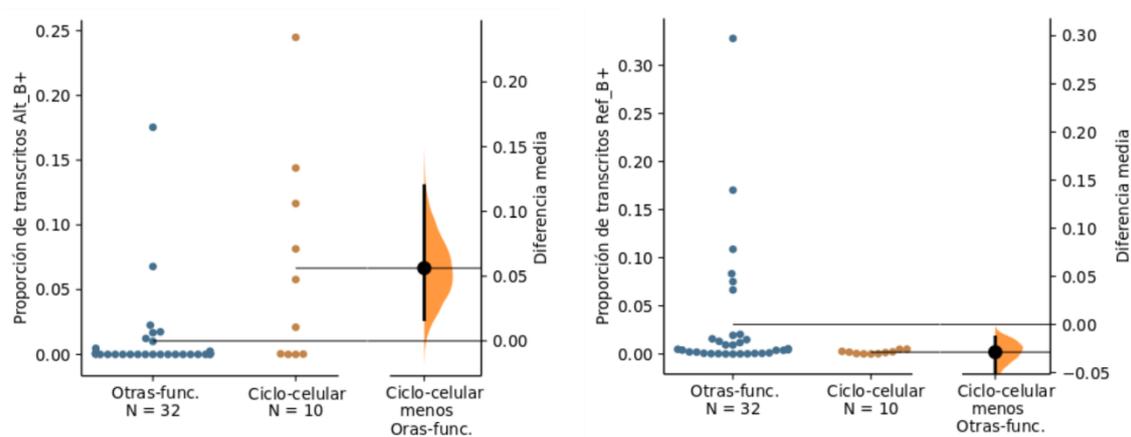
Teniendo en cuenta la variación nucleotídica en los genes del cromosoma B hemos podido inferir el nivel de transcripción de los genes del B, mediante el mapeo las lecturas de la librería AA-2B-RNA sobre la secuencia de las CDSs de los 42 genes que mostraron SNPs específicos. Así, la proporción de mapeos de la variante Alt con respecto a todos los mapeos Alt+Ref de cada sitio nucleotídico, en el individuo con 2B, proporciona una estima del grado en que se transcriben los genes del B. Como muestra la Tabla 4.5, 18 genes del B no mostraron transcritos, 11 mostraron una proporción de transcritos inferior a la mediana de los 24 genes que se expresaban en algún grado (Baja transcripción) y los 13 restantes mostraron proporciones de transcritos superiores a la mediana (Alta transcripción).

Seis de los 10 genes del B con funciones putativas relacionadas con el ciclo celular y 7 de los 32 genes con otras funciones mostraron Alta transcripción (contingencia RxC:  $P= 0.0476$ ,  $SE= 0.002$ ). La Figura 4.5 muestra las frecuencias de transcritos Alt y Ref en el individuo 2B. Se observa que la mitad de los genes del ciclo muestran más transcritos Alt que Ref, mientras que esto ocurre sólo en el 10% de los genes con otras funciones.

Una comparación de la proporción que representan los transcritos específicos del B (es decir, para la variante Alt) entre todos los transcritos observados en el individuo 2B, entre los genes del ciclo celular y el resto de los genes mediante un test de Gardner-Altman (Figura 4.6a, izquierda), reveló que los cromosomas B transcriben con mayor intensidad los genes que tienen funciones relacionadas con el ciclo celular que los que tienen otras funciones. En paralelo, los transcritos Ref, putativamente derivadas de transcripción en los cromosomas A, muestran menores proporciones para los genes del ciclo celular (Figura 4.6b derecha). En conjunto, estos datos indican que la actividad de algunos genes de los cromosomas A es suplantada, en parte, por la expresión de sus copias parálogas situadas en los cromosomas B.



**Figura 4.5.** Frecuencia de transcritos Alt en el individuo AA-2B para los 10 genes del B cuya función está relacionada con el ciclo celular (figura de arriba) y para los 32 genes con otras funciones (figura de abajo). Note que 5 genes del ciclo celular (el 50 %) muestran mayor frecuencia de transcritos Alt que Ref, mientras que sólo 3 genes (el 10 %) de los implicados en otras funciones mostraban esta característica.



**Figura 4.6.** Comparación de la proporción de transcritos de tipo Alt (gráfico de la izquierda) y Ref (gráfico de la derecha), en el individuo AA-2B, entre los genes del ciclo celular y los genes relacionados con otras funciones, mediante un test de Gardner-Altman.

## Discusión

### *El cromosoma B de P. autumnale está enriquecido en genes del ciclo celular*

La aplicación de la secuenciación NGS combinada con adecuadas herramientas bioinformáticas al estudio de la composición genómica de los cromosomas B está demostrando la presencia de genes codificadores de proteínas que se transcriben (Martis et al. 2012, Valente et al. 2014, Navarro-Dominguez et al. 2017a, Kinsella et al. 2019). Muchos de estos genes están truncados y son copias pseudogénicas defectivas, aunque algunas copias también se transcriben (Banaei-Moghaddam et al. 2013, Navarro-Dominguez et al. 2017b). Estos genes están potencialmente implicados en funciones diversas, algunas de las cuales podrían estar involucradas en el mantenimiento evolutivo del propio cromosoma B (Valente et al. 2014, Banaei-Moghaddam et al. 2015, Navarro-Dominguez et al. 2017a, Makunin et al. 2018, Ruíz-Ruano et al. 2019, Benetta et al. 2020). Algunos de estos genes incluso se traducen (Ma et al. 2016, Kinsella et al. 2019) sugiriendo la posible funcionalidad de los productos de los genes de los cromosomas B.

Recientemente, Ahmad and Martins (2019) proponen una "visión moderna" de los cromosomas B donde estos "están enriquecidos en genes que codifican para muchas funciones biológicas significativas", proponiendo incluso un perfil funcional general de los cromosomas B (mezclando información del contenido génico de los cromosomas B de varias especies). Nosotros no compartimos esta opinión, ya que los cromosomas B de cada especie deben haber seguido una historia evolutiva diferente y lo único que

tienen en común, al nivel funcional, son aquellos genes que puedan ayudarle a transmitirse eficientemente y prosperar. Así, en la mayoría de los casos, serán los genes relacionados con el control del ciclo celular los que tendrán mayor significado evolutivo para los cromosomas B (Navarro-Dominguez et al. 2017a, y Ruiz-Ruano et al. 2019). Nuestros resultados en *P. autumnale* apoyan esta idea, ya que el 22 % de los genes detectados en el cromosoma B están relacionados con el ciclo celular, mientras que, en los genomas de plantas, en general, suelen representar sólo el 3.5 %, demostrando así que este cromosoma B está muy enriquecido en estos genes. Pero es que, además, los 10 genes del ciclo celular mostraron menos de 100 SNPs cada uno, mientras que 8 de los relacionados con otras funciones mostraban mucha más variación (hasta varios cientos de SNPs), estando la mayoría de los genes estaban truncados (ver Figura 4.4). Además, la prueba más definitiva es que los genes del ciclo celular mostraron mayores tasas de transcripción, a partir de las copias presentes en el B, que los genes para otras funciones (ver Figuras 4.5-4.6), lo cual podría relacionarse con que los genes truncados mostraron menores tasas de transcripción. Por tanto, si los genes que más se transcriben son precisamente los que más repercusión potencial tienen para el destino evolutivo del B, es decir, los que podrían alterar el curso de las divisiones celulares donde el B obtiene su impulso en la transmisión, creemos que no es necesario suponer que todo el contenido del B tiene significado funcional y evolutivo para el mismo.

