

Dinámica espacial y temporal de los cromosomas  
B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*



Universidad de Granada

M<sup>a</sup> Inmaculada Manrique Poyato

Tesis Doctoral

Noviembre, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Inmaculada Manrique Poyato  
D.L.: GR 1977-2011  
ISBN: 978-84-694-1140-7



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



## Dinámica espacial y temporal de los cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*

Memoria de Tesis Doctoral  
presentada por la licenciada en Biología  
M<sup>a</sup> Inmaculada Manrique Poyato para  
optar al grado de «Doctor por la  
Universidad de Granada».

Dirigida por los Doctores:

Fdo. María Dolores López León

Fdo. Juan Pedro Martínez Camacho

Granada, 2010



El presente trabajo se ha realizado en el Grupo de Genética Evolutiva del Departamento de Genética de la Universidad de Granada. La investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través de los proyectos BOS2003-06635, CGL2006-06307 y CGL2009-11917 y del Plan Andaluz de Investigación (CVI-1664).

Durante la realización de este proyecto de Tesis Doctoral he disfrutado de una Beca Predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU, ref. AP2003-3138), del Ministerio de Educación.



A mis padres  
y a mi hermano

A Rafa



## AGRADECIMIENTOS

Recuerdo, como si de ayer se tratase, el primer día que visité el Departamento de Genética de esta Universidad. Por entonces tenía 17 años y unos días antes, el destino me llevó a llamar al teléfono del despacho del entonces director, Juan Pedro Martínez Camacho. Necesitaba información sobre las asignaturas de Genética impartidas en la Licenciatura de Biología. Durante mi conversación con él, me ofreció incorporarme a su grupo de investigación. Y así fue, desde entonces hasta ahora hemos trabajado juntos. Juan Pedro, nunca olvidaré que gracias a ti he formado parte de un grupo de trabajo que más bien se trata de una familia. Te estoy enormemente agradecida por ello.

Y después de doce años mi sueño se ha visto hecho realidad, el día de la defensa de mi Tesis Doctoral está a la vuelta de la esquina. La ilusión de mi vida siempre fue dedicarme a la investigación y puedo decir que hasta hoy, se ha cumplido.

Durante el período que ha durado la preparación de mi Tesis Doctoral he contado con el apoyo incondicional de mis directores, Juan Pedro Martínez Camacho y M<sup>a</sup> Dolores López León. Me habéis apoyado en todas las decisiones que he tomado y, en los momentos más difíciles, me habéis ayudado a seguir el camino correcto. Lola, gracias por toda la ayuda que he recibido por tu parte, has estado a mi lado siempre que te he necesitado como profesora y amiga. Juan Pedro, gracias por ser paciente conmigo, han sido muchos años los que hemos trabajado juntos y has sabido demostrar tu valía tanto profesional como humana en cada momento que te he necesitado. Sin vosotros esta Tesis Doctoral no habría sido posible.

A Josefa Cabrero Hurtado, quien me ha escuchado siempre en los buenos y malos momentos y ha sabido aconsejarme sabiamente. He tenido en ti la confianza y el mayor respeto que se le puede tener a una persona y la tranquilidad de saber que estabas ahí apoyándome.

A Francisco Perfectti Álvarez, por ayudarme a resolver mis dudas siempre que ha sido necesario. Gracias por toda la ayuda prestada.

A Angel Martín Alganza, amigo y compañero. Han sido muchos los ratos que hemos compartido y enorme la ayuda que siempre me has ofrecido.

A José María Corral García, de quien me considero discípula. Sabes que te tengo un gran cariño. De ti aprendí que con entusiasmo y perseverancia todo se puede conseguir. Con tu compañía en el laboratorio las horas al microscopio pasaban inadvertidas.

A Sebastián Cuadros Plata, nuestro técnico del departamento durante muchos años. Nunca olvidaré el cariño con el que siempre me has tratado, tu buena disposición y todas las historias que me has contado sobre los comienzos de la Licenciatura de Biología en Granada, y a M<sup>a</sup> Ángeles Ferrández Pastor, por ayudarme con la secuenciación.

Han sido muchos los compañeros que han pasado por el laboratorio durante estos años y de todos y cada uno de ellos he aprendido algo. No quiero olvidarme de José María Mesa, Helena Piñar Trenado, Vanessa López Salazar, Miguel Galiana, Fco. Javier Teodoro, Sonia Rocha, Vilma Loreto, Vander Tosta, Laura Martínez Rodríguez, Mohamed Bakkali, Mohamed Abdelaziz Mohamed y Jesús Muñoz Pajares. A los chiquitines, Eva Garmendia Espinosa, Leticia Ayllón Egea, María Lucena Pérez y Fco. Ruiz Ruano, porque le dais alegría al laboratorio. A María Teruel Artacho, mi amiga y mi compañera de fatigas durante la tesis. A las niñas, Bea Navarro, Mercy Ruiz Estévez, E. Elisabeth Montiel Jiménez y Tati López Pérez, es fantástico entrar al laboratorio y encontraros allí, hace que el trabajo sea menos duro.

Quiero hacer una mención especial para Tati, por toda la ayuda que me has prestado y por estar ahí siempre que te he necesitado.

A todos y cada uno de los compañeros del Departamento de Genética, por el afecto que me habéis mostrado durante todo este tiempo.

A Felipe Pascual Torres, por sus consejos sobre saltamontes y por toda la información que me ha facilitado.

Al Dr. Tim Sharbel, por acogerme en su grupo de investigación en el Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research de Gatersleben (Alemania) y por facilitarme todos los medios que tenía a su alcance.

A mis compañeros de doctorado, esos “Monstruos Esperanzadores”, con quienes compartí unos meses increíblemente enriquecedores y divertidos. A todos ellos, María Roldán y sus hormiguitas, Javier Pérez González y sus ciervos, Alex Centeno Cuadros y sus ratitas de agua, Miguel Calero y los parásitos de aves, Marián González Pereira y sus ginetas y meloncillos y como no, a Cuauhtemoc Chávez con sus jaguares y pumas. Nunca olvidaré cuánto disfrutamos juntos.

A Marta Puente Molins, mi amiga y compañera en Alemania. Mis estancias allí no hubieran sido lo mismo sin ti. Me ayudaste de forma incondicional. Gracias por tu amistad y apoyo a lo largo de estos años.

A Thomas Thiel (por brindarme tu amistad), a Matías Zurbriggen (por tu alegría y optimismo) y a Anja Hanemann (por, entre otras cosas, dedicarnos esas tardes a que aprendiéramos alemán).

A Francisco J. Bulejos Carrillo, por levantarme el ánimo siempre que me veías decaída. Gracias por tu compañía, para mí ha sido esencial.

A mi familia y a la familia de Rafa. A mis abuelos Ángel y Manuel, de quienes no puedo ni quiero olvidarme, ellos estarían orgullosos de mi trabajo.

A mi padre, al gran padre que tengo, que se ha desvivido por darme cuanto he necesitado. A mi hermano, por la confianza que depositas en mí y por lo mucho que te quiero. A mi aita, por ser, no sólo mi madre, sino también mi mejor amiga; has sido mi compañera en todo, estás en cada uno de los capítulos de esta tesis porque te lo has ganado a pulso, ayudándome en todo cuanto he necesitado, nadie mejor que tú sabe cuánto me ha costado llegar hasta aquí. Gracias por vuestra comprensión y apoyo incondicional, por respetar siempre las decisiones que he tomado y por haber sabido darme buenos consejos.

A Rafa, mi compañero, mi mejor amigo, mi amor. Gracias por tu paciencia, por tu cariño, por tu apoyo y ayuda.





## INDICE

---

<b>SUMMARY</b>	21
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL: LOS CROMOSOMAS B</b>	25
1.1. Tamaño, morfología, composición y actividad génica de los cromosomas	27
1.2. Frecuencia de los cromosomas B.	31
1.3. Mecanismos de acumulación.	32
1.4. Origen	34
1.5. Efectos	36
1.6. Evolución	40
<b>OBJETIVOS</b>	45
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	47
2.1. Material biológico	49
2.2. Metodología y técnicas empleadas	60
2.2.1. Técnicas citogenéticas	60
2.2.1.1. Fijación del material	60
2.2.1.2. Obtención de las preparaciones	62
2.2.1.3. Bando C	63
2.2.1.4. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	64
2.2.2. Análisis de la frecuencia de cromosomas B	67
2.2.3. Técnicas moleculares	69
2.2.3.1. Extracción de ADN genómico a partir de cuerpos	69
2.2.3.2. Cuantificación de ADN con fluorímetro	70
2.2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa	71
2.2.3.4. Visualización de los geles	73
2.2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	73
❖ Secuencias mitocondriales	73
❖ Marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)	75
❖ Cuantificación del fenómeno <i>Allelic Dropout</i>	76
❖ Análisis de herencia de los marcadores ISSR	76
2.2.3.6. Purificación del producto de PCR	76
2.2.4. Tampones y soluciones	77

2.2.4.1. Tampones biológicos	77
2.2.4.2. Fijadores	79
2.2.4.3. Reactivos	80
2.2.4.3. Soluciones químicas	82
2.2.5. Cáptura de imágenes	84
2.2.6. Herramientas informáticas	84
2.2.6.1. Análisis de las secuencias mitocondriales y construcción de	85
2.2.6.2. Análisis de los marcadores ISSR	88
2.2.7. Introducción artificial del cromosoma B2 de Salobreña en El	90
2.2.7.1. Estimación del tamaño poblacional en El Gallego.	90
2.2.7.2. Liberación de machos procedentes de Salobreña y seguimiento de la frecuencia de los cromosomas B en El Gallego durante doce años	94
2.2.7.3. Mediciones de las proporciones relativas de ADNsat y ADNrib en el cromosoma B de El Gallego y tamaño relativo con respecto al cromosoma X	96
Detection of B chromosomes in interphase hemolymph nuclei from living specimens of the grasshopper <i>Eyprepocnemis plorans</i>	97
<b>HISTORIA EVOLUTIVA DE <i>EYPREPOCNEMIS PLORANS</i></b>	101
3.1. Introducción	103
3.2. Resultados	106
3.2.1. Subunidad I del gen que codifica para la enzima Citocromo	108
3.2.2. Subunidad V del gen que codifica para la enzima NADH	119
3.2.3. Presencia y datación de ADN satélite y cromosomas B en	127
3.3. Discusión	130
<b>ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA Y DEL FLUJO GÉNICO EN</b>	139
4.1. Introducción	141
4.1.1. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs)	141
4.1.2. <i>Allelic Dropout</i>	144
4.2. Resultados	145
4.2.1. Análisis de los ISSRs	145
4.2.1.1. Polimorfismo de los marcadores ISSR	147
4.2.1.2. Análisis de la diversidad genética entre poblaciones	148

4.2.1.3. Análisis de la estructura genética de las poblaciones	152
4.2.1.4. Análisis del aislamiento por distancia	158
4.2.1.5. Análisis molecular de la varianza (AMOVA)	161
4.2.1.6. Relaciones filogenéticas inferidas a partir de una matriz de distancias genéticas	162
4.2.2. Análisis del <i>Allelic Dropout</i>	163
4.2.2.1. Cuantificación del fenómeno Allelic Dropout en adultos	163
4.2.2.2. Análisis de la herencia de los marcadores ISSR	166
4.2.2.3. Análisis con Hickory y Structure eliminando los marcadores	174
4.3. Discusión	179
4.3.1. Evaluación de los marcadores ISSR para estudios genéticos en los genomas de saltamontes	179
4.3.2. Genética de poblaciones en <i>E. plorans</i>	183
4.3.2.1. Variabilidad genética	183
4.3.2.2. Estructura poblacional	184
4.3.2.3. Flujo génico y aislamiento por distancia	185
4.3.3. Distribución geográfica de los cromosomas B	190
<b>INVASIÓN EXPERIMENTAL DEL CROMOSOMA B<sub>2</sub> EN EL GALLEGO</b>	195
5.1. Introducción	197
5.2. Resultados	198
5.2.1. Evolución de la frecuencia del cromosoma B <sub>2</sub> introducido en la población de El Gallego	198
5.2.2. Análisis de la transmisión de los cromosomas B, mediante cruces controlados	200
5.2.3. Seguimiento de la introducción del cromosoma B <sub>2</sub> en El Gallego	201
5.3. Discusión	207
<b>DINÁMICA ESPACIAL Y TEMPORAL DE LA SUSTITUCIÓN ENTRE VARIANTES DE CROMOSOMAS B</b>	213
Causes of B chromosome variant substitution in the grasshopper <i>Eyprepocnemis plorans</i>	215
6.1. Introducción	223
6.2. Resultados	224

6.2.1. Dispersión de la variante B <sub>24</sub> en áreas colindantes a Torrox (Málaga)	224
6.2.2. Análisis de la transmisión de los cromosomas B	232
6.3 Discusión	236
<b>ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES A LOS CROMOSOMAS B</b>	241
7.1. Introducción	243
7.2. Resultados	244
7.2.1. Análisis en adultos	244
7.2.2. Análisis de cruzamientos controlados	246
7.3. Discusión	250
<b>CONCLUSIONES</b>	253
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	261
<b>ANEXOS Y ALINEAMIENTOS</b>	293

## Summary

---





We performed a molecular phylogenetic analysis after sequencing three mitochondrial genome regions, i.e. two regions in the cytochrome oxidase I gene (*COI*) and a region of the NADH dehydrogenase (*ND5*), in 15 populations of *E. plorans plorans* from the Iberian Peninsula, Morocco, Greece and Armenia, and one population of *E. plorans meridionalis* from South Africa. In addition, we included the relative species *E. unicolor*, *Shirakiacris shirakii*, *Heteracris adspersa* and *Heteracris pterosticha*, and *Chorthippus chinensis* and *Locusta migratoria* as outgroups. Our objective was to obtain phylogeographic information in *E. plorans*, as well as uncovering possible colonization routes for this species from Africa (since the *Eyprepocnemis* genus is of African origin). In addition, the inclusion of other Eyprepocnemidinae species can provide some phylogenetic information on the origin of this genus and species.