#### ***Significado de la transcripción de los genes del cromosoma B***

Nuestros resultados han revelado que los genes del B no se transcriben aleatoriamente, ya que los del ciclo celular lo hace más intensamente, ni se trata de una transcripción residual, ya que la proporción de variantes Alt (que son secuencias específicas del cromosoma B) observadas para algunos genes era muy elevada. Por ejemplo, cinco genes del ciclo celular mostraron proporciones de transcritos Alt en el individuo 2B que superaron el 50% (es decir, que el individuo 2B obtenía más transcritos a partir del cromosoma B que de los cromosomas A). Estos genes eran KN14R (99.5 %), MCM7(93.9 %), (MSH5 (83.9 %), MAD1 (59 %) y MER3 (54 %). Sin embargo, de los 32 genes con otras funciones, sólo dos superaron el 50% de transcritos Alt por gen (100 % en CSLH3 y 58 % en RS6, y el primero estaba truncado), mientras que los 30 restantes no superaron el 11 % de transcritos Alt. Teniendo en cuenta que estos genes codifican para proteínas con funciones reguladoras del movimiento cromosómico basado en los microtúbulos, en la recombinación meiótica y en la segregación cromosómica (ver Tabla 4.4), la elevada tasa de transcripción de estos cinco genes podría alterar la regulación de la expresión génica durante las divisiones celulares y así proporcionar alguna ventaja al B durante su transmisión. De ellos, sólo MCM7 está truncado, pero incluso así es concebible que pudiera jugar un papel importante para el B dado que interviene en la iniciación de la replicación del DNA y en el desarrollo de polen, ya que los transcritos parciales de este gen podrían actuar como RNA de interferencia obstaculizando la funcionalidad de los transcritos procedentes de las copias de MCM7 residentes en los cromosomas A, tal

como propusieron Banaei-Moghaddam et al. (2015). Teniendo en cuenta que la acumulación (impulso) de los cromosomas B en *P. autumnale* es postmeiótica y resulta de la no disyunción mitótica de las cromátidas hermanas del B durante las mitosis de maduración del grano de polen, que determina que las dos cromátidas del B vayan juntas al núcleo generativo, está claro que el contenido génico de este cromosoma B le dota de potencialidades funcionales que justificarían la implicación del propio cromosoma B en la regulación de su impulso mitótico.

No obstante, las posibilidades funcionales de los genes encontrados hasta ahora en los cromosomas B de varias especies son solamente potenciales, ya que en ningún caso se ha analizado la transcripción de estos genes justo en el momento en que los Bs obtienen el impulso que les da la ventaja en la transmisión. Por ejemplo, en el saltamontes *Eyprepocnemis plorans*, Navarro-Dominguez et al. (2017a, b) analizaron la expresión de 10 genes del B en ovarios enteros, pero el impulso meiótico de este B (Zurita et al. 1998) ocurre durante la anafase meiótica, y esta fase celular no se da en el ovario sino en huevos recién ovopositados (Henriques-Gil et al. 1986). En *Locusta migratoria*, Ruiz-Ruano et al. (2019) analizaron la transcripción de los genes del B en gónadas enteras, y no durante la embriogénesis, que es donde se produce la inestabilidad mitótica que incrementa la frecuencia de Bs en testículos (Kayano 1971), o durante la puesta de huevos, que es cuando se produce el segundo tipo de impulso en esta especie (Pardo et al. 1994), similar al de *E. plorans*.

Mención aparte merece el caso de *Nasonia viripennis* cuyo cromosoma B (PSR, que significa "Paternal Sex Ratio") obtiene su impulso eliminando toda la dotación genómica paterna que le acompañaba en el espermatozoide, transformando así un huevo fecundado, que hubiera estado destinado a ser hembra en ausencia de PSR, en macho haploide portador del cromosoma B, alcanzando éste tasas de transmisión que pueden superar el 90 % (Werren 1991). Recientes análisis genómicos y transcriptómicos han revelado la presencia de 44 genes codificadores de proteínas en PSR de los que 25 se transcriben a tasas superiores a 10 transcritos por millón. Uno de ellos (PSR-4317), que tiene homología con un gen de una bacteria, resultó ser clave para el efecto haplodizante de PSR. Por eso, los autores llamaron "haploidizer" a este gen y consiguieron eliminar el impulso de PSR mediante RNA de interferencia para este gen en testículos de individuos portadores, demostrando así, por primera vez la implicación de un gen de un cromosoma B en la obtención de su impulso en la transmisión que explica su propio mantenimiento evolutivo.

En *P. autumnale*, nosotros hemos demostrado que el impulso del B ocurre durante el desarrollo del gametofito masculino (Lanzas et al. 2018; ver capítulo 1) y, por tanto, el mejor momento para analizar la transcripción de los genes del B sería en granos de polen que están emitiendo el tubo polínico porque es entonces cuando se producen las divisiones mitóticas en las que ocurre la no-disyunción en la que se basa el impulso

del B, como se ha demostrado en otras plantas como el centeno (Jones 1991). Desafortunadamente, cuando planteamos nuestros experimentos genómicos y transcriptómicos no sabíamos aun esto y, por eso, los realizamos en hojas por ser técnicamente más asequibles. No obstante, nuestros resultados indican que el B no es inerte genéticamente y que puede expresar los genes que contiene, preferentemente los relacionados con el control del ciclo celular, incluso en tejidos como la hoja donde no parece jugarse su destino evolutivo. Esta mayor tasa de transcripción de los genes del ciclo celular no se había demostrado con anterioridad para ningún cromosoma B de ninguna especie y representa un avance importante en el conocimiento del perfil funcional de los cromosomas B.

## Referencias

- Ahmad SF and Martins C. 2019. The modern view of B chromosomes under the impact of high scales omics analyses. *Cells* 8, 156.
- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A. 2013. Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *The Plant Cell*, 25(7), 2536–2544. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111856>
- Banaei-Moghaddam AL, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Mayer KFX, Houben A. 2015. Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Volume 1849, Issue 1: 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.007>.
- Benetta E D, Antoshechkin I, Yang T, NguyenH Q M, Ferree P M, Akbari O S. 2020. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. *Science Advances*, 6(14), eaaz9808. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9808>
- Bidau C J. 1986. A nucleolar-organizing B chromosome showing segregation–distortion in the grasshopper *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28(1), 138–148. <https://doi.org/10.1139/g86-018>
- Bidau CJ, Rosato M, Martí DA. 2004. FISH detection of ribosomal cistrons and assortment-distortion for X and B chromosomes in *Dichroplus pratensis* (Acrididae). *Cytogenet Genome Res* 106: 295–301.
- Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.*1;31(1):365-70. doi: 10.1093/nar/gkg095.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. Pp. 223–286 in T. R. Gregory, ed. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, CA.

- Dhar MK, Kour J and Kave S. 2019. Origin, behaviour, and transmission of B chromosome with special references to *Plantago lagopus*. *Genes* 10, 152.
- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, Trifonov VA, Vorobieva NV, Beklemisheva VR, Perelman PL, Graphodatskaya DA, Trut LN, Yang F, Ferguson-Smith MA, Acland GM, Aguirre GD. 2005. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Research*, 13(2), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-7474-9>
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M and Regev A . 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512.
- Henriques-Gil N, Jones GH, Cano MI, Arana P Santos J L. 1986. Female meiosis during oocyte maturation in *Eyprepocnemisplorans* (Orthoptera, Acrididae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28(1), 84–87.
- Jang TS, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leitch AR, Speta F and Weiss-Schneeweiss H. 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evolutionary Biology* 13:130.
- Jang TS, Parker JS, Weiss-Schneeweiss H. 2016. Structural polymorphisms and distinct genomic composition suggest recurrent origin and ongoing evolution of B chromosomes in the *Prospero autumnale* complex (Hyacinthaceae). *New Phytologist* ;210(2):669-79. doi: 10.1111/nph.13778.
- Jones RN. 1991. B-chromosome drive. *The American Naturalist*, Vol. 137, No. 3, Symposium: The Genetics and Evolutionary Biology of Meiotic Drive, pp. 430-442
- Kayano H. 1971. Accumulation of B chromosomes in the germ line of *Locusta migratoria*. *Heredity*, 27(1), 119–123. <https://doi.org/10.1038/hdy.1971.76>
- Kichigin I G, Lisachov A P, Giovannotti M, Makunin A I, Kabilov MR, O'Brien PCM, ... Trifonov, V. A. (2019). First report on B chromosome content in a reptilian species: the case of *Anolis carolinensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 294, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1483-9>
- Kinsella CM, Ruiz-Ruano FJ, Dion-Côté AM, Charles AJ, Gosmann, TI, Cabrero J, Kappei D, Hemmings N, Simons MJP, Camacho JPM, Forstmeier W, Suh A. 2019, Programmed DNA elimination of germline development genes in songbirds. *Nat Commun* 10, 5468. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13427-4>
- Kumke K, Macas J, Fuchs J, Altschmied L, Kour J, Dhar MK, & Houben A. 2016. *Plantago lagopus* B chromosome is enriched in 5S rDNA-derived satellite DNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 148(1), 68–73. <https://doi.org/10.1159/000444873>
- Lanzas P, Perfectti F, Garrido-Ramos MA, Ruíz-Rejón C, González-Sánchez M, Puertas M, Camacho JPM. 2018. Long-term monitoring of B-chromosome invasion and neutralization in a population of *Prospero autumnale* (Asparagaceae). *Evolution* 72(6):1216-1224. doi: 10.1111/evo.13501. Epub 2018 May 25. PMID: 29741266.

- Li W, A. Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659
- Ma W, Gabriel TS, Martis MM, Gursinsky T, Gursinsky T, Schubert V, Vrána J, Doležel J, Grundlach H, Altschmied L., Moghaddam U, Houben, A. 2016. Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog (Suppl. info). *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.14110>
- Makunin AI, Romanenko SA, Beklemisheva VR, Perelman PL, Druzhkova AS, Petrova KO, Prokopov DY, Chernyaeva EN, Johnson JL, Kukekova AV, Yang F, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS, Trifonov VA. 2018. Sequencing of supernumerary chromosomes of red fox and raccoon dog confirms a non-random gene acquisition by B chromosomes. *Genes*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/genes9080405>
- Maluszynska J, Schweizer D. 1989. Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity*, 62(1), 59–65. <https://doi.org/10.1038/hdy.1989.8>
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, Gundlach H, Wicker T, Šimková H, Novák P, Neumann P, Kubaláková M, Bauer E, Haseneyer G, Fuchs J, Doležel J, Stein N, Mayer KF, Houben A. 2012. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(33):13343-6. doi: 10.1073/pnas.1204237109.
- McAllister BF, Werren J H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106(4), 243–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254726>
- Miao VP, Covert SF, Vanetten HD. 1991. A fungal gene for antibiotic- resistance on a dispensable (B) chromosome. *Science* 254: 1773–1776.
- Montiel EE, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, Marchal JA, Sánchez A, Perfectti F, ... Camacho, J. P. M. (2015). Intragenomic distribution of RTE retroelements suggests intrachromosomal movement. *Chromosome Research*, 23(2), 211–223. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9461-5>
- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero, J, Corral JM, López-León MD, Sharbel TF, Camacho JPM. 2017a. Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Scientific Reports*, 7(April), 45200. <https://doi.org/10.1038/srep45200>

- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD. 2017b. Transcription of a B chromosome CAP-G pseudogene does not influence normal Condensin Complex genes in a grasshopper. *Scientific Reports*, 7(June), 17650. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15894-5>
- Ning Z, Cox AJ, Mullikin JC. 2001. SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res.* 11(10):1725-9. doi: 10.1101/gr.194201
- Pardo MC, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 1994. Transmission analysis of mitotically unstable B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Genome*, 37(6), 1027–1034. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18470141>
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 2012. B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PloS One*, 7(5), e36600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036600>
- Ruiz-Ruano FJ, Navarro-Domínguez B, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM. 2019. Evolutionary success of a parasitic B chromosome rests on gene content. *BioRxiv*, 1–25. <https://doi.org/10.1101/683417>
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. 2010. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*, 119(2), 217–225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016909>
- Valente GT, Conte MA, Fantinatt BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF., Vicari MR, Kocher TD and Martins C. 2014. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 31(8):2061–2072 doi: 10.1093/molbev/msu148
- Werren JH. 1991. The Paternal-Sex-Ratio Chromosome of *Nasonia*. *The American Naturalist*, 137(3), 392–402.
- Zurita S, Cabrero J, López-León M, Camacho J. 1998. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution*, 52(1), 274–277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb05163.x>