Our results showed that Eastern (Greece and Armenia) and Western (Spain and Morocco) populations of *E. plorans plorans* diverged about a million to 270,000 years ago. In addition, haplotype networks for *ND5* and *COI* showed that the two subspecies could be derived from a common ancestor, probably living in central Africa, which evolved into *E. plorans meridionalis* towards the south and into *E. plorans plorans* towards the north, but in two separate (Eastern and Western) lineages. It is also remarkable that the number of mutational steps between the hypothetical African common ancestor and each Eastern or Western lineage is about the same as that between the Eastern and Western lineages themselves, suggesting that these populations have had little gene flow since they separated from the common ancestor. This fact is consistent with the differences previously observed for DNA composition between Eastern and Western B chromosomes. We also estimated a maximum age of about three million years for the B chromosome, which is present only in the *E. plorans plorans* subspecies, and four million years for the 180 bp tandem repeat DNA, which is exclusive of the *E. plorans* species.

We also analysed ten *E. plorans plorans* populations from the Iberian Peninsula, for 97 Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. Five populations were collected in coastal localities from the Granada and Málaga provinces, whereas the remaining five populations were collected at the head of the Segura river basin. We first analysed the repeatability and inheritance of these markers to evaluate their validity as population genetics markers. We found a low proportion of markers showing allelic dropout, and this phenomenon explained most segregation distortions observed in controlled crosses. However, when the population genetics analyses were repeated with the 87 ISSR markers less affected by dropout, the results did not differ from those obtained with the 97 markers, thus suggesting that allelic dropout does not produce a significant bias to these results.

The populations analysed showed 100% of polymorphic ISSR loci when all ten populations were considered, and 97% for coastal and 96% for Segura populations. The  $F_{ST}$  value calculated for the ten populations (0.108) indicated significant subdivision among populations, as was also indicated by an AMOVA showing that 17.34% of molecular variation was found among populations. When two regions (coastal and Segura) were defined, the AMOVA showed higher variation between regions (15.27%) than among populations within regions (7.58%). The analysis of population structure, by the software STRUCTURE, showed that the ten populations belong to two genetically differentiated groups, one including the five populations from the coast and the other including the five populations from the Segura river basin. Analyses performed, at lower scale, separately in each region, revealed higher genetic differentiation among the coastal populations than among the Segura populations. The  $N_m$  value estimated from the average  $F_{ST}$  was  $N_m = 2$  for the ten populations, suggesting that gene flow is slightly more intense than genetic drift. At lower scale, however,  $N_m$  values were higher (4 in the coastal and 6 in the Segura regions) suggesting higher rates of gene flow within each region, and very low between regions. This was consistent with the significant isolation by distance (IBD) found among the ten populations. When IBD was tested at each region, we found significant IBD in the coastal populations but not in those of the Segura river basin. In fact,  $N_m$  values between pairs of populations were higher in the the Segura region than in the Granada and Málaga coast. The low  $F_{ST}$  values found among Segura populations could suggest that these populations have recently been colonized from a common ancestor population. The possibility that this could have occurred in association with Pleistocene glaciations is discussed.

To investigate the biological role of B chromosomes in *E. plorans*, we performed an experiment of artificial invasion of a B chromosome in a natural population (El Gallego, Albacete) where B chromosomes had not previously been found. In 1994, fifty males from the Salobreña (Granada) population were released in El Gallego after performing a triple mark-recapture experiment to estimate population size ( $N = 1439$ ). The male sample carried an average of 0.8 B chromosomes per individual (as deduced from previous analyses in the Salobreña population), implying a mean number of Bs equal to 0.03 Bs per individual at experiment start. The most frequent B variant in Salobreña is  $B_2$ , which was the one presumably introduced in El Gallego.

We analysed B frequency at six years between 1996 and 2008, and found that B frequency apparently increased in the 1996 and 1999 samples but decreased from 2000 onwards. The analysis of three controlled crosses involving B-carrying females caught at El Gallego, showed B transmission rates significantly lower than the Mendelian one. In addition, these three females laid egg-pods containing less eggs than those laid by OB females from the same population. All these facts explain

why B frequency has decreased in the last years. The possibility that this could be due to the introduction of A chromosome genes being able to suppress B drive in the donor population, is discussed.

To ascertain whether the males released had effectively crossed to resident females, we analysed 97 ISSR markers in El Gallego, Salobreña and four other populations from the Segura river basin. This indicated the presence of two individuals captured at El Gallego in 2006 showing an ISSR profile from Salobreña.

The B chromosomes found in El Gallego were larger than the  $B_2$  variant from Salobreña and  $B_1$  from other populations (e.g. Calasparra) being close to El Gallego, and showed intermediate characteristics in respect to the relative amount of rDNA and satDNA. This suggests the possibility that interaction with the new host genome has provoked changes in the B implying unequal amplification of these two types of repetitive DNAs. The possibility that these B chromosome changes were promoted by activation of mobile elements is discussed.

In an attempt to uncover the causes why a newly parasitic B chromosome variant (i.e.  $B_{24}$ ) is able to replace the old neutralized variant (i.e.  $B_2$ ), we analysed the B chromosome distribution of these two variants in several populations located towards the east (Nerja, Tetuán and Maro) and the west (Algarrobo) of the Torrox population, which is the place where it is thought that this variant originated. In Algarrobo, we found an average transmission ratio for  $B_{24}$  (0.6) significantly higher than the Mendelian one, but lower than the 0.696 observed in a sample from Torrox collected in 1992 by Zurita et al. (1998). The additional fact that  $B_{24}$  has not reached in Algarrobo frequencies as high as those reported in Torrox (1.5 Bs per individual, on average) suggest that  $B_{24}$  invasion in Algarrobo has been less virulent than in Torrox. This might be due to the joint introduction in Algarrobo of  $B_{24}$  and the suppressor genes against this variant that evolved very fast in Torrox (Perfectti et al. 2004). Our analysis of populations towards the east of Torrox suggest temporal changes in B frequency which are mostly estocastic, although a tendency to increase of  $B_{24}$  frequency was observed in two populations collected at Nerja. Remarkably, the frequency of  $B_{24}$  was higher in Nerja (the closest location to Torrox towards the east) than Tetuan and Maro, suggesting that  $B_{24}$  is currently spreading towards the east.

In looking for DNA sequences being located on B chromosomes, we analysed the possible association of the 97 ISSR markers with B chromosome presence. A total of 12 ISSR markers showed positive association with B presence. Since this association was partial, it is most likely that they are also present in the A chromosomes, as it is logical for B chromosomes arisen intraspecifically, which is the most accepted hypothesis in *E. plorans*. This opens the possibility to analyse microsatellite DNA sequences from B chromosomes, as well as DNA sequences close

to them. This would provide additional markers to investigate the origin and late differentiation of B chromosomes in this species.

# 1. Introducción y Objetivos

---





## 1.1. INTRODUCCIÓN: LOS CROMOSOMAS B

Según el modelo del gen egoísta (Dawkins, 1975), los genomas eucariontes están constituidos por conjuntos de genes que cooperan armónicamente en la construcción de individuos que los transmiten eficientemente, asegurando su mantenimiento evolutivo. Pero, además, los genomas albergan una enorme variedad de elementos genéticos egoístas que procuran su transmisión sin obedecer las leyes mendelianas de la herencia, infringiendo, frecuentemente, efectos deletéreos para el organismo.

Entre estos elementos citaremos los transposones, los distorsionadores de la segregación, diversos factores citoplasmáticos (genomas organulares y endosimbiontes) y los cromosomas B, siendo estos últimos los primeros en ser descubiertos cuando Wilson (1906, 1907) observó la presencia de cromosomas “extra” en el hemíptero *Metapodius*, aunque su naturaleza parasítica no sería reconocida hasta años después (Östergren, 1945).

Los cromosomas B han recibido diferentes nombres desde que fueron descritos, tales como “fragmentos cromosómicos extra” (Müntzig, 1944; Östergren, 1945), “cromosomas superfluos” (Håkansson, 1945), y “cromosomas accesorios” (Håkansson, 1948; Müntzig, 1948), aunque fue Randolph (1928) el primero en emplear el término “cromosoma B” para distinguirlos de los cromosomas A estándar. Fueron inicialmente definidos como “cromosomas no homólogos a los cromosomas del complemento normal (cromosomas A), que no recombinan con ellos y son totalmente dispensables” (Jones & Rees, 1982). En la First B-Chromosome Conference, Camacho, J.P.M. y Parker, J.S. (ver Beukeboom, 1994) los definieron como “cromosomas dispensables y adicionales a los del complemento cromosómico estándar, presentes en algunos individuos de algunas poblaciones en algunas especies, que probablemente provienen de los cromosomas A pero siguen su propio camino evolutivo”. Los cromosomas B presentan frecuentemente comportamientos meióticos y/o mitóticos irregulares que les permiten acumularse en la línea germinal, mostrando así modos de herencia no mendelianos que implican tasas de transmisión superiores a la de los cromosomas normales. Incluyendo esta característica, Jones (1995) definió los cromosomas B como “elementos supernumerarios dispensables que no recombinan con los cromosomas A y que muestran modos irregulares, no mendelianos, de herencia”.

### 1.1.1. TAMAÑO, MORFOLOGÍA, COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD GÉNICA DE LOS CROMOSOMAS B

Se han descrito cromosomas B con una enorme variedad de tamaños y morfologías (según la posición del centrómero). Aunque frecuentemente tienen un

tamaño similar al de algunos cromosomas A, existen excepciones. Por ejemplo, los cromosomas B del ratón *Reithrodontomys megalotis* son mucho más pequeños que sus cromosomas A (Peppers *et al.*, 1997) y los de la mosca *Megaselia scalaris*, se reducen, casi exclusivamente, a un centrómero (Wolf *et al.*, 1991). En el otro extremo, los cromosomas B del roedor *Uromys caudimaculatus* (Baverstock *et al.*, 1982) y los del pez suramericano *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000), son de mayor tamaño que los cromosomas más grandes del complemento estándar. Schmid *et al.* (2006) han descrito el cromosoma B más grande hallado hasta ahora en vertebrados, concretamente en el pez *Alburnus alburnus*, donde el B representa casi el 10% del tamaño del genoma. A veces existe mucha variación en el tamaño y morfología de los cromosomas B dentro de una misma especie, siendo el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* el caso más extremo, con más de 50 variantes descritas (Henriques-Gil *et al.*, 1984; López-León *et al.*, 1993).

Aunque la posición del centrómero puede variar entre los diferentes tipos de Bs, un análisis comparativo de 1166 especies de mamíferos ha demostrado que existe una asociación entre la morfología de los cromosomas A y B dentro de una misma especie (Palestis *et al.*, 2004), de modo que la estructura de los cromosomas B de la mayoría de las especies se asemeja a la de los cromosomas A. Como ejemplos podemos citar a la mayoría de los cromosomas B del saltamontes *E. plorans*, que son acrocéntricos al igual que todos los cromosomas A de esta especie (Henriques-Gil *et al.*, 1984; López-León *et al.*, 1993) o los cromosomas B metacéntricos de *Myrmeleotettix maculatus* (John & Hewitt, 1965), *Omocestus burri* (Santos *et al.*, 1993), *Omocestus bolivari* (Camacho *et al.*, 1981) o *Chorthippus vagans* (Cabrero & Camacho, 1987).

Los cromosomas B presentan un carácter mayoritariamente heterocromático y contienen principalmente ADN repetitivo, lo que sugiere que son elementos genéticamente inertes; esta idea ha sido apoyada por los experimentos realizados con uridina tritidiada, puesto que al inyectársele a organismos vivos, ésta se incorpora a los cromosomas A pero no a los B, sugiriendo de este modo que los cromosomas B son transcripcionalmente inactivos (Fox *et al.*, 1974; Ishak *et al.*, 1991). Por el contrario, existen cromosomas B que muestran actividad transcripcional en el estado plumoso, en la rana *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988), o en el estado politénico, en el mosquito *Simulium juxtacrenobium* (Brockhouse *et al.*, 1989). Además, el gen *or123+*, presente en un neoB en la avispa *Nasonia vitripennis*, provoca el cambio en el color de los ojos (Perfectti y Warren, 2001).

Recientemente, se ha demostrado la presencia de transcritos de ARNr procedentes del B en *Crepis capillaris* (Leach *et al.*, 2005), y también de dos secuencias altamente repetidas y específicas del cromosoma B de *Secale cereale*,

transcripcionalmente activas, que parecen estar implicadas en la transmisión de estos Bs (Langdon *et al.*, 2000; Puertas, 2002; Carchilan *et al.*, 2007). También se ha demostrado la presencia de tres transcritos, específicos del cromosoma B del centeno, pertenecientes a una familia de secuencias altamente repetidas que presenta similitud con elementos móviles (Carchilán *et al.*, 2009) y un elemento derivado de un retrotransposón en el cromosoma B del maíz (Lamb *et al.*, en 2007). Además, se ha descrito actividad en la NOR del cromosoma B del saltamontes *E. plorans* (Teruel *et al.*, 2007, 2009b).

Muchos cromosomas B han mostrado ser portadores de genes para ARN ribosómico (ADNr) 45S, aunque casi siempre están inactivos (Green, 1990; Beukeboom, 1994; Jones, 1995; Camacho, 2005). La presencia del ADNr se ha puesto de manifiesto mediante impregnación argéntica, que detecta las NORs activas, y mediante hibridación *in situ* fluorescente. La aplicación simultánea de las dos técnicas permite averiguar la localización cromosómica de los genes para ARNr, tanto si están activos como si no. Algunos ejemplos de cromosomas B portadores de genes para ARNr se han descrito en especies de plantas como *Allium cernuum* (Friebe, 1989), *Avena sativa* (Dherawattana & Sadanga, 1973), *Hordeum vulgare* (Fröst & Ising, 1964), *Lilium japonicum* (Ogihara, 1968), *Nicotiana sylvestris* (Lespinasse *et al.*, 1987) y *Crepis capillaris* (Leach *et al.*, 2005) y de animales como *Dichroplus pratensis* (Bidau, 1986), *Akodon* aff. *arviculoides* (Yonenaga-Yasuda *et al.*, 1992), *E. plorans* (López-León *et al.*, 1994a), *Apodemus peninsulae* (Boeskorov *et al.*, 1995) y *Rattus rattus* (Stitou *et al.*, 2000).