## Material suplementario

Las tablas suplementarias de este capítulo se encuentran en la dirección web:

<https://bio165.ugr.es/descargas/descargar/390/>

**Tabla S4.1.** Individuos muestreados en la población de La Palma, con el número de B, durante los dos años (2014 y 2017) en que se tomaron las muestras para la extracción de RNA

**Tabla S4.2.** Todos los contigs obtenidos

**Tabla S4.3.** Contigs con gFC < 0.5

**Tabla S4.4.** 87 contigs en los cromosomas B

**Tabla S4.5.** 51 contigs anotados

**Tabla S4.6.** 45 genes.

**Tabla S4.7.** Genes del ciclo celular.

**Tabla S4.1:** Individuos muestreados en la población de La Palma, con el número de Bs, durante los dos años en que se tomaron muestras para la extracción de RNA

año 2014		año 2017	
individuo	nº Bs	individuo	nº Bs
1	0	1	0
2	0	2	1
3	0	3	2
4	0	4	0
5	7	5	0
6	0	6	4
7	2	7	4
8	0	8	0
9	1	9	2
10	0		
11	0		
12	0		
13	1		
14	0		
15	2		
16	1		
17	1		
18	0		
19	0		
20	0		
21	2		
22	0		
23	0		
24	0		
25	2		
26	0		
27	2		
28	0		

## Discusión general

En el complejo de especies crípticas *Prospero autumnale* las especies se diferencian fundamentalmente por el número y tamaño de sus cromosomas, así como por el tamaño del genoma (cantidad de gDNA), no existiendo diferencias morfológicas significativas entre los distintos citotipos que forman el complejo (Jang et al. 2013). Este conjunto de especies crípticas ha evolucionado genómicamente durante el último millón de años que es cuando apareció la especie (Emadzade et al., sin publicar, mencionado en Jang et al. 2016). Parece ser que el citotipo ancestral fue muy semejante al B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> actual y que de éste derivaron los demás citotipos diploides, así como las formas poliploides (Jang et al. 2013). Durante este proceso se diferenció el citotipo AA que es exclusivo de la península ibérica y que se caracteriza por su mayor tamaño genómico con respecto al citotipo ancestral B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, aunque el número y morfología de sus cromosomas es semejante (Vaughan et al. 1997, Jang et al. 2013).

Tradicionalmente se ha pensado que el aumento en el tamaño del genoma en los organismos eucariotas se ha debido a la amplificación de elementos repetidos de distinto tipo y especialmente al aumento en frecuencia de los transposones (Elliot and Gregoy 2015). Según Jang et al. (2013) la acumulación de DNA repetido también parece haber sido la causa de las diferencias de tamaño genómico de los distintos citotipos diploides en el complejo *P. autumnale* (44 % de aumento en el citotipo B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y hasta y un 81 % en el AA con respecto al considerado ancestral B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>). En los análisis realizados en esta tesis, llevados a cabo a partir de datos NGS, también se refleja esta diferencia genómica en la clase y abundancia de distintos tipos de elementos repetidos. Sin embargo, los aumentos de DNA repetitivo detectados por nosotros sólo explican una parte ínfima de estos incrementos genómicos, sólo el 3 % en B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> y el 9 % en AA, con lo que resulta enigmática la variación en los tamaños de los genomas estimados por Jang et al. (2016). Podemos sugerir varias explicaciones para esta variación, tales como diferencias en el contenido en DNA repetitivo entre distintas poblaciones, diferencias entre poblaciones en la incidencia de duplicaciones génicas, en la longitud de los intrones o en la proporción de DNA repetitivo degenerado imposible de identificar con la metodología empleada.

Está claro que la relación entre el tamaño del genoma y la cantidad de DNA repetitivo no es directa en *P. autumnale*. Nuestra investigación contribuye a hacer de esta especie un buen modelo para el estudio de los cambios moleculares que explican la variación intraespecífica en el tamaño del genoma, debiéndose plantear futuras investigaciones para desvelar las causas de esta variación.

En *P. autumnale* se han encontrado cromosomas B en los citotipos diploides AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup>, estando ausente en el B<sup>5</sup>B<sup>5</sup> (Jang et al. 2016). En esta tesis hemos estudiado y cuantificado el contenido en DNA repetitivo en los cromosomas B del citotipo AA de *P. autumnale*, encontrando que éstos están enriquecidos en varios tipos de DNA repetido, principalmente transposones, tales como elementos LTR/Copia que suponen el 42.7 % de su contenido, siendo la familia Tork la más abundante de todas (32.7 %).

Otro 18.9 % del DNA repetido del B corresponde a elementos transponibles de la superfamilia LTR/Gypsy, y finalmente un 10.7 % a DNA satélite. De este último hemos identificado 15 familias distintas, siendo las más abundantes en el B las 4 pertenecientes a la superfamilia 6 y, en concreto, el DNA satélite PauSat21A-559, que supone el 6.9 % del cromosoma B.

Por otra parte, el 27.7 % del DNA repetitivo del B no muestran similitud con otras secuencias en las bases de datos, pudiendo tratarse de elementos transponibles particulares de este taxón que están aún sin anotar, o a elementos conocidos pero que aparezcan parcialmente degenerados. En comparación con las proporciones estimadas por nosotros en los cromosomas A, los cromosomas B mostraron 17 veces más DNA satélite, 3.92 veces más elementos LTR/Copia/Ale, 1.32 veces más LTR/Copia/Tork, y 7 veces más elementos desconocidos. De todos estos elementos destacan los satélites de la SF6, especialmente el satélite PauSat21-559, mencionado anteriormente, que es 113 veces más abundante en los B que en los A.