Los cromosomas B también contienen ADN repetido en tándem que, en algunas especies, como *Nasonia vitripennis* (Nur *et al.*, 1988), es específico del B, pero en otras los ADNs repetitivos se encuentran también en los cromosomas A, como ocurre en *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1994), *Eyprepocnemis plorans* (López-León *et al.*, 1994a) y *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht *et al.*, 1995).

Sólo en los cromosomas B de las especies *Plantago lagopus* (Dhar *et al.*, 2002) y *E. plorans* (Cabrerero *et al.*, 2003b) se ha detectado la presencia de genes ribosómicos 5S; en este último caso existen tres tipos diferentes de secuencias de ADNr 5S, una copia funcional y homogénea, presuntamente localizada en los autosomas, con alguna copia en el cromosoma B<sub>24</sub>, y dos tipos de secuencias degeneradas, una debida a la acumulación de sustituciones y la otra a la presencia de una delección de 10 pb, que se encuentran tanto en el cromosoma X como en B<sub>24</sub> en bajo número de copias (Teruel 2009c).

También se han observado bloques de ADN telomérico en posiciones inusuales en los cromosomas B grandes y pequeños de la especie *Nyctereutes procyonides* (Wuster-Hill *et al.*, 1988) y en los cromosomas submetacéntricos de la rata de agua *Nectomys squamipes* (Silva & Yonenaga-Yassuda, 1998), donde se

localizaban intersticialmente, lo que sugiere que en el origen de estos Bs pueden estar implicadas reordenaciones cromosómicas.

Recientemente se ha demostrado la existencia de genes para las histonas H3 y H4 en los cromosomas B de *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010a). Esta familia de ADN repetitivo ha resultado muy interesante puesto que ha revelado que los Bs de esta especie podrían haber derivado del único cromosoma A que lleva estos genes, es decir, el octavo autosoma en tamaño.

Los genes de copia única suelen ser escasos en los cromosomas B, aunque esto podría deberse a la dificultad de encontrarlos entre la gran cantidad de ADN repetitivo que contienen. La evidencia, en estos casos, proviene de la asociación entre la presencia de cromosomas B y cambios fenotípicos observables, como ocurre con el color de los frutos en *Haplopappus gracilis* o la resistencia a la roya en *Avena sativa*. Sin embargo, en el hongo *Nectria haematococca*, Miao *et al.* (1991a,b) identificaron una familia de genes citocromo P-450 (*Pda*) responsables de la detoxificación de la pisatina, una alexina producida por la planta a la que parasitan (*Pisum sativum*), y que están presentes en un cromosoma supernumerario; posteriormente, Coleman *et al.* (2009) han caracterizado molecularmente tres cromosomas supernumerarios en esta especie observando que están enriquecidos en genes de copia única y duplicados. Además, la presencia de genes únicos en los cromosomas extra parece relacionada con la capacidad de los individuos de ocupar nichos diferentes.

Otro componente importante de los cromosomas B son los elementos transponibles. La naturaleza heterocromática de la mayoría de los cromosomas B constituye un paraíso para los elementos transponibles por dos razones principalmente. La primera de ellas es porque son mejor tolerados en regiones del genoma con baja densidad de genes, puesto que su inserción en un gen suele ser deletérea, y en segundo lugar, porque algunos muestran cierta tendencia a insertarse directamente en la heterocromatina, como ocurre en *Drosophila melanogaster* (Dimitri *et al.*, 1997). La ausencia de recombinación entre As y Bs es quizá la principal causa que favorece la acumulación de los elementos transponibles en los cromosomas B.

La información actualmente disponible acerca de las características citogenéticas y moleculares de los cromosomas B está permitiendo considerar su modificación estructural, mediante ingeniería cromosómica, para su utilización como vectores en biotecnología vegetal, incluso con ciertas ventajas sobre otros vectores cromosómicos como las derivadas de la ausencia de recombinación con los cromosomas estándar o la ausencia de efectos fenotípicos sobre los individuos portadores (Houben & Schubert, 2007).

### 1.1.2. FRECUENCIA DE LOS CROMOSOMAS B

Se ha descrito la presencia de cromosomas B en, aproximadamente, 1300 especies de plantas, casi 500 de animales (veáse Jones & Rees, 1982; Jones & Puertas, 1993; Jones, 1995) y en varias especies de hongos (Mills & McCluskey, 1990; Miao *et al.*, 1991 a,b; Tzeng *et al.*, 1992; Geiser *et al.*, 1996; Leclair *et al.*, 1996), lo que supone una frecuencia cercana al 15% de especies eucariontes portadoras de cromosomas B (Camacho, 2005). Los estudios realizados en plantas sugieren que su distribución entre los grupos de especies no es al azar y que la prevalencia de los cromosomas B muestra asociación con algunas características de los organismos. Por ejemplo, los Bs parasíticos prosperan mejor en las plantas con reproducción cruzada y los Bs heteróticos en aquellas con endogamia (Burt & Trivers, 1998). La presencia de cromosomas B está correlacionada positivamente con el tamaño genómico (Trivers *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 2005) y negativamente con el número de cromosomas A (Trivers *et al.*, 2004). En mamíferos, se ha demostrado, además, que los cromosomas B son más frecuentes en especies con cariotipos compuestos de una mayor proporción de cromosomas acrocéntricos (Palestis *et al.*, 2004). También se ha sugerido, en algún caso, una posible influencia de factores ambientales externos sobre la frecuencia de cromosomas B (Leitão *et al.*, 2009) y, en general, se considera que los cromosomas B parasíticos son más frecuentes en los ambientes más benignos para los organismos hospedadores (Camacho, 2005).

Los cromosomas B son especialmente prevalentes en Gramíneas, Liliáceas y Ortópteros, grupos que presentan una gran facilidad para la obtención de muestras y para su estudio citogenético. Pero la aparición de nuevas técnicas está permitiendo la detección de estos cromosomas en otras especies aparentemente más inaccesibles, como es el caso de los hongos, gracias al desarrollo de la electrorofesis in campo pulsátil (Covert, 1998). Por ello, es posible que los cromosomas B estén presentes en muchas otras especies que aún no han podido ser analizadas. De hecho, en la actualidad, continúan describiéndose por primera vez, en diferentes especies (Laridondo *et al.*, 2009).

El número máximo de cromosomas B encontrados en los individuos adultos de una población determinada depende de diversos factores actuando conjuntamente como son la tolerancia que presenten los portadores a estos cromosomas B, factores demográficos (como, por ejemplo, el número de generaciones desde que los cromosomas B aparecieron en esa población), la acumulación que presenten y factores azarosos como la deriva genética en poblaciones de pequeño tamaño.

El número de Bs en los individuos de una población suele seguir una distribución binomial; los parámetros más utilizados en los análisis de frecuencia de cromosomas B son el número medio de cromosomas B por individuo (media) y la proporción de individuos portadores (prevalencia).

La especie en la que se ha descrito el mayor número de cromosomas B en un mismo individuo, con un total de 50, ha sido la planta *Pachyphytum fittkaui* (Crassulaceae) por Uhl & Moran (1973), aunque existen otros muchos casos de especies con un alto número de cromosomas B por individuo tanto en plantas como animales. Entre las primeras podemos citar el maíz, donde se han encontrado hasta 34 cromosomas B en un individuo, suponiendo un incremento del 155% en el contenido de ADN de su genoma (Jones & Rees, 1982), *Gibasis karwinskyana* (Kenton, 1991) con hasta 31 Bs y *Allium schoenoprasum*, donde se han encontrado individuos con más de 20 cromosomas B (Bougourd *et al.*, 1995). En animales, en el ratón de la madera, *Apodemus peninsulae*, se han encontrado individuos con 24 cromosomas B (Volobujev & Timina, 1980), con 20 en la mosca *Xylota nemorum* (Boyes & Van Brink, 1967), con 16 en el ortóptero *Gonista bicolor* (Sannomiya, 1974) y con 20 en la rana *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988).

En la mayoría de los casos, sin embargo, no suele ser frecuente encontrar más de tres o cuatro cromosomas B por individuo tanto en plantas como en animales, puesto que los cromosomas B son perjudiciales en un alto número (indicando esto que las excepciones anteriores pueden deberse a situaciones de alta acumulación y buena tolerancia a la presencia de Bs, o bien de cromosomas B heteróticos).

### 1.1.3. MECANISMOS DE ACUMULACIÓN

Los cromosomas B presentan un comportamiento mitótico y meiótico irregular que les permite acumularse en la línea germinal (Nur, 1963, 1969), heredándose de forma no mendeliana con tasas de transmisión que exceden la tasa normal para el resto de cromosomas (0.5). Esta mayor tasa de transmisión, denominada acumulación ("drive" en inglés), puede tener lugar antes, durante o después de la meiosis.

Un ejemplo de acumulación premeiótica lo encontramos en *Locusta migratoria*, donde los Bs sufren no disyunción durante las mitosis embrionarias y las células con un alto número de cromosomas B se convierten preferentemente en espermatogonias (Kayano, 1971; Viseras *et al.*, 1990; Pardo *et al.*, 1995).

La acumulación meiótica es muy frecuente y se basa en la asimetría funcional de los productos meióticos, ya que una de las dos células resultantes de cada una de las divisiones meióticas es inviable en la meiosis femenina; como ejemplo, podemos citar el caso del saltamontes *Myrmeleotettix maculatus*, donde los cromosomas B se acumulan durante la meiosis femenina debido a su migración preferencial hacia el oocito secundario en vez de hacia el primer corpúsculo polar (Hewitt, 1976). La base de esta acumulación está en el tamaño de las células resultantes del proceso meiótico, ya que los oocitos suelen ser de un tamaño mayor que los corpúsculos polares, por lo que el polo que da lugar al oocito es de mayor tamaño; el cromosoma B, que por movimientos de polo a polo pasará más tiempo en el polo de mayor tamaño, que dará lugar al oocito, tiene más probabilidad, por tanto, de quedar incluido en éste. También existe acumulación meiótica en machos, como es el caso de *Pseudococcus obscurus* (Nur, 1962) donde el juego cromosómico paterno, heterocromático, degenera, transmitiéndose sólo el de origen materno; los cromosomas B en los machos de esta especie se acumulan durante la meiosis ya que escapan a la heterocromatinización del juego cromosómico paterno y se transmiten junto con el juego cromosómico materno.

Por último, la acumulación postmeiótica es muy frecuente en plantas, donde la formación del grano de polen implica dos divisiones postmeióticas dando lugar al núcleo generativo y al vegetativo; la no disyunción del cromosoma B en esta mitosis y la migración preferencial de las dos cromátidas al núcleo generativo son las responsables de dicha acumulación.

Incluso puede darse el caso de acumulación ameiótica, como ocurre en la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis* (Werren, 1991) donde el cromosoma B (PSR) presente en los espermatozoides, causa la condensación y pérdida de los cromosomas paternos que lo acompañan, transformando el cigoto diploide (hembra), que resulta tras la fecundación, en uno haploide (macho) que porta cromosomas B. De este modo, la tasa de transmisión del cromosoma B se aproxima a uno y, consecuentemente, la aptitud del genoma paterno hospedador queda reducida a cero, considerándose a este cromosoma B como el más parasítico de todos los elementos genéticos conocidos.

En algunos casos, los cromosomas B pueden afectar de forma indirecta a su propia transmisión. En el centeno (*Secale cereale*), Puertas *et al.* (1998) demostraron que los “genes” que controlan la tasa de transmisión de los cromosomas B están localizados en los mismos Bs. Gracias a la realización de cruzamientos controlados entre líneas de alta y baja frecuencia de cromosomas B, estos autores demostraron que, en la descendencia híbrida, el comportamiento meiótico de estos cromosomas dependía de que las madres pertenecieran a la línea de alta o baja frecuencia de Bs (Puertas *et al.*, 1990) y que tales “genes” estarían localizados en los sitios de

formación de quiasmas en los Bs. Recientemente, se han encontrado dos secuencias altamente repetidas y específicas en el cromosoma B de esta especie, E3900 y D1100, transcripcionalmente activas, que parecen estar implicadas en la no-disyunción de estos Bs (Langdon *et al.*, 2000; Puertas, 2002; Carchilan *et al.*, 2007).

En el maíz (*Zea mays*), los cromosomas B pueden acumularse de varios modos: por no-disyunción en la segunda división meiótica, por fecundación preferencial de los óvulos por polen portador de Bs (González-Sánchez *et al.*, 2003), o por segregación eficiente en la meiosis como univalente (Lamb *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008). Mediante estudios de translocaciones entre los As y Bs de esta especie, se han establecido cuatro regiones diferentes en los Bs relacionadas con sus mecanismos de acumulación. La región eucromática distal parece estar implicada en la no-disyunción en la segunda división meiótica (Han *et al.*, 2007), mientras que el bloque de heterocromatina H3 parece estar implicado en la correcta segregación como univalente de los Bs (Lamb *et al.*, 2007). Estos cromosomas B también muestran secuencias de ADN repetitivo específicas, tales como los elementos ZmBs y StarkB. ZmBs podría estar implicada en la función centromérica (Jin *et al.*, 2005), en la no-disyunción (Han *et al.*, 2007) y en la eficiente segregación de los Bs en meiosis (González-Sánchez *et al.*, 2007), mientras que los transcritos de StarkB pueden actuar como factores en *trans* en los mecanismos de acumulación de los Bs (Lamb *et al.*, 2007).