Existen pocos casos en la literatura científica que aborden el análisis del satelitoma de cromosomas B. Sólo en el saltamontes *Locusta migratoria* se ha realizado una cuantificación similar del DNA repetitivo de los cromosomas B (Ruiz-Ruano et al. 2018). En esta especie, sin embargo, el 95 % del DNA del cromosoma B era repetitivo, una proporción muy superior al 64 % encontrado en sus cromosomas A. Además, este cromosoma B está constituido mayoritariamente por DNA satélite, con una sola familia representando el 55 % del DNA del B. Por el contrario, aunque se han encontrado hasta 29 tipos distintos de transposones en ese B, estos autores concluyeron que, en comparación con los cromosomas A, los cromosomas B de *L. migratoria* están empobrecidos en elementos transponibles y enriquecidos en DNA satélite, contradiciendo las observaciones cualitativas realizadas anteriormente en otras especies (para revisión, ver Camacho 2005). Nuestros resultados en *P. autumnale* contrastan drásticamente con lo anterior, ya que sólo hemos podido catalogar como DNA repetitivo el 6 % del B, frente al 80 % de los cromosomas A. Aun así, este cromosoma B también está enriquecido en DNA satélite, sobre todo en la SF6, y muestra un empobrecimiento general en transposones, tal y como ocurre en *L. migratoria*. En general, la pequeña proporción de DNA repetitivo encontrada en el B de *P. autumnale* contrasta también con la idea generalizada de que los B son elementos heterocromáticos llenos de DNA repetitivo (Camacho 2005). Por último, sería muy interesante investigar qué tipos de DNA podemos encontrar en ese 94 % de DNA del B que no hemos podido clasificar como repetitivo.

Jang et al. (2016) han propuesto el origen recurrente de los cromosomas B en este complejo de especies. Nuestro análisis del satelitoma de *P. autumnale* ha proporcionado interesantes detalles sobre el origen del B en el citotipo AA. El satelitoma de esta especie está constituido por 42 familias, cinco de las cuales mostraron sobreabundancia superior a un orden de magnitud en los genomas con cromosomas B, siendo PauSat42-216 específico del B, ya que solo se encontró en plantas portadoras de este cromosoma. Además, encontramos que los cinco satélites más abundantes en los

cromosomas B del citotipo AA, también eran sobreabundantes en los citotipos B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> comparados con el citotipo AA. Esto indica que el contenido en DNA satélite del B se parece más al de los cromosomas A de estos dos citotipos que a los cromosomas A del propio citotipo AA, en donde se encuentra el B.

El género *Prospero* se originó hace entre 6 y 7 Ma (Ali et al. 2011) y, en concreto, *P. autumnale* surgió hace sólo 1 Ma. Esto delimita el origen de esta especie y sus cuatro citotipos diploides dentro de los sucesivos períodos glaciales e interglaciares del Pleistoceno (Parker et al. 1991, Jang et al. 2013). Como el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> es simpátrico con el AA, es lógico suponer que pudiera haber ocurrido un evento de hibridación entre ambos citotipos, ya que la hibridación es uno de los mecanismos más aceptados para el origen de los cromosomas B, como ha sido evidenciado incluso experimentalmente (Perfectti y Werren 2001). Por tanto, es concebible que los cambios climáticos asociados a las glaciaciones del Pleistoceno pudieran facilitar el aislamiento y diferenciación del citotipo AA en la mitad sur de la Península Ibérica y después la hibridación e introgresión que inició la presencia del cromosoma B en este citotipo. Este mecanismo de origen de los cromosomas B ha sido propuesto para varias especies de abejas del género *Partamona* (Tosta et al. 2014) y de la avispa *Nasonia vitripennis* (McAllister and Werren 1997, Benetta et al. 2020). En el caso de *P. autumnale*, la presencia del satélite específico del B (PauSat42-216), que no dio conteos de abundancia en los dos individuos OB del citotipo AA, pero sí lo hizo en el individuo OB del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, aboga por un origen del B separado de la aparición del citotipo AA, además del hecho de que los cuatro satélites de la SF6 (especialmente PauSat21-559) son muy escasos en AA y muy abundantes en el B y en el citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. En conjunto, estos hechos apoyan el origen del B en AA mediante introgresión desde B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>. Además, nuestros resultados actuales serían compatibles tanto con que el B se hubiera originado en el mismo momento de la hibridación, a partir de alguno de los cromosomas A de B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>, o bien que, posteriormente al origen del citotipo AA, algún B que ya existía en B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> fuera introgresado en AA. Estas hipótesis alternativas podrían someterse a prueba analizando el contenido génico y en DNA repetitivo de los cromosomas B encontrados en poblaciones del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> localizadas en varias regiones geográficas europeas.

Además de DNA repetitivo, también hemos encontrado genes codificadores de proteínas en el cromosoma B de *P. autumnale*. Este cromosoma B se une a los de otras especies donde se ha demostrado recientemente la presencia de genes codificadores para proteínas, algunos de los cuales incluso se transcriben, lo que ha demostrado que los cromosomas B no son genéticamente inertes. Es lógico pensar que algunos de estos genes podrían determinar cambios funcionales importantes en los individuos portadores de cromosomas B, que favorecieran el impulso transmisional del B y que podrían haber sido muy importantes en el origen y evolución de los polimorfismos para cromosomas B. En este sentido, los genes del ciclo celular son los más prometedores, tal como han resaltado otros autores (ver revisión en Benetta et al. 2019). Nuestros resultados han demostrado que el cromosoma B de *P. autumnale*, contiene varios genes

del ciclo celular que aparentemente podrían estar intactos en el B, transcribiéndose activamente en el tejido foliar analizado. Este es el caso de los genes *kn14r*, *mer3*, *msh4* y *msh5* que codifican para proteínas implicadas en el movimiento cromosómico basado en microtúbulos, en la recombinación meiótica y en la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis. Incluso los transcritos de los genes truncados del B podrían tener la potencialidad de provocar alteraciones transcripcionales que influyeran en las funciones de las proteínas codificadas por los genes completos transcritos a partir de los cromosomas A, ya que podrían actuar como RNA de interferencia (Banaei-Moghadan et al. 2015, Pink et al. 2011).

Además de los 10 genes implicados en el ciclo celular, hemos identificado otros 35 genes en el B que codifican para una amplia variedad de funciones, y cuya transcripción podría interferir con algún proceso metabólico y desencadenar efectos derivados de la presencia de los cromosomas B, tales como la expresión del gen de esterases planteada por Ruiz-Rejón et al. 1980 y Oliver et al. 1982). Pensamos que los genes presentes en el cromosoma B proceden, en su mayoría, de los cromosomas A que dieron lugar al B, aunque no se puede obviar que la historia evolutiva del B puede haber marcado una serie de ganancias y pérdidas de genes posteriormente a su origen, tal como han propuesto otros autores (Martis et al. 2012).