Sin embargo, no todos los cromosomas B muestran acumulación, como es el caso de las plantas *Poa alpina* (Håkansson, 1954), *P. trivialis* (Bosemark, 1957), *Centaurea scabiosa* (Fröst, 1958), *Ranunculus acris* (Fröst, 1969), *A. schoenoprasum* (Bougourd & Parker, 1979) y *Guizotia scabra* (Hiremath & Murthy, 1986). También puede ocurrir que los cromosomas B comiencen su evolución teniendo mecanismos de acumulación pero posteriormente los pierden como consecuencia de su interacción coevolutiva con los cromosomas A. Este hecho se descubrió en el saltamontes *E. plorans*, donde los tres tipos más frecuentes de cromosomas B han perdido su mecanismo de acumulación (López-León *et al.*, 1992a), mientras que algunas de las nuevas variantes surgidas a partir de las anteriores mostraban acumulación (Zurita *et al.*, 1998).

#### 1.1.4. ORIGEN

Los mecanismos exactos por los que puede originarse un “neo B” y alcanzar las características propias de un cromosoma B típico continúan siendo desconocidos. La hipótesis más ampliamente aceptada, hasta ahora, es que los cromosomas B derivan de los As (Jones & Rees, 1982), de manera que podemos considerar a los cromosomas B como un simple subproducto de la evolución del cariotipo estándar,

pudiendo derivar de cromosomas A en polisomía, de fragmentos céntricos resultantes de fusiones céntricas entre cromosomas A, o de la amplificación de regiones paracentroméricas de fragmentos de cromosomas A.

Tanto los estudios citológicos como moleculares realizados hasta el momento indican que la mayoría de los cromosomas B conocidos derivan de los cromosomas A de las especies hospedadoras, como es el caso de *Crepis capillaris*, donde todas las secuencias de ADN repetitivo aisladas por microdissección de los Bs estaban también presentes en los cromosomas A (Jamilena *et al.*, 1994, 1995). No obstante, se han sugerido también otros modos de origen (ver tabla 1 de Camacho *et al.*, 2000).

La aneuploidía es una de las principales fuentes de cromosomas B. En los saltamontes, por ejemplo, se ha demostrado que los cromosomas A en estado polisómico sufren rápidamente heterocromatinización y adquieren una apariencia y comportamiento meióticos que se asemejan a los cromosomas B (Hewitt, 1973a; Peters, 1981; Talavera *et al.*, 1990). Las translocaciones robertsonianas también pueden ser el origen de cromosomas B, por la formación de pequeños fragmentos céntricos durante la fusión de dos cromosomas A acrocéntricos. Es importante citar el caso de los cromosomas sexuales como fuente de cromosomas B, puesto que se toleran fácilmente en estado polisómico (Hewitt, 1973a). Este es el caso de la rana de Nueva Zelanda *Leiopelma hochstetteri*, donde el B parece haber derivado del cromosoma sexual W, como lo sugiere la similitud morfológica (Green *et al.*, 1993) y de secuencias de ADN (Sharbel *et al.*, 1998) entre ambos tipos cromosómicos. En *E. plorans*, el cromosoma B<sub>2</sub> contiene una secuencia de ADN satélite y genes ribosómicos ordenados respecto al centrómero, de forma coincidente con la del cromosoma X, por lo que el análisis citogenético sugirió un origen del B a partir del X (López-León *et al.*, 1994a). En estudios posteriores, Cabrero *et al.* (2003a) observaron que, en poblaciones de este saltamontes procedentes de la Península Ibérica, Marruecos y el Cáucaso, el autosoma S<sub>11</sub> presentaba la misma ordenación de ADN satélite y ribosómico que los cromosomas X y B. En el Cáucaso, sin embargo, el cromosoma S<sub>11</sub> y el B poseían también un cluster de ADNr 5S, que no era visible en el cromosoma X. Estos hechos apuntaban la posibilidad de que el B hubiese podido derivar del S<sub>11</sub>.

En *Locusta migratoria*, la presencia de genes para las histonas H3 y H4 en los cromosomas B, y su presencia exclusiva en el octavo autosoma en tamaño, ha permitido deducir que los Bs se originaron muy probablemente a partir de éste. La comparación de las secuencias de ADN de estos genes entre las copias obtenidas a partir de individuos OB (por tanto procedentes del autosoma 8) y por microdissección del B resultaron ser muy similares, observándose la mayoría de los cambios nucleotídicos en las copias del B. Muchos de estos cambios eran incompatibles con

su actividad génica (codones de paro o sustituciones de aminoácidos modificados epigenéticamente), lo que sugiere la inactividad de los genes para H3 y H4 del B. La comparación de secuencias permitió estimar la edad mínima del B en unos 750.000 años (Teruel *et al.* 2010a). Otros cromosomas B de larga edad son los del maíz, cuya edad mínima se ha estimado en 2 millones de años (Lamb *et al.*, 2007). En contraste, los Bs del saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* tienen una edad inferior a 10.000 años (Hewitt & Ruscoe, 1971).

Alternativamente, los cromosomas B podrían haber derivado de los cromosomas A de especies afines, como resultado de hibridación interespecífica (Battaglia, 1964; Sapre y Deshpande, 1987; McVean, 1995; Schartl *et al.*, 1995). Sapre y Deshpande (1987) aportaron evidencias a favor de esta hipótesis, demostrando el origen espontáneo de cromosomas B en cruces interespecíficos entre *Coix aquaticus* y *C. gigantea*. Pero el caso mejor documentado sobre el origen híbrido de un cromosoma B es el del cromosoma PSR (Paternal Sex Ratio) de la avispa *Nasonia vitripennis*, donde McAllister & Werren (1997) realizaron un análisis filogenético de la secuencia de ADN de un retrotransposón para demostrar que las copias presentes en PSR son más similares a las que hay en especies del género *Trichomalopsis* que a las del propio genoma de *Nasonia*. La formación *de novo* de cromosomas supernumerarios, con características de cromosomas B, se ha observado experimentalmente en cruzamientos controlados en el laboratorio (Sapre & Deshpande, 1987; Shartl *et al.*, 1995; Perfectti & Werren, 2001).

### 1.1.5. EFECTOS

Dado el carácter parasítico de la mayoría de los cromosomas B, y el aumento del tamaño genómico que supone su presencia, es de esperar que se produzcan interacciones con el organismo hospedador y efectos a distintos niveles, habiendo evidencias de que los cromosomas B pueden afectar a multitud de procesos que pueden manifestarse tanto a nivel celular como individual.

El efecto de los cromosomas B raramente se suele detectar a nivel exofenotípico. No obstante, existen excepciones como es el caso de la planta *Haplopappus gracilis*, donde el color de los frutos cambia por la presencia de estos cromosomas (Jackson and Newmart, 1960), del maíz, donde las plantas con B desarrollan hojas rayadas (Staub, 1987), o de la chinche de la harina *Pseudococcus obscurus* y del saltamontes *Camnula pellucida*, en los que la presencia de Bs incrementa la longitud de las tibias (Nur, 1962, 1969, respectivamente). Asimismo, en el saltamontes *Dichroplus elongatus*, los machos portadores de un cromosoma B mitóticamente inestable, son más pequeños y seleccionados negativamente en comparación con los machos que carecen de ellos (Rossetti *et al.*, 2007).

A nivel endofenotípico, la presencia de cromosomas B suele afectar a caracteres asociados al vigor, la fertilidad y la fecundidad de los individuos portadores, como en el caso del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*, donde algunos tipos de cromosomas B provocan un descenso en la fertilidad de los huevos (Camacho, 1997; Muñoz *et al.*, 1998; Zurita *et al.* 1998). Además, Teruel *et al.* (2009a) han comprobado que, en esta especie de saltamontes, la presencia de cromosomas B influye negativamente en el proceso de espermatogénesis de los machos portadores, puesto que aumenta el número de espermátidas anómalas (tanto de micro- como de macroespermátidas). En *Plantago coronopus*, los Bs inducen la esterilidad de las plantas masculinas que los portan (Paliwal and Hyde, 1959) y en el saltamontes *Camnula pellucida*, los individuos con Bs tienen testículos con menos folículos y un espermatozoide anormal con respecto a los individuos no portadores (Nur, 1969). Esta influencia negativa sobre la aptitud de los hospedadores acentúa la naturaleza parasítica de los cromosomas B y se intensifica con el aumento del número de Bs presentes en las células.

Otros efectos endofenotípicos parecen ser atribuibles directamente al producto de los genes que portan los propios cromosomas B, como es el caso de los genes que controlan la resistencia a los hongos en el cromosoma B de *Avena sativa* (Dherawattana & Sadanaga, 1973) o de los genes que confieren la resistencia a la pisatina en los Bs del hongo *Nectria haematococca*, favoreciendo así su patogenicidad (Miao *et al.*, 1991a,b).

A nivel celular debería ser, en teoría, donde los efectos de los cromosomas B fueran más observables. Su presencia fuerza a la maquinaria celular a replicar una mayor cantidad de ADN, lo que conlleva una mayor duración del ciclo celular (Evans *et al.*, 1972), que puede manifestarse a nivel de individuo, como en los insectos *P. affinis* y en *M. maculatus*, donde se enlentece, de forma general, el desarrollo individual (Nur, 1966; Hewitt & East, 1978; Harvey & Hewitt, 1979).

Otros parámetros celulares que se ven afectados por la presencia de Bs son la cantidad de proteínas nucleares y ARN (Kirk & Jones, 1970; Ayonoadu and Rees, 1971). En *E. plorans*, se aprecia una disminución en los niveles de la proteína Hsp70 (la principal proteína de choque térmico implicada en la respuesta a condiciones de estrés) asociada a la presencia de B<sub>24</sub> (la variante más parasítica encontrada hasta ahora en esta especie) en la población de Torrox (Teruel 2010b). Esta disminución podría implicar una disminución de la capacidad de respuesta al estrés por parte de los individuos portadores de cromosomas B. Pero, en esta especie, la presencia de B<sub>24</sub> parece estar asociada también a una disminución en el área nucleolar (Teruel *et al.*, 2007), por lo que la disminución de los niveles de Hsp70 en presencia de B<sub>24</sub> puede tener relación con la disminución del área nucleolar observada en la población de Torrox, puesto que una de las funciones de esta proteína tiene relación

con el ensamblaje y mantenimiento del nucleolo en condiciones adversas (Pelham, 1984; Morcillo *et al.*, 1997) y los nucleolos de menor tamaño requieren menores cantidades de Hsp70 para su mantenimiento. Otros ejemplos de efectos de los cromosomas B a nivel de expresión en genes de los cromosomas A han sido descritos en las plantas *Scilla autumnalis* (Ruiz-Rejón *et al.*, 1980; Oliver *et al.*, 1982), donde la presencia de cromosomas B está asociada a la expresión de un gen para esterasa, y en *Allium schoenoprasum* (Plowman & Bougourd, 1994), donde está afectada la expresión de una proteína del endospermo. Más recientemente, Tanic *et al.* (2005) han demostrado la expresión diferencial, en individuos portadores de cromosomas B del roedor *Apodemus flavicollis*, de tres fragmentos de cDNA: la subunidad 6b (zeta) (CCT6B) de la chaperonina TCP-1, la triada de histidina frágil (FHIT) y un hipotético transcrito del gen XP.

Los cromosomas B también afectan al patrón de actividad de las NORs de los cromosomas A. En *Locusta migratoria*, los Bs ejercen un efecto par-impar sobre los nucleolos en células en fase de diplotene, puesto que el número de nucleolos es significativamente menor cuando los cromosomas B se encuentran en número impar (Camacho *et al.*, 2004). En la población de Torrox del saltamontes *E. plorans* ocurre justo lo contrario, de manera que cuando los Bs se encuentran en número impar, el número de nucleolos, observados en intercinesis, es mayor que cuando aparecen en número par, presentando además, un área nucleolar mayor en fase de leptotene cuando los Bs están presentes en número impar (Teruel *et al.*, 2007). Asimismo, se ha encontrado actividad nucleolar asociada a los cromosomas B en la población de Torrox en un 6.5% de las células en diplotene de los machos analizados (Teruel *et al.*, 2007); cuando la NOR asociada al cromosoma B está activa, contribuye con más del 25% al área nucleolar total de la célula, cuyo valor se mantiene y no difiere entre aquellos machos que expresan la NOR del B y los que no la expresan, lo que sugiere que el área nucleolar total celular es un parámetro estrictamente regulado en esta especie (Teruel *et al.*, 2009b).

Pero sin duda, uno de los efectos observados más frecuentemente a nivel celular es la asociación entre la presencia de cromosomas B y la frecuencia de recombinación de los cromosomas A, medida por el número de quiasmas durante la profase meiótica. La frecuencia de quiasmas suele incrementarse con la presencia de cromosomas B, pero puede tener lugar el efecto contrario, o incluso ningún efecto. Se han propuesto varias hipótesis para explicar este fenómeno; la primera es la “hipótesis adaptativa”, según la cual, cuando la frecuencia de quiasmas incrementa, el resultado es un aumento en la variabilidad genética que permitiría una rápida evolución poblacional (Darlington, 1958; John & Hewitt, 1965; Hewitt & John, 1967), mientras que cuando decrece, se mantendrían las combinaciones adaptativas de genes (Fontana and Vickery, 1973). La segunda es la “hipótesis de los efectos pasivos”, por la que los efectos que se producen sobre los quiasmas no serían más

que una consecuencia inevitable propia de la presencia de ADN extraño (Bell and Burt, 1990). La tercera, la “hipótesis de la recombinación inducible”, propuesta por Bell and Burt (1990), sugiere que el incremento en la frecuencia de quiasmas es estimulado por la presencia de los cromosomas B, como respuesta del genoma hospedador, generándose progenie más variable, alguna de la cual podría ser resistente a la acumulación de los Bs en la línea germinal. Camacho *et al.* (2002), analizaron los efectos de los cromosomas B del saltamontes *E. plorans* en diferentes estados de neutralización (parasíticos, parcialmente neutralizados y neutralizados) y comprobaron que la intensidad del incremento en el número de quiasmas es mayor cuanto mayor es el estado parasítico del B, un resultado que es compatible con la teoría de la recombinación inducible.

La frecuencia de quiasmas también se ve influenciada por el efecto par-impar de los cromosomas B, es decir, dependiendo de que los Bs estén presentes en el núcleo celular en número par o impar. En 1941, Darlington y Upcott observaron que las plantas de maíz con número impar de cromosomas B presentaban un mayor número de quiasmas que las plantas con número par; fueron Jones & Rees en 1967 quienes describieron por primera vez el efecto par-impar en el centeno, puesto que la varianza entre células para el número de quiasmas era significativamente mayor en plantas con número impar de cromosomas B que en aquellas con número par. Pero el efecto par-impar no sólo afecta a la frecuencia de quiasmas. En el saltamontes *Eyprepocnemis plorans* afecta negativamente a la fertilidad del hospedador, de forma que los individuos con número impar de cromosomas B presentan una mayor frecuencia de macro- y microespermátidas que los que portan un número par (Teruel *et al.*, 2009a). Otra prueba más del efecto par-impar fue aportada por Gorlov & Tsurusaki, en el año 2000, cuando analizaron durante dos años consecutivos una población natural japonesa del opilión *Metagagrella tenuipes*, observando que en el período comprendido entre junio y noviembre existía un fuerte descenso en la frecuencia de los individuos que portaban un número par de cromosomas B, efecto que no se producía en los que presentaban un número impar, efecto asociado a una susceptibilidad diferencial a parásitos protozoos.

Sin embargo, y aunque la mayoría de los efectos que provocan los Bs suelen ser perjudiciales, se ha demostrado que algunos Bs pueden tener efectos beneficiosos sobre los portadores cuando están presentes en bajo número. Por ejemplo, en varias especies de plantas, la presencia de Bs se ha asociado con un incremento en el vigor o la velocidad de la germinación (ver la tabla 3.2 de Jones & Rees, 1982). Un caso concreto es el de *Allium schoenoprasum*, donde las semillas que portan cromosomas B sobreviven mejor hasta el estadio de plántula que las que carecen de ellos (Holmes and Bougourd, 1989). Otro cromosoma B beneficioso para los individuos portadores es el del hongo *Nectria haematococca*, ya que el B posee genes que confieren resistencia a la pisatina, un antibiótico producido por la planta

(el guisante) parasitada por este hongo, mejorando así la patogenicidad del hongo (Miao *et al.*, 1991a,b).

### 1.1.6. EVOLUCIÓN

Inicialmente, un cromosoma B debe compartir la suficiente homología en estructura y secuencia con el cromosoma progenitor como para poder aparearse y recombinar con él; pero los neo Bs recién originados deben estar predispuestos de algún modo, a sufrir rápidamente modificaciones estructurales, conformacionales o de comportamiento, fallando así la sinapsis con el cromosoma A progenitor. Esto conduce a su aislamiento meiótico y degeneración por acúmulo de mutaciones mediante procesos análogos al trinquete de Muller (fijación irreversible de mutaciones deletéreas en ausencia de recombinación), lo que, a su vez, haría que se aislara aún más del resto de cromosomas (Green, 1990; Beukeboom, 1994). El resultado es una dinámica continua de diferenciación cromosómica y aislamiento meiótico.

La diferenciación de los cromosomas B consiste frecuentemente en su heterocromatinización. Es concebible que este proceso sea parecido al que se produce en el caso de los cromosomas A extra. Por ejemplo, en los casos de polisomía, descritos en algunas especies de saltamontes (John & Hewitt, 1969; Peters, 1981; Talavera *et al.*, 1990), los cromosomas A adicionales están restringidos a la línea germinal, se generan *de novo* cada generación a partir de no-disyunción de los autosomas, son heteropicnóticos y no se aparean con el cromosoma A del que proceden. Esto indica que existen procesos celulares capaces de heterocromatinizar rápidamente a los autosomas extra, amortiguando así los posibles efectos deletéreos de la presencia de tres (o más) dosis génicas. Esto sugiere que la diferenciación de los neo-Bs puede ser muy rápida. Alternativamente, los Bs originados interespecíficamente estarían, desde el principio, bien diferenciados del genoma que pasa a alojarlos.

Finalmente, en ausencia de apareamiento y recombinación, los nuevos cromosomas B degenerarían y terminarían siendo un acúmulo de ADN repetitivo, ribosómico, transposones y otros elementos genéticos egoístas (Camacho *et al.*, 2000).

Los cromosomas B requieren mecanismos de acumulación desde su mismo origen, a menos que aportaran algún beneficio para los individuos portadores, lo cual sería poco probable para un B de origen intraespecífico por la poca novedad génica que aportaría este.

Se han postulado dos modelos que tratan de explicar el mantenimiento de los cromosomas B en las poblaciones, y ambos asumen que su frecuencia está en equilibrio en las poblaciones actuales, diferenciándose en las fuerzas que consiguen ese equilibrio. Los modelos son:

1. Modelo parasítico (Östergren, 1945; Nur, 1966, 1977) o egoísta (Jones, 1985; Shaw & Hewitt, 1990) según el cual los Bs se mantienen gracias a su mecanismo de acumulación (que afectan positivamente a su frecuencia), a pesar de los efectos deletéreos que provocan en sus portadores (que afectan negativamente a su frecuencia).
2. Modelo heterótico (Darlington, 1958; White, 1973) que sugiere que los Bs carecen de acumulación y se mantienen gracias a un equilibrio entre los efectos beneficiosos que ejercen en los individuos portadores, cuando se encuentran en bajo número, y el perjuicio que les provocan cuando están en número elevado.

La mayoría de los sistemas de cromosomas B estudiados hasta el momento se ajustan al modelo parasítico (ver Camacho *et al.*, 2000). Un buen ejemplo es el caso del cromosoma PSR de la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis*, comentado en apartados anteriores. Pero también se ha demostrado la existencia de Bs que presentan beneficios para los organismos portadores, como es el caso de la resistencia a la roya conferida a la avena, o a la pisatina en *Nectria haematococca*, donde los cromosomas B favorecen a los individuos portadores en las poblaciones afectadas. Pero sólo en *Allium schoenoprasum* se ha analizado la dinámica poblacional de los Bs y los resultados apoyan el modelo heterótico. Estos cromosomas B carecen de acumulación pero las plantas portadoras sobreviven mejor en el hábitat natural que las no portadoras, desde semilla a plántula (Holmes y Bougourd, 1989), puesto que los cromosomas B incrementan la tasa de germinación bajo condiciones de sequía (Plowman & Bougourd, 1994).

En los cromosomas B que no presentan acumulación, su mantenimiento podría explicarse tanto por el modelo heterótico, a semejanza de *A. schoenoprasum*, como por la neutralización de un cromosoma B parasítico. Este último caso se ha demostrado en el saltamontes *E. plorans*, que presenta un sistema polimórfico de cromosomas B con más de 50 tipos diferentes; la variante de B más ampliamente extendida por toda la Península Ibérica y Marruecos es el cromosoma B<sub>1</sub>, a partir del cual han surgido todos los demás. En la provincia de Granada y en el este de Málaga predomina B<sub>2</sub>, en la zona de Fuengirola (Málaga) B<sub>5</sub> y en Torrox (Málaga), B<sub>24</sub>. Los demás tipos son Bs que aparecen de forma esporádica y no son frecuentes en las poblaciones. Mediante cruzamientos controlados en el laboratorio y el análisis de la meiosis en los dos sexos, López-León *et al.* (1992a) concluyeron que tanto B<sub>1</sub>, como B<sub>2</sub> y B<sub>5</sub> carecían de acumulación, ya que mostraban una tasa de transmisión cercana a 0.5. Tampoco observaron efectos significativos sobre la aptitud en las poblaciones

de Jete y Salobreña (1992b). Sobre esta base, Camacho *et al.* (1997) denominaron casi-neutros a estos cromosomas B. Sin embargo, cruzamientos controlados interpoblacionales mostraron la existencia de acumulación de B<sub>2</sub> en ciertas circunstancias, puesto que cuando una hembra portadora de un B se cruzaba con machos OB de su misma población, la tasa de transmisión era cercana a 0.5, pero si eran cruzadas después con machos OB de una población carente de Bs, entonces la hembra mostraba acumulación (Herrera *et al.*, 1996). Esta ausencia de acumulación en las poblaciones con B podría deberse a la existencia de genes supresores de la acumulación (como ya predijo Shaw en 1984), que habrían evolucionado en los As como respuesta a la carga que supone para un genoma albergar material genético que no le aporta ningún beneficio. Otras evidencias de la existencia de genes supresores de la acumulación de los cromosomas B han sido demostradas en el hemíptero *Pseudococcus affinis* (Nur y Brett, 1985, 1987, 1988), el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw y Hewitt, 1985b; Shaw *et al.*, 1985), el centeno (Müntzing, 1954; Romera *et al.*, 1991; Jiménez *et al.*, 1995), la gramínea *Festuca pratensis* (Bosemark, 1954), el maíz (Carlson, 1969; Rosato *et al.*, 1996; González-Sánchez *et al.*, 2003) y *Aegilops speltoides* (Cebriá *et al.*, 1994). Hasta ahora, no se ha conseguido localizar o identificar molecularmente ninguno de estos genes. Su existencia implica una carrera de armamentos entre los cromosomas B y sus hospedadores, en el sentido que predice la hipótesis de la Reina Roja: unos y otros sufren adaptaciones encaminadas a contrarrestarse mutuamente (Van Valen, 1973).

La existencia de acumulación en los Bs de *E. plorans* era un indicio a favor de que, originalmente, los cromosomas B de este saltamontes eran parasíticos, por lo que los Bs que habían sido descritos como casi-neutros son realmente cromosomas B parasíticos que han sido neutralizados por el genoma hospedador.

Mediante estudios de simulación, Camacho *et al.* (1997) demostraron que los Bs casi-neutros no pueden invadir una población, y que no pueden mantenerse indefinidamente en las poblaciones debido al efecto combinado de la deriva genética y la selección contra los individuos portadores de un alto número de Bs, de modo que propusieron el siguiente ciclo de vida de un B casi-neutro que se compone de tres etapas:

1. Invasión, una fase que dura sólo unas decenas de generaciones durante la cual el B muestra acumulación.
2. Supresión de la acumulación, una fase que llevaría decenas o centenas de generaciones, dependiendo del número de genes supresores y del coste en aptitud de la supresión).
3. Pérdida del B por deriva genética y selección contra los individuos portadores de muchos Bs, que llevaría cientos o miles de generaciones.

Pero puede ocurrir que, por mutación, el B casi-neutro se convierta en un nuevo B que sí presente acumulación y que sustituya al casi-neutro, regenerando el polimorfismo y cerrando un ciclo que puede repetirse más veces (figura 1.1).

De cualquier modo, la duración de la vida de un cromosoma B puede llegar a alargarse tanto que llegue incluso a sobrevivir a eventos de especiación, como sugiere la presencia de cromosomas B en especies estrechamente relacionadas, como es el caso descrito por Niwa & Sakamoto (1995), quienes sugirieron un origen monofilético para los cromosomas B de *Secale segetale* y *S. cereale*, basándose en el apareamiento en la meiosis entre Bs procedentes de ambas especies en cruces híbridos interespecíficos. Los resultados recientes, estimando la edad mínima de los Bs del maíz en 2 millones de años (Lamb *et al.* 2007) y de los de *L. migratoria* en 750.000 años (Teruel *et al.*, 2010a), sugieren que los cromosomas B pueden tener una persistencia lo suficientemente larga como para atravesar pasajes evolutivos de divergencia filogenética.

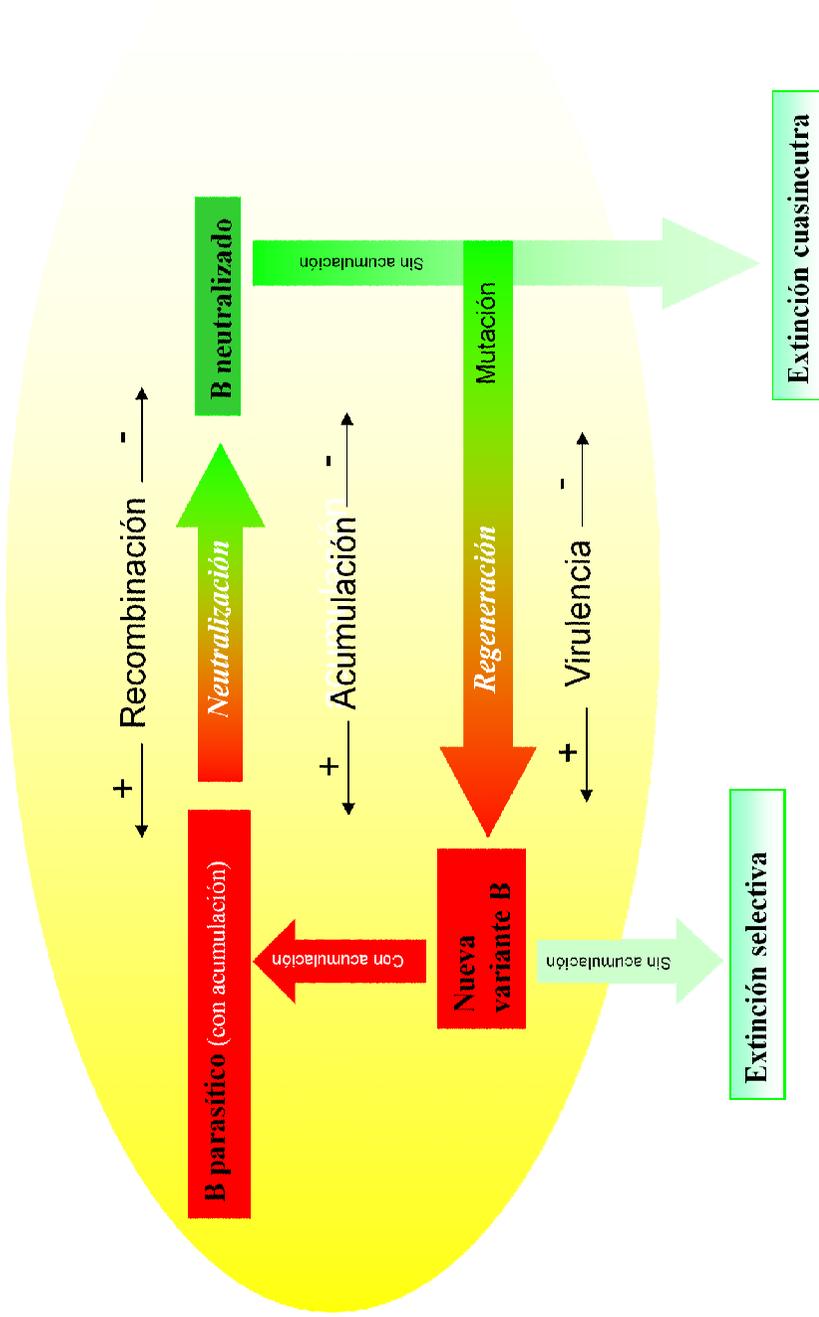


Figura 1.1. Dinámica evolutiva de un cromosoma B parasítico.