En todo caso, la mera presencia de genes de proteínas en los cromosomas B no significa que sean funcionales. Para ello, es necesario que su secuencia no haya degenerado demasiado y que se transcriban a proteínas funcionales. Nuestro análisis transcripcional ha demostrado que los genes presentes en el cromosoma B no se transcriben al azar, siendo los implicados en el ciclo celular lo que se transcriben más activamente. Este hecho no se había descrito anteriormente para ningún cromosoma B, y sugiere que la interferencia sobre el ciclo celular está entre las máximas prioridades funcionales de este cromosoma B. Esto es lógico para un B que obtiene su impulso transmisional mediante no disyunción mitótica (Lanzas et al. 2018). En el capítulo 1 de la tesis, nosotros realizamos un estudio temporal de la frecuencia de Bs en la población de *P. autumnale* de Cuesta de la Palma, abarcando un período de 34 años, incluyendo los datos obtenidos por otros autores en estudios anteriores (Ruiz-Rejón et al. 1980a, 1980b). Estos datos históricos no han permitido realizar un seguimiento en el tiempo de diferentes parámetros de la frecuencia de Bs en la población, detectándose cambios temporales en los mismos y que no se habían estudiado anteriormente en poblaciones naturales de plantas, aunque sí en especies animales tales como *E. plorans* (Riera et al. 2004, Camacho et al. 2015. Manrique-Poyato et al. 2020).

En todos los casos estudiados la frecuencia de Bs parece alcanzar un máximo para la prevalencia y carga, pero no para la media, que suele fluctuar a lo largo del tiempo, tal como predice el modelo casi-neutro de evolución de los B propuesto por Camacho et al. (1999). En nuestro caso, la prevalencia y la carga de Bs mostraron cambios importantes entre años en Cuesta La Palma, pudiendo dividir el periodo temporal total estudiado en dos etapas bien diferenciadas: i) una etapa de invasión durante los 80s y ii) una etapa casi-neutra durante los 2000s. La invasión rápida de los

cromosomas B probablemente fue facilitada por el sistema reproductivo predominante de fecundación cruzada de *P. autumnale* (Lanzas et al. 2018).

Con respecto a la prevalencia de Bs, si comparamos muestras consecutivas, se revelan dos cambios significativos en esta población: i) una entre 1987 y 2005, en la que se produce un incremento de frecuencia; y ii) otro entre 2006 y 2012, en el cual ocurre lo contrario, es decir una disminución de la misma. El aumento de la frecuencia parece haberse producido mediante el proceso de invasión ocurrido entre 1987 y 2005, mientras que la disminución de la frecuencia entre 2006 y 2012 puede ser una de las fluctuaciones características del estado casi neutro en el que parece encontrarse la dinámica poblacional del cromosoma B.

La carga de Bs no experimentó cambios significativos durante todo el período analizado, implicando que la carga de B no puede incrementarse por encima de un umbral, que en *P. autumnale* es claramente más alta que en *E. plorans*, presumiblemente a causa de que la primera especie muestra mayor tolerancia a los Bs, como lo indica la ausencia de efectos sobre el vigor y la fertilidad (Lanzas y col. 2018). Este mantenimiento de los valores de carga puede estar relacionado con que los cromosomas B no produzcan efectos importantes sobre el fenotipo externo y tampoco efectos perjudiciales sobre los rasgos relacionados con la fertilidad (fertilidad del polen, producción de óvulos y semillas), al menos a esos niveles de carga. La selección debe haber actuado durante el período de invasión, pudiendo explicar la ausencia de efectos del B en los individuos de esta población. Además, puede haber habido selección de genes de resistencia que frenen la acumulación del B, como ha sido postulado para *E. plorans* (Perfectti et al. 2004). Nuestros análisis de progenies han mostrado impulso en el gametofito masculino y freno (“drag”) en el femenino, con una tasa neta de transmisión ( $k_B$ ) de 0.49, muy cercana a la mendeliana de 0.5, prediciendo la estabilidad en la frecuencia de B entre 2012 y 2013, que es consistente con nuestro análisis temporal de las frecuencias de Bs en Cuesta de la Palma (Lanzas et al. 2018).

Por lo que respecta al mecanismo de impulso que ocurre en el gametofito masculino de *P. autumnale*, mediante no disyunción mitótica al formarse los núcleos generativo y vegetativo (Lanzas et al. 2018), es claro que favorece un número par de Bs. Está sería la razón por la que la frecuencia de cariomorfos con número par de Bs en las poblaciones naturales analizadas era mayor que la de los números impares inmediatamente inferiores, un hecho que es típico de los Bs con este tipo de impulso en otras plantas como el centeno (Puertas et al. 1990).

Tomados conjuntamente, nuestros resultados son consistentes con el modelo casi-neutro de la evolución de los cromosomas B descrito inicialmente para el saltamontes *E. plorans* (Camacho et al. 1997). La principal diferencia encontrada con respecto a *P. autumnale* es que en el saltamontes el impulso y su supresión tienen lugar en el sexo femenino, mientras que en *P. autumnale*, el impulso está sucediendo todavía a través del gametofito masculino ( $k_B = 0.65$ ) y la supresión actúa sobre el gametofito femenino ( $k_B = 0.33$ ), resultando en una transmisión neta del B ( $k_B = 0.49$ ) típica de un cromosoma B casi-neutro. Será interesante desvelar, en futuras investigaciones, si existe

una relación funcional entre la transcripción de los genes del B en ambos sexos -sobre todo los genes que tienen relación con el ciclo celular- y su posible repercusión sobre las tasas de transmisión tan diferentes observadas en ambos sexos.

Finalmente, nuestros análisis interpoblacionales han permitido conocer cómo de extendida está la distribución de los cromosomas B en otras poblaciones de *P. autumnale* cercanas a La Palma. Para ello, durante los años 2013 y 2015 obtuvimos muestras de 14 localidades, tres de las cuales mostraron la presencia de cromosomas B, estando dos de ellas (Umbral y Tapia) muy cerca de La Palma, y la tercera (Torcal) un poco más alejada. La frecuencia de Bs en estas poblaciones resultó ser mucho menor que la encontrada en La Palma, lo que sugiere que probablemente estas poblaciones hayan recibido los B por transmisión de polen desde individuos situados en La Palma. En cualquier caso, existe una distribución abrupta de los Bs en la zona estudiada, que puede explicarse por un escaso flujo génico entre poblaciones, quizás debido al aislamiento geográfico que sufren y a la escasa capacidad de dispersión de semillas y polen que se espera en esta planta (Dafni 1996), que al florecer en otoño no es visitada por un alto número de polinizadores. Este patrón de distribución abrupta también se ha encontrado en otros sistemas de cromosomas B como en el saltamontes *E. plorans* en el río Segura (Cabrero et al. 1997) o en la planta *Allium schoenoprasum* (Bougourd and Parker 1979). En ambos casos esta distribución se explica por una interrupción del flujo génico debido a barreras geográficas o a dificultades en la transmisión de propágulos reproductores.