## 1.2. OBJETIVOS

1. Averiguar las relaciones filogenéticas entre las subespecies *Eyprepocnemis plorans plorans* y *Eyprepocnemis plorans meridionalis*, así como las de esta especie con otras cuatro especies de la subfamilia Eyprepocnemidinae: *Eyprepocnemis unicolor*, *Heteracris adspersa*, *Heteracris pterosticha* y *Shirakiacris shirakii*.
2. Determinar una edad máxima para el origen del sistema de cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*.
3. Evaluar la idoneidad de los marcadores ISSR para los estudios genéticos de poblaciones de saltamontes.
4. Conocer si la distribución geográfica de los cromosomas B de *E. plorans* en las poblaciones del sur y sureste de la Península Ibérica está relacionada con la variabilidad genética, estructura poblacional y flujo génico observados en dichas poblaciones.
5. Analizar la dinámica de invasión de un cromosoma B introducido artificialmente en una población natural de *E. plorans*, que carecía de dichos cromosomas.
6. Averiguar la dinámica espacial y temporal de la sustitución de la variante B<sub>2</sub> por la variante B<sub>24</sub> en las poblaciones limítrofes a Torrox, donde se originó B<sub>24</sub>.
7. Investigar si el cromosoma B de *Eyprepocnemis plorans* contiene secuencias ISSR específicas.



## 2. Material y métodos

---





## 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Esta Tesis Doctoral se ha centrado principalmente en el sistema de cromosomas B del saltamontes *Eyrepocnemis plorans*, subespecie *plorans* (figura 2.2) pero, para algunos capítulos, hemos utilizado también ejemplares de la subespecie *meridionalis* de *E. plorans*, así como de otras especies pertenecientes a la familia Eyrepocnemidinae (orden Orthoptera). En conjunto, las especies utilizadas han sido *Eyrepocnemis unicolor* y *Eyrepocnemis plorans* (subs. *plorans plorans* y *plorans meridionalis*), *Heteracris adspersa*, *Heteracris pterosticha* y *Shirakiacris shirakii*. A continuación podemos ver la clasificación taxonómica de las distintas especies utilizadas:

Orden Orthoptera

Suborden Caelifera

Superfamilia Acridoidea

Familia Acrididae

Subfamilia Eyrepocnemidinae

Género *Eyrepocnemis*

Especie ***Eyrepocnemis unicolor***

Especie *Eyrepocnemis plorans*

Subespecie ***Eyrepocnemis plorans meridionalis***

Subespecie ***Eyrepocnemis plorans plorans***

Género *Heteracris*

Especie ***Heteracris adspersa***

Especie ***Heteracris pterosticha***

Género *Shirakiacris*

Especie ***Shirakiacris shirakii***

Los especímenes pertenecientes a la subespecie *Eyrepocnemis plorans plorans* han sido capturados en diferentes poblaciones de las provincias españolas de Albacete, Murcia, Granada y Málaga, en la población marroquí de Smir (material cedido por el Dr. Mohamed Bakkali), en la población griega de Variko (material

proporcionado por Dragan Chobanov) y en Hrazdan, en Armenia (material cedido por el Dr. Alexander G. Bugrov). El resto del material, también cedido por el Dr. Alexander G. Bugrov, ha sido recolectado en diferentes localidades rusas: los especímenes de *Eyprepocnemis unicolor* fueron capturados en Tajikistán, cerca de la ciudad de Kurgan-Tube, *Heteracris adspersa* y *Heteracris pterosticha* en Dhagestán, al norte del Caúcaso, cerca de Sulak, y *Shirakiacris shirakii* en Primorskij Kray, cerca de Slavyanka. *Eyprepocnemis plorans meridionalis* fue recolectado en Springbok, Sudáfrica (figura 2.1).

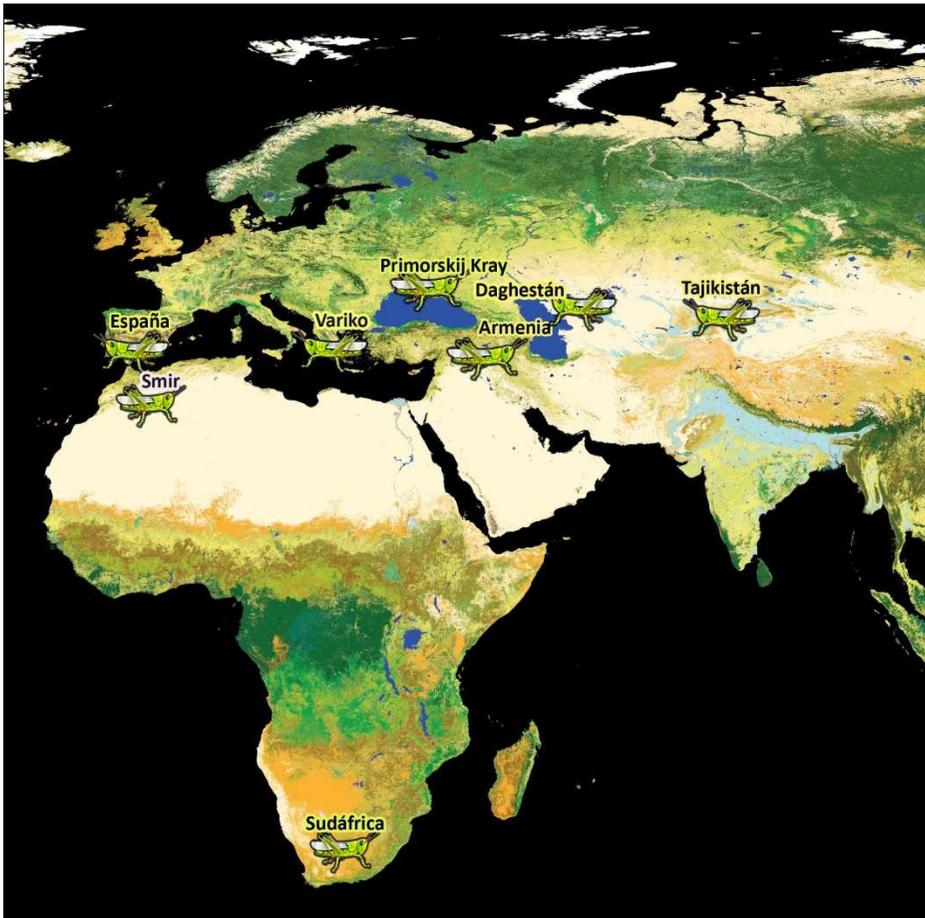


Figura 2.1. Regiones donde ha sido recolectado el material utilizado en esta Tesis Doctoral.

En la Península Ibérica hemos muestreado siete poblaciones de la costa andaluza (figura 2.3) y cinco del interior (figura 2.9). Concretamente, las poblaciones muestreadas han sido:

- Algarrobo, Torrox, Nerja0, Nerja1, Tetuán y Maro, en Málaga (figuras 2.4 - 2.7).
- Salobreña, en la provincia de Granada (figura 2.8).
- Claras, El Gallego, Socovos y Mundo, en la provincia de Albacete (figuras 2.10-2.13).
- Calasparra, en la provincia de Murcia (figura 2.14).

Un resumen del material biológico empleado en la realización de los diferentes experimentos llevados a cabo se presenta en la tabla 2.1.



Figura 2.2. Macho y hembra de *Eyprepocnemis plorans plorans*.

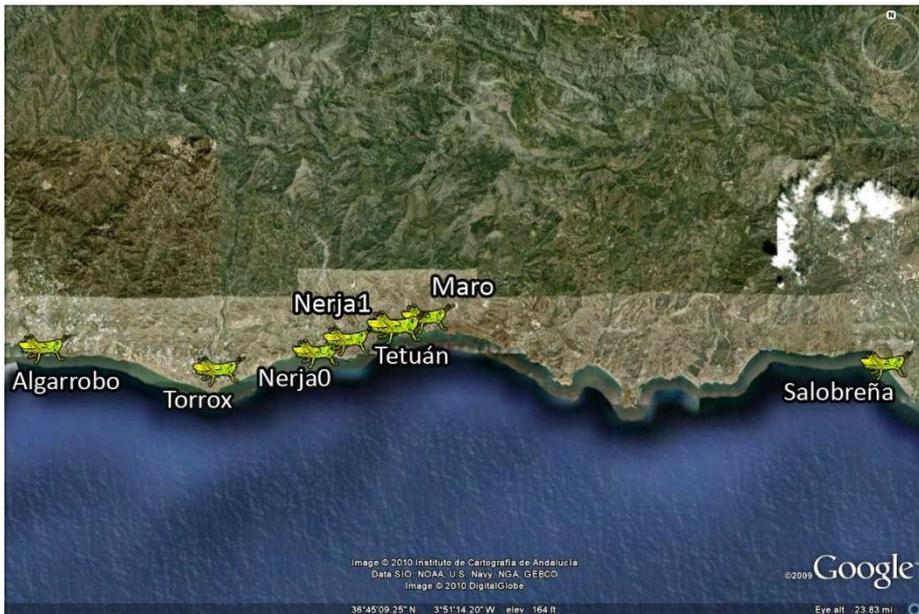


Figura 2.3. Poblaciones muestreadas en la costa andaluza de Málaga y Granada.



Figura 2.4. Vista aérea de la población de Algarrobo en Málaga.



Figura 2.5. Vista aérea de la población de Torrox en Málaga.



Figura 2.6. Vista aérea de las poblaciones de Nerja0 y Nerja1 en Málaga.



Figura 2.7. Vista aérea de las poblaciones de Tetuán y Maro en Málaga.



Figura 2.8. Vista aérea de la población de Salobreña en Granada.

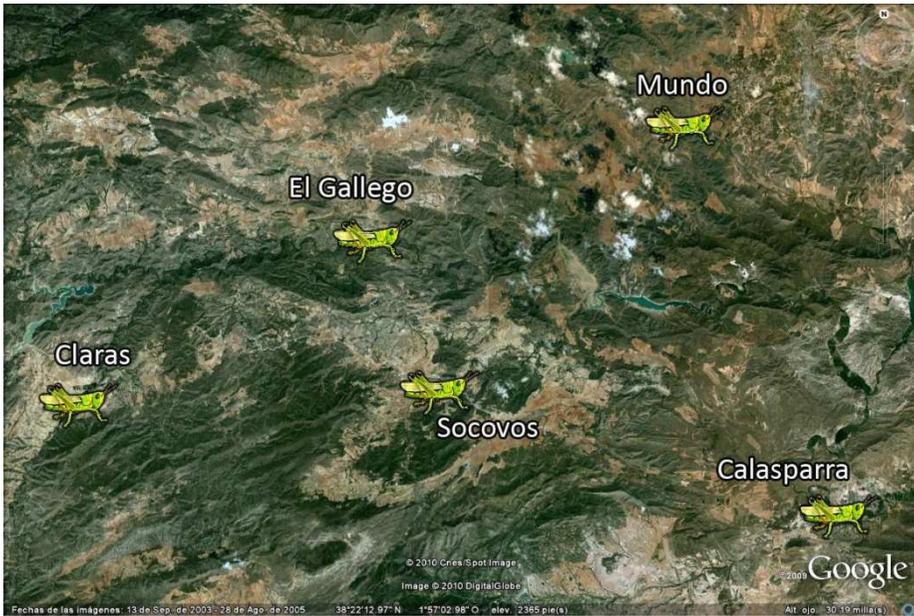


Figura 2.9. Poblaciones muestreadas en la provincia de Albacete.



Figura 2.10. Vista aérea de la población de Claras en Albacete.



Figura 2.11. Vista aérea de la población de El Gallego en Albacete.



Figura 2.12. Vista aérea de la población de Socovos en Albacete.



Figura 2.13. Vista aérea de la población de Mundo en Albacete.

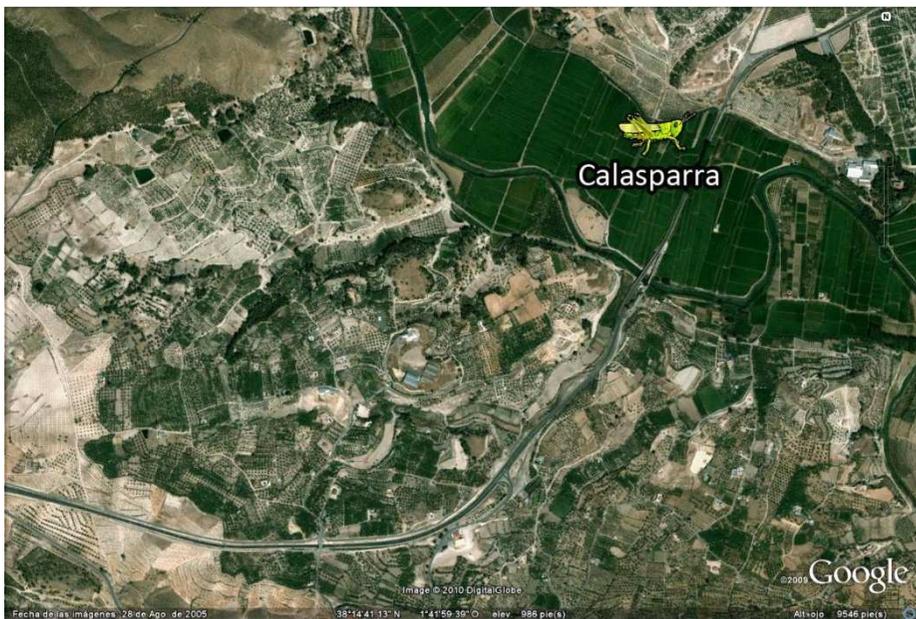


Figura 2.14. Vista aérea de la población de Calasparra en Murcia.

Tabla 2.1 Descripción del material biológico utilizado durante la realización de los diferentes experimentos en esta Tesis Doctoral.

Especie	Población	Año	Sexo	Experimento	
<i>Eyprepocnemis plorans plorans</i>	Algarrobo	2001	21 machos	Cruzamientos controlados	
		2002	43 machos 65 hembras		
		2003	43 machos 34 hembras		
		2004	46 machos 29 hembras		
		2005	34 machos 31 hembras		
		2006	35 machos 61 machos		
	Torrox	2004	45 machos	ISSRs / Filogenia	
	Nerja0	2001	23 machos	ISSRs / Filogenia	
		2004	42 machos 26 hembras		
	Nerja1	2005	5 machos 3 hembras	Cruzamientos controlados	
		2006	44 machos	ISSRs / Filogenia	
		2001	12 machos		
		2004	39 machos 17 hembras	Cruzamientos controlados	
		Tetuán	2006	46 hembras	Filogenia
			2001	28 machos	
	2004		46 machos		
2006	35 machos				

Especie	Población	Año	Sexo	Experimento	
<i>Eyprepocnemis plorans plorans</i>	Maro	2001	27 machos	Filogenia	
		2004	19 machos		
	Salobreña	2006	16 machos	ISSRs / Invasión / Filogenia	
		2004	33 machos		
	Socovos	2006	23 machos	ISSRs / Invasión / Filogenia	
		2006	10 machos		
	El Gallego		1996	5 hembras	Invasión
			1999	50 machos	
			2000	52 machos	
			2000	49 machos	
2002			47 hembras		
2002			101 machos		
<i>Eyprepocnemis plorans meridionalis</i>	Claras	2006	22 hembras	ISSRs / Invasión / Filogenia	
		2006	65 machos		
	Mundo	2008	12 hembras	Invasión	
		2007	80 machos		
	Calasparra	2007	7 machos	ISSRs / Invasión / Filogenia	
		2006	16 machos		
	Variko (Grecia)	2006	34 machos	ISSRs / Invasión / Filogenia	
		2003	10 hembras		
	<i>Eyprepocnemis unicolor</i>	Hrazdan (Armenia)	2003	6 machos	Filogenia
			2003	4 machos	
<i>Heteracris adpersa</i>	Springbok (Sudáfrica)	1987	1 macho	Filogenia	
		1983	3 machos		
<i>Heteracris pterosticha</i>	Tajikistán	1987	1 macho	Filogenia	
		1987	1 macho		
<i>Shirakiacris shirakii</i>	Daghestán	1987	1 macho	Filogenia	
		1982	2 machos		
	Primorskij Kray	1982	2 machos	Filogenia	

La presencia de cromosomas B ha sido determinada en todos los individuos correspondientes a la subespecie *Eyprepocnemis plorans plorans*, capturados en la Península Ibérica, para hacer un seguimiento de la evolución de la frecuencia de cromosomas B en las diferentes poblaciones analizadas (ver capítulo 6).

## 2.2. METODOLOGÍA Y TÉCNICAS EMPLEADAS

Los individuos adultos, capturados en las poblaciones naturales, se fijaron o se cultivaron en el laboratorio en cajas de madera con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura media de 25 °C y una humedad del 30%, siendo alimentados con lechuga iceberg o hierba cortada directamente del campo y agua.

### 2.2.1. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

#### 2.2.1.1. Fijación del material

El procedimiento de fijación fue diferente dependiendo de si se trataba de machos, de hembras o de embriones.

##### ❖ Fijación de los machos

La disección de los individuos se realiza practicando una incisión transversal en la región dorsal del abdomen del macho, por la que se extraen los folículos testiculares que se sumergen inmediatamente en una solución fijadora de etanol:acético en una proporción 3:1. Dos horas más tarde se reemplaza el fijador por una solución nueva con objeto de eliminar todos los restos de grasa asociada inicialmente al testículo. Por otra parte, los cuerpos se envuelven en papel de aluminio, se etiquetan y se introducen en nitrógeno líquido para proceder a su conservación para estudios moleculares. Los folículos testiculares se almacenan a 4 °C hasta su utilización y los cuerpos se mantienen a -80 °C para la posterior extracción del ADN genómico.

##### ❖ Fijación de las hembras

Seis horas antes de la disección de las hembras, inyectamos en su abdomen una solución de colchicina al 2% en solución salina. Transcurrido este período de tiempo, abrimos una incisión longitudinal en el abdomen de la hembra. Para dejar a la vista el interior, colocamos a la hembra sobre poliestireno expandido (poliexpán o corcho blanco) y separamos las paredes del abdomen ayudándonos con agujas

entomológicas; usando una lupa binocular, localizamos las ovariolas y las llevamos a una solución de etanol:acético en una proporción 3:1. Dos horas más tarde procedemos a renovar el fijador de las ovariolas por una solución fresca. Las ovariolas fijadas se conservaron a 4 °C hasta su uso y los cuerpos se congelan a -80 °C para preservar su ADN.

### ❖ Fijación de embriones

Realizamos la fijación de los embriones según el protocolo descrito por López-León *et al.* (1991) pero con algunas modificaciones.

Tras recoger las puestas de huevos de las hembras grávidas, éstas fueron incubadas en una estufa a 27 °C en placas de Petri con vermiculita húmeda para permitir el desarrollo embrionario durante un periodo de 10 a 14 días, tras los cuales eran fijados para su estudio citogenético. Para ello, diseccionábamos la puesta, separábamos los huevos y los introducíamos en una placa de Petri llena de solución salina.

Algunos embriones se fijaron completos para su estudio citogenético (opción 1), pero otros fueron fijados en parte y, el resto, congelado para estudios moleculares (opción 2).

En la opción 1 utilizamos las puestas incubadas durante 10 días y, una vez extraídos todos los embriones de los huevos, los pasamos todos juntos a un pocillo de vidrio con 1 ml de colchicina al 0,1% en solución salina, donde los mantenemos durante 2 horas, con objeto de conseguir un mayor acúmulo de metafases.

En la opción 2 empleamos puestas que fueron incubadas durante 14 días, para que los embriones fuesen de mayor tamaño, lo que facilitaba su manejo y la separación de cuerpo y cabeza. El cuerpo lo pasamos a un tubo de 200 µl que guardamos a -80 °C y la cabeza la colocamos individualmente sobre una gota de 20 µl de colchicina al 0,1% donde permanecía 2 horas (reponiendo la solución periódicamente para evitar que se secase).

Transcurrido el tratamiento con colchicina, el procedimiento fue el siguiente:

- En la opción 1, se añade 1 ml de agua destilada al pocillo donde habíamos depositado todos los embriones.
- En la opción 2, añadimos 20 µl de agua destilada sobre cada una de las gotas de colchicina que alberga a cada cabeza.

El agua destilada añadida a la colchicina provoca un choque osmótico en las células del embrión, facilitando la eliminación del citoplasma y la separación de los cromosomas. La duración del choque osmótico, que suele ser de entre 10 y 20 minutos, tiene que estar controlada ya que, si nos pasamos, podemos provocar la separación de las cromátidas hermanas e incluso la rotura de las células, dificultando la posterior observación al microscopio. Transcurrido este período, los embriones que han permanecido en un pocillo (opción 1) son transferidos, todos juntos, a un tubo de 5 ml con una solución de etanol:acético (3:1) y las cabezas (opción 2) son transferidas, de forma individual, a tubos de 200  $\mu$ l, también con etanol:acético (3:1). Este material lo mantendremos a 4 °C hasta su estudio citológico.

Durante el proceso de fijación de los embriones se anotan tanto el número de huevos de la puesta como el número de embriones obtenidos, para posteriormente hacer estudios de fertilidad de las hembras.

### 2.2.1.2. Obtención de las preparaciones

#### ❖ Preparaciones de folículos testiculares o de ovariolas

##### ➤ Con ácido acético al 50%

Preparamos ácido acético al 50% y colocamos una gotita sobre un portaobjetos, donde depositamos dos o tres folículos testiculares u ovariolas. A continuación, con un macerador plano, golpearemos hasta disgregar el material y colocaremos un cubreobjetos sobre el material machacado. Con un papel de filtro y ayudándonos de una lanceta, eliminaremos las burbujas de aire que se hayan formado entre porta- y cubreobjetos y el exceso de fijador. Después presionaremos sobre el cubreobjetos con varios trozos de papel de filtro para conseguir obtener los cromosomas en un único plano y que no nos aparezcan superpuestos al microscopio. Las dejaremos secar durante unos 10 minutos y pasado este tiempo, las introduciremos en nitrógeno líquido para que el material se quede adherido al portaobjetos; con ayuda de una cuchilla quitaremos el cubreobjetos y las dejaremos secar colocadas en un coplin.

##### ➤ Con orceína acética al 2%

Procedemos como en el caso anterior, pero hacemos la preparación sobre una gota de orceína acética al 2% en vez de sobre la de ácido acético al 50% y, sin separar el cubreobjetos, observamos la preparación al microscopio.

### ❖ Preparaciones de embriones

Las preparaciones de embriones se realizaron según la técnica de Meredith (1969). Ayudándonos con una lanceta, cogemos un embrión y lo depositamos en un tubo de ensayo de fondo cónico donde añadimos 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético al 75%. Pipeteamos varias veces para conseguir disgregar completamente el embrión y, a continuación, recogemos con la pipeta los 20  $\mu\text{l}$  de material disgregado y, sobre un portaobjetos, que previamente hemos calentado sobre un termoblock a 60  $^{\circ}\text{C}$ , depositamos lentamente el material y lo volvemos a recoger, repitiendo este proceso 8 veces, de manera que cuando hayamos terminado, tendremos 8 gotas de material repartidas por el portaobjetos. Dejamos secar durante unos minutos sobre el termoblock para que el material quede bien adherido. Estas preparaciones pueden guardarse a -20  $^{\circ}\text{C}$ , pero no más de dos días.

### ❖ Frotis de hemolinfa

Realizamos estas preparaciones mediante la técnica descrita por Cabrero *et al.* (2006). Con una aguja estéril, pinchamos al saltamontes en la región ventral a nivel del tercer par de patas, de donde obtendremos una gotita de hemolinfa que depositaremos en la mitad superior de un portaobjetos. Ayudándonos con otro portaobjetos, extendemos la gota a lo largo de todo el portaobjetos y dejamos secar unos minutos. Una vez seca, cubrimos toda la superficie de la preparación con etanol:acético (3:1) y la mantenemos en posición horizontal durante 10 minutos. Para terminar, lavamos la preparación con agua destilada abundantemente y la dejamos secar, manteniéndola a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.1.3. Bando C

La técnica del bando C (Santos & Giráldez, 1978) permite poner de manifiesto la presencia y localización de la heterocromatina constitutiva en los cromosomas, por lo que resulta muy útil para caracterizar los tipos de cromosomas B de cada individuo. Partimos de preparaciones de adultos hechas con ácido acético al 50% o de preparaciones de embriones realizadas según la técnica de Meredith (1969), anteriormente descrita. El procedimiento es el siguiente:

1. Colocamos las preparaciones en un coplin con ácido clorhídrico al 2%, a 28  $^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. Finalizado este tiempo, se lavan abundantemente con agua.

2. Las pasamos a otro coplin que contiene una solución saturada de hidróxido bórico al 5% (5 g de Ba(OH)<sub>2</sub> en 100 ml de agua), a 28 °C, durante un tiempo previamente establecido para cada material. A continuación se realizan tres lavados consecutivos: agua, ácido clorhídrico y agua nuevamente.
3. Una vez realizados los lavados, las introducimos en otro coplin que contiene una solución de 2x SSC, a 60 °C, durante una hora, tras lo que las volvemos a lavar abundantemente con agua.
4. Procedemos a su tinción con Giemsa diluida al 5% en tampón fosfato. El tiempo de tinción depende del material y se calcula para cada bandejo empleando inicialmente dos o tres preparaciones. A continuación, las lavamos con abundante agua y las dejamos secar a temperatura ambiente en posición vertical.
5. Para finalizar, montamos las preparaciones con DPX (BDH Laboratory Supplies).

#### 2.2.1.4. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Hemos seguido el protocolo descrito por Cabrero *et al.* (2003c), que describimos a continuación.

##### ❖ Marcaje de la sonda

Para caracterizar los cromosomas B, hemos realizado hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleando dos sondas distintas:

1. rDNA (pTa71 de *Triticum aestivum*, Gerlach & Bedbrook, 1979) marcado con fluorogreen (fluogreen-11-dUTP).
2. ADN satélite (180 pb) de *E. plorans* (López-León *et al.*, 1994a, 1995) marcado con tetrametilrodamina-11-dUTP.

Marcamos la sonda por el método de *nick translation*, según la siguiente reacción:

Reactivo de marcaje	Cantidades
ACG no marcado	5 $\mu$ l
10x NTB	5 $\mu$ l
DTT	1 $\mu$ l
dTTP	1 $\mu$ l
tetrametilrhodamine-11-dUTP / fluorogreen-11-dUTP (ROCHE)	1 $\mu$ l
ADN polimerasa I/ DNAsa I (Invitrogen)	5 $\mu$ l (2.5 U)
ADN muestra	1 $\mu$ g
Agua ultrapura	Completar hasta 50 $\mu$ l

El volumen total de esta reacción se incubó a 15 °C durante 3 horas en un termociclador.