La distribución geográfica observada para los cromosomas B de *P. autumnale* no parece estar relacionada con factores geográficos tales como la altitud, latitud o longitud, ni tampoco con ciertos valores medios de caracteres poblacionales relacionados con el tamaño o el vigor, pero sí con los valores medios de los caracteres relacionados con la fertilidad y la reproducción, siendo éstos más altos en las poblaciones con Bs. Puede que esta relación se deba a que probablemente la conectividad por polen sea mayor en las poblaciones con B, estando este hecho relacionado con la vía de acumulación a través del gametofito masculino que muestra el B en esta especie (Lanzas et al. 2018).

## Referencias

- Ali SS, Yu Y, Pfosser M, Wetschnig W. 2011. Inferences of biogeographical histories within subfamily Hyacinthoideae using S-DIVA and Bayesian binary MCMC analysis implemented in RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies). *Annals of Botany* 109:95–107.
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Mayer KF, Houben A. 2015. Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. *Biochim Biophys Acta*. 1849(1):64-70. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.11.007.

- Benetta ED, Antoshechkin I, Yang T, Nguyen HQM, Ferree PM & Akbari OS. 2020. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. *Science Advances*, 6(14), eaaz9808. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9808>
- Bougourd SM and Parker JS. 1979. The B-chromosome system of *Allium schoenoprasum* III. An abrupt change in B-frequency. *Chromosome* 75:385-392
- Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A and Camacho JPM. 1997. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, long a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*, 5, 194–198
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC and Cabrero J. 1997. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*, 149(6), 1030–1050. <https://doi.org/10.1086/303364>
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. Pp. 223–286 in T. R. Gregory, ed. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, CA.
- Camacho JPM, Shaw MW, Cabrero J, Bakkali M, Ruiz-Estevez M, Ruiz-Ruano FJ, Martín-Blázquez R and López-León MD. 2015. Transient microgeographic clines during B chromosome invasions. *The American Naturalist*. 186(5), 675–681. <https://doi.org/10.1086/683172>
- Dafni A. 1996. Autumnal and winter pollination adaptations under Mediterranean conditions. *Bocconea*, 5:171-181.
- Elliott TA and Gregory TR. 2015. What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0331>
- Jang TS, Emadzade K, Parker J, Temsch EM, Leitch, AR, Speta F and Weiss-Schneeweiss H. 2013. Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evolutionary Biology* 13:130.
- Jang TS, Parker JS, Weiss-Schneeweiss H. 2016. Structural polymorphisms and distinct genomic composition suggest recurrent origin and ongoing evolution of B chromosomes in the *Prospero autumnale* complex (Hyacinthaceae). *New Phytologist* ;210(2):669-79. doi: 10.1111/nph.13778.
- Lanzas P, Perfectti F, Garrido-Ramos MA, Ruíz-Rejón C, González-Sánchez M, Puertas M, Camacho JPM. 2018. Long-term monitoring of B-chromosome invasion and neutralization in a population of *Prospero autumnale* (Asparagaceae). *Evolution* 72(6):1216-1224. doi: 10.1111/evo.13501. Epub 2018 May 25. PMID: 29741266.

- Ma W, Gabriel TS, Martis MM, Gursinsky T, Gursinsky T, Schubert V, Vrána J, Doležel J, Grundlach H, Altschmied L, Moghaddam U, Houben, A. 2016. Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog (Suppl. info). *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.14110>
- Manrique-Poyato M I, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F., Gómez R and Camacho J PM. 2020. Interpopulation spread of a parasitic B chromosome is unlikely through males in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, 124, 197–206. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0248-5>
- McAllister BF and Werren JH. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106(4), 243–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254726>
- Oliver JL, Posse, F, Martínez-Zapater JM, Enriquez AM and Ruiz-Rejón M. 1982. B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosome* 85: 399-403.
- Parker JS, Lozano R, Taylor S y Ruiz-Rejón M. 1991. Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. *Heredity* 67, 287-297.
- Perfectti F and Werren JH. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution*, 55(5), 1069–1073. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055\[1069:tioobc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055[1069:tioobc]2.0.co;2)
- Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DR. 2011. Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA* 17(5), 792–798. <https://doi.org/10.1261/rna.2658311>
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA, Cabrero J, Bakkali M, López-León MD, Camacho JPM. 2004. Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenetic and genome research*, 106(2-4), 338-343. <https://doi.org/10.1159/000079309>
- Puertas MJ, Jiménez MM, Romera F, Vega JM, Díez M. 1990. Maternal imprinting effect on B chromosome transmission in rye. *Heredity*, 64(2), 197–204. <https://doi.org/10.1038/hdy.1990.24>
- Riera L, Petitpierre E, Juan C, Cabrero J, Camacho JP. 2004. Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J Evol Biol*. 17(3):716-9. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00696.x. PMID: 15149414.
- Ruiz-Rejón M, Oliver JL and Ruiz-Rejón C. 1980a. Variabilidad cromosómica en *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) de la Península Ibérica. *Bol. Soc. Brot. Ser. 2*, 53: 555-562.
- Ruiz-Rejón M, Posse F and Oliver JL. 1980b. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). Effects at the isozyme level. *Chromosoma* 79. 341-348.

Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León M D, Sánchez A and Camacho JPM.2018. Quantitative sequence characterization for repetitive DNA content in the supernumerary chromosome of the migratory locust. *Chromosoma*, 127(1), 45–57. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0644-7>.

Tosta VC, Marthe JB, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM, Pompolo SG, Recco-Pimentel SM, Perfectti F, Campos LA, Camacho JP. 2014. Possible introgression of B chromosomes between bee species (genus *Partamona*). *Cytogenetic and Genome Research*, 144(3), 220–226. <https://doi.org/10.1159/000370171>

## Conclusiones

1.- El cromosoma B de *P. autumnale* ha mostrado una dinámica poblacional congruente con un proceso de invasión de la población de La Palma que parece haber culminado en los años '80 del siglo pasado.

2.- Los análisis de progenies muestran que el B presenta impulso ( $k_B > 0.5$ ) durante la transmisión masculina y freno ( $k_B < 0.5$ ) a través del gametofito femenino, resultando una tasa neta próxima a la mendeliana. Concluimos, por tanto, que éste es un B parasítico que ha sido neutralizado a nivel de la transmisión por el lado femenino.

3.- La frecuencia de Bs en la población de La Palma de *P. autumnale* ha aumentado en los últimos años hasta llegar a una situación estable que es coherente con el modelo casi-neutro de evolución de cromosomas B.

4.- La presencia de cromosomas B no afecta a rasgos cuantitativos poblacionales relacionados con el vigor o la fertilidad, pero las poblaciones portadoras de cromosomas B presentan mayor producción de semillas que podría estar relacionado a una mayor conectividad individual a través del polen.

5.- A nivel molecular, los cromosomas B de *P. autumnale* contienen una menor proporción de DNA repetitivo que los cromosomas estándar de la especie, y constan principalmente de DNA satélite y algunas familias de elementos transponibles.

6.- El análisis del satelitoma y de otros elementos repetitivos de los cromosomas B y de los citotipos AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> y B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> sugiere el origen del cromosoma B presente en el citotipo AA a partir del citotipo B<sup>7</sup>B<sup>7</sup>.

7.- Los cromosomas B de *P. autumnale* contienen genes del ciclo celular que se transcriben preferentemente a los genes del B con otras funciones, por lo que los primeros podrían ser responsables de la no-disyunción mitótica del B en el gametofito masculino que constituye la base de su impulso transmisional.

## Conclusions

1.- The B chromosome of *P. autumnale* has shown a population dynamic consistent with a process of invasion of the La Palma population that seems to have culminated in the 1980s.

2.- Progeny analyzes show that B presents impulse ( $k_B > 0.5$ ) during male transmission and brake ( $k_B < 0.5$ ) through the female gametophyte, resulting in a net rate close to the Mendelian. We conclude, therefore, that this is a parasitic B that has been neutralized at the level of transmission by the female side.

3.- The frequency of Bs in the La Palma population of *P. autumnale* has increased in recent years until reaching a stable situation that is consistent with the near-neutral model of B chromosome evolution.

4.- The presence of B chromosomes does not affect quantitative population traits related to vigor or fertility, but populations carrying B chromosomes present higher seed production that could be related to greater individual connectivity through pollen.

5.- At the molecular level, the B chromosomes of *P. autumnale* contain a lower proportion of repetitive DNA than the standard chromosomes of the species, and consist mainly of satellite DNA and some families of transposable elements.

6.- The analysis of the satellitome and other repetitive elements of the B chromosomes and of the AA, B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> and B<sup>6</sup>B<sup>6</sup> cytotypes suggests the origin of the B chromosome present in the AA cytotype from the B<sup>7</sup>B<sup>7</sup> cytotype.

7.- The B chromosomes of *P. autumnale* contain cell cycle genes that are preferentially transcribed to the B genes with other functions, so the former could be responsible for the mitotic nondisjunction of B in the male gametophyte that forms the basis of its transmission impulse.

## Agradecimientos

Este trabajo es producto del tiempo y del trabajo y aportaciones de muchos colaboradores que es justo mencionar aquí.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis: los doctores Juan Pedro Martínez Camacho y Francisco Perfectti Álvarez su interés, apoyo, trabajo y entusiasmo durante todo el tiempo que ha durado la realización de este trabajo. Quiero agradecer especialmente a Juan Pedro, por haberme animado a realizar esta tesis hace ya algunos años, y por interesarse por mis primeros resultados cuando terminé mi trabajo para la obtención del diploma de estudios avanzados. Me siento afortunado de haber contado con la dirección de uno de los especialistas mundiales en el tema de los cromosomas B. Su sabiduría, experiencia y dedicación son dignas de admiración.

De Paco Perfectti he aprendido a ser riguroso y crítico con los datos, y a ser cauteloso con su interpretación. Sin duda, las conversaciones que hemos tenido sobre el tema de esta tesis y otros muchos y diversos, han ayudado a desarrollar en mí esta actitud.

A Francisco Ruíz-Ruano (Paquillo) que sin duda ha sido mi tercer director de tesis, y que me ayudó mucho en mis primeros pasos en el laboratorio y en comprender e interpretar los primeros datos de NGS; la mayoría del trabajo bioinformático que hay en esta tesis se debe a su trabajo e interés.

A Carmelo Ruíz-Rejón, con quién di mis primeros pasos con la escila (que es como llamamos vulgarmente a *Prospero*), me dirigió y ayudó con el trabajo del diploma de estudios avanzados, donde ya iniciamos el estudio de algunos de los temas desarrollados en esta tesis. Igualmente, a su hermano Manuel por sugerirme el tema de mi trabajo de DEA, y por iniciar los trabajos en cromosomas B en la escila hace ya mucho tiempo en la población de La Palma y que, sin duda, fueron el germen de esta tesis.

A Manolo Garrido, por permitirme usar sus datos sobre cromosomas B en escila de La Palma de los años 80, que tenía sin publicar y que gracias a ellos pudimos comprobar muchas cuestiones de las que aparecen en el capítulo 1.

A mis compañeros de laboratorio durante el tiempo que hice todo el trabajo experimental: Bea, Rubén, María, Carolina y Javi. Con ellos compartí inquietudes, algunas discusiones interesantes y mucho humor. Por supuesto también aprendí mucho de ellos y me ayudaron en momentos de desconcierto.

Tampoco me quiero olvidar de Pepi y Lola, asimismo componentes del departamento de Genética de la UGR, y que pusieron todo su interés y conocimiento en intentar desarrollar la FISH de DNA satélites aquí estudiados y que resultó un tema difícil y arduo.

A la Dr<sup>a</sup> Hanna Weiss-Schneeweiss, de Universidad de Viena, que nos cedió material de escila para poder estudiar los aspectos moleculares de esta tesis, y por haberme invitado a pasar un tiempo en su laboratorio, aunque finalmente no pudiera ser.

A Mónica y María de la UCM, cuyo trabajo y criterio fue fundamental para poder completar la información para elaborar el capítulo 1.

A Emilio, por ayudarme a realizar los mapas que aparecen en esta tesis, y a Celia por diseñar una bonita portada para darle empaque al trabajo.

A todas las personas que me han ayudado de alguna forma, muchas de ellas sin saberlo, y que han aportado algo para que esta tesis pueda llegar a su fin. Seguramente me he olvidado del nombre de alguno de ellos, espero que me disculpe, pero no por eso han sido menos importantes. Del que no me he olvidado ha sido de Manuel Ruíz, alcalde pedáneo de Cuesta La Palma, que me acompañó en algunas ocasiones a recoger escilas y que se interesó mucho por mi trabajo, a pesar de no comprender mucho de lo que trataba, además de ser un buen amigo. Y de Encarni, a quién quiero dar las gracias por su comprensión, apoyo en momentos difíciles y por todo el tiempo que ha tenido que soportar las chapas que le he dado sobre la tesis y todos sus aspectos relacionados.

Finalmente quiero terminar con dos aforismos procedentes del refranero español, que tanta sabiduría popular contiene, y que bien pueden aplicarse a esta tesis y a su autor. El primero de ellos dice “nunca es tarde si la dicha es buena”, y el segundo “más vale tarde que nunca”.

A partir de ahora, un tiempo para pensar y reflexionar en todos los temas tratados aquí y en otros, en los pueblos de Andalucía adonde mi trabajo me lleve.

Loja, a 5 de septiembre de 2021.

Gracias a todos por todo.