### ❖ Precipitación de la sonda

Finalizado el proceso de marcaje, pasamos todo el volumen de reacción a un tubo de 1.5 ml para precipitarla:

- Para detener la reacción, añadimos 5  $\mu$ l de EDTA 0.5 M, pH 8.0.
- Precipitamos el ADN con 5  $\mu$ l de acetato sódico 3M y 150  $\mu$ l de etanol absoluto frío y lo agitamos enérgicamente. Lo dejamos precipitar a -20 °C hasta el día siguiente.
- Centrifugamos a velocidad máxima (14.000-16.000 rpm) durante 30 minutos a 4 °C y descartamos el sobrenadante.
- Añadimos 150  $\mu$ l de etanol frío al 70%.
- Centrifugamos nuevamente a velocidad máxima durante 30 minutos a 4 °C y descartamos el sobrenadante.
- Dejamos secar la sonda precipitada en oscuridad y resuspendemos en 20  $\mu$ l de TE pH 8,0.
- Conservamos la sonda marcada a -20 °C.

### ❖ Permeabilización del material

Este proceso sólo se lleva a cabo cuando usamos preparaciones de folículos testiculares, con objeto de eliminar el citoplasma y facilitar el acceso de la sonda. Para ello, se incuban las preparaciones con 100  $\mu$ l de pepsina a 50  $\mu$ g/ml en HCl 0,01N en una cámara húmeda, durante unos minutos, hasta la digestión completa del citoplasma, tras lo cual se lavan abundantemente con agua destilada y se dejan secar al aire.

## ❖ Deshidratación y envejecimiento de las preparaciones

Previamente a la reacción de hibridación, las preparaciones se deshidratan en una serie de alcoholes al 70% (3 min.), 90% (5 min.) y 100% (8 min.). Se dejan secar al aire y se envejecen en una estufa a 60 °C durante toda la noche anterior a la hibridación.

## ❖ Reacción de hibridación

La técnica de hibridación *in situ* se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- Añadimos 200 µl de RNasa A (100 µg/ml en 2x SSC) a las preparaciones y las dejamos incubando a 37 °C durante 2 horas; de este modo eliminamos el ARN presente en la preparación para que la reacción de hibridación sea más específica.
- Realizamos tres lavados en agitación con 2x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno.
- Fijamos las preparaciones en paraformaldehído al 4% (w/v) durante 10 minutos y realizamos tres lavados en 2x SSC de cinco minutos cada uno en agitación.
- Deshidratamos con una serie de alcohol etílico al 70%, 90% y 100% introduciendo sucesivamente las preparaciones en cada uno de ellos durante 5 minutos.
- Preparamos la reacción de hibridación del siguiente modo:

Reacción de Hibridación	Cantidades
Formamida	12 µl
Dextrán sulfato 50%	6 µl
20x SSC	1.5 µl
10% SDS	0,5 µl
ADN de esperma de salmón (SS)	1 µl
Sonda	100-250ng
Agua ultrapura	Completar hasta 30 µl

Desnaturalizamos la sonda calentando la reacción de hibridación a 70 °C durante 10 minutos manteniéndola posteriormente en hielo durante 5 minutos.

Finalmente, desnaturalizamos los cromosomas colocando la preparación en un termoblock con humedad a 80 °C, donde le añadimos la mezcla de hibridación. Colocamos un cubreobjetos de parafina sobre la preparación y la mantenemos en el termoblock aproximadamente unos 6-7 minutos. Pasado este tiempo, incubamos las

preparaciones con la mezcla de hibridación en una cámara húmeda con 2x SSC a 37 °C durante toda la noche.

Posteriormente, realizamos un proceso de diferentes lavados en oscuridad para eliminar los restos de sonda que no hayan hibridado y montamos las preparaciones. El procedimiento es el siguiente:

- Se realizan dos lavados a 37 °C en agitación con 2x SSC, y una vez a temperatura ambiente.
- Se procede a la contratinción del material, introduciendo primero las preparaciones en 4x SSC/Tween 20, durante 5 minutos, y tiñiendo luego con 100 µl de DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) a la concentración de 20 µg/ml en tampón McIlvaine pH 7,0, a temperatura ambiente.
- Lavamos ligeramente con 4x SSC/Tween 20.
- Finalmente montamos la preparación con un antifading (Vectashield) y las mantenemos en oscuridad a 4 °C.
- Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio Nikon Optiphot.

### 2.2.2. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE CROMOSOMAS B

Para detectar la presencia de cromosomas B en individuos portadores y determinar de qué tipo de B se trata, el procedimiento que seguimos es el siguiente:

- En los machos, mediante preparaciones de folículos testiculares con orceína acética, detectamos al microscopio la presencia de cromosomas B (figura 2.15) y mediante bandeo C caracterizamos el tipo de B con preparaciones con acético al 50% (figura 2.16).
- En hembras, la detección del cromosoma B se realiza con preparaciones de hemolinfa pero el tratamiento que se les aplica depende de la procedencia de la hembra: las preparaciones de aquellas capturadas en la costa (cuyos Bs son ricos en ADN satélite) son tratadas con bandeo C mientras que las procedentes del interior (con Bs ricos en ADN ribosómico) son tratadas con cromomicina A<sub>3</sub> (Cabrero *et al.*, 2006). La determinación posterior de la variante de cromosoma B se realiza con preparaciones de ovarios con acético al 50% a las que se les aplica bandeo C (figura 2.17).
- En embriones las preparaciones se realizan según la técnica de Meredith (1969) descrita anteriormente a las que posteriormente se les realiza bandeo C.

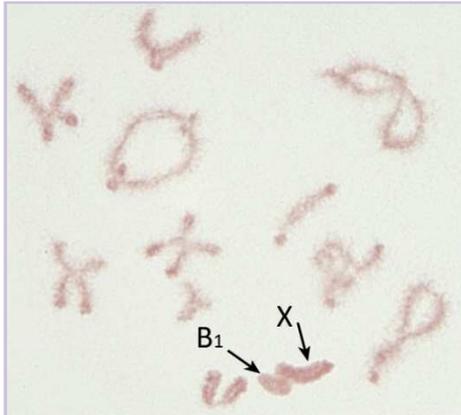


Figura 2.15. Espermatocito primario en diplotene de un macho con un cromosoma B (El Gallego) obtenido mediante aplastamiento de folículos testiculares en orceína acética.

Figura 2.16. Espermatocito primario en diplotene de un macho con un cromosoma B<sub>24</sub> (Torrox, Málaga) obtenido mediante aplastamiento de folículos testiculares en ácido acético y sometido a la técnica de bandeado C.

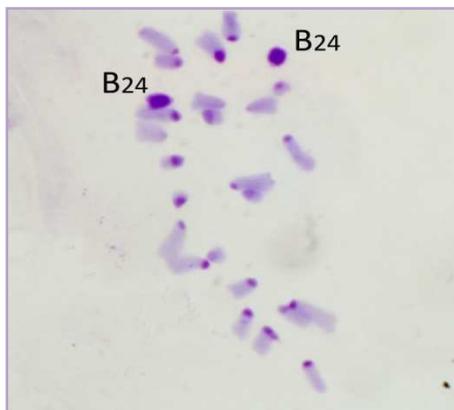


Figura 2.17. Metafase mitótica de una hembra con dos cromosomas B<sub>24</sub> (Torrox, Málaga) obtenido mediante aplastamiento de tejido de las paredes de las ovariolas en ácido acético y sometido a la técnica de bandeado C.

### 2.2.3. TÉCNICAS MOLECULARES

#### 2.2.3.1. Extracción de ADN genómico a partir de cuerpos

Para extraer ADN genómico hemos utilizado el Kit *GenElute® Mammalian Genomic DNA minipreps* de SIGMA (G1N70), siguiendo las recomendaciones del fabricante, aunque introduciendo ligeras variaciones:

##### ❖ Extracción a partir de individuos adultos

- Disgregamos el cuerpo de los individuos (descartando las alas y el abdomen) mediante congelación en nitrógeno líquido y machando el material en un mortero hasta la obtención de un polvo muy fino.
- Añadimos 180 µl de *Lysis Solution T* y 20 µl de Proteinasa K (a una concentración de 20 mg/ml) y agitamos con un *vortex*.
- Incubamos la muestra a 60 °C durante 2 horas y agitamos levemente con el *vortex* periódicamente durante este tiempo.
- Añadimos 20 µl de RNasa e incubamos a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Añadimos 200 µl de la solución *Lysis Solution C* y agitamos con un *vortex*.
- Incubamos la muestra a 70 °C durante 10 minutos.
- Añadimos 200 µl de etanol absoluto y agitamos con un *vortex* durante varios segundos.
- A continuación, equilibramos la columna para el aislamiento del ADN con 500 µl de *Column Preparation Solution*, centrifugando 2 minutos a 12.000 x g y descartando el sobrenadante.
- Transferimos el contenido de nuestra muestra a la columna y centrifugaremos a 6.500 x g durante 2 minutos.
- Lavamos la columna con 500 µl de *Wash Solution* y centrifugamos a 6.500 x g durante 2 minutos, descartando el sobrenadante.
- Realizamos un segundo lavado, añadiendo otros 500 µl de *Wash Solution* y centrifugando esta vez a 12.000 x g durante 3 minutos para eliminar el exceso de etanol.
- Añadimos 100 µl de *Elute Solution* e incubamos durante 5 minutos. Centrifugamos a 6.500 x g durante 1 minuto y guardamos el ADN a -20 °C. Podemos repetir una segunda vez este paso puesto que sigue quedando ADN adherido a la columna, obteniendo una segunda elución algo menos concentrada que la primera.

### ❖ Extracción de ADN de embriones y de folículos testiculares de machos adultos

Depositamos el cuerpo congelado del embrión en un tubo de 1.5 ml y añadimos nitrógeno líquido. Introducimos una aguja de hacer lana en el tubo y machacamos el cuerpo, al que acto seguido añadimos 180 µl de la *solución Lysis Solution T*.

En el caso de folículos testiculares, que están fijados en etanol:acético (3:1), debemos tomar de dos a tres folículos e introducirlos en un tubo de 1.5 ml al que añadimos nitrógeno líquido. Igualmente, machacamos con una aguja de hacer lana el material y añadimos 180 µl de *Lysis Solution T*.

En ambos casos, una vez añadida la *Lysis Solution T*, pipeteamos repetidamente para disgregar el material y adicionamos 20 µl de proteinasa K a 20 mg/ml.

El resto del proceso es el mismo que el indicado para la extracción de ADN de individuos adultos, explicado anteriormente, excepto el último paso, donde añadiremos 50 µl de *Elute Solution* en lugar de 100 µl puesto que la concentración del ADN extraído en el caso de embriones y folículos testiculares es menor que para cuerpos de individuos adultos.

#### 2.2.3.2. Cuantificación de ADN con fluorímetro

Para cuantificar la cantidad de ADN genómico extraído hemos empleado un minifluorímetro TBS-380 de *Turner Biosystems* con miniceldas de vidrio de un volumen de 75-250 µl. Su sensibilidad es de hasta 1 ng/ml de ADN utilizando el colorante *PicoGreen* (*Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit; Molecular Probes, Invitrogen*). El protocolo que debemos seguir para realizar la cuantificación es el siguiente:

- Diluimos 1:1000 las muestras en TE pH 7,4 (1 µl muestra en 999 µl TE).
- Preparamos la solución de trabajo de *PicoGreen*. Para ello diluimos el stock 1:200 en TE (o en el *Buffer B* que trae el kit). Esta solución debe prepararse justo antes de su utilización.

Nº de muestras	Volumen Final (µl)	Dilución de PicoGreen (µl)	TE pH 7,4 o Buffer B
1	50	0.25	49.75
10	500	2.5	497.5
20	1000	5	995

- Preparamos la mezcla que introducimos en la cubeta de vidrio. Debemos incubarla en oscuridad durante 5 minutos antes de hacer la cuantificación:

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Dilución de ADN	2
TE pH 7,4	48
Solución de trabajo de PicoGreen	50
Volumen final	100
Factor de dilución	50

- Se recomienda preparar un control positivo (para ver si la medición es correcta) y negativo (para medir la autofluorescencia). El blanco se prepara de igual manera que las muestras que vamos a cuantificar pero añadiendo agua ultrapura en lugar de la dilución de ADN. Para preparar el control positivo empleamos:

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
ADN patrón	50
Solución de trabajo de picogreen	50
Factor de dilución	50
Concentración final ( $\text{ng/ml}$ )	100

- Para realizar la cuantificación, introducimos la cubeta de vidrio en el fluorímetro y tomamos tres medidas de los resultados. El valor con el que trabajaremos será la media de esos tres valores.
- La media se debe multiplicar por los diferentes factores de dilución que hemos ido acumulando a lo largo de la preparación de las muestras para obtener la concentración en  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

### 2.2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Para cuantificar la cantidad de ADN genómico resultante de una extracción, utilizaremos un gel de agarosa al 1% en 1x TBE (w/v) y para visualizar los productos de PCR emplearemos una concentración mayor, del 1,5%. El tamaño del gel dependerá del tamaño y cantidad de nuestras bandas, preparándose del siguiente modo:

- Calentamos la agarosa en TBE en el microondas hasta su completa disolución y esperamos un par de minutos a que se enfríe.
- Añadimos 3  $\mu\text{l}$  de SYBR *safe DNA gel stain* (Invitrogen) por cada 40 ml de solución y agitamos para homogenizar la mezcla.

Vertemos la agarosa en la bandeja de la cubeta de electroforesis, dejando enfriar hasta su solidificación. La electroforesis en gel de agarosa con TBE 0.5x se realizó con un volumen de entre 2 a 8  $\mu$ l de ADN dependiendo de si se trataba de ADN genómico o producto de PCR y un volumen apropiado de tampón de carga 6x. El marcador de peso molecular utilizado fue *HyperLadder II* (BIOLINE). El voltaje y el tiempo utilizados para la electroforesis dependió del tamaño del gel utilizado. En el caso de minigeles (40 ml) fueron 95 V durante 45 minutos y para geles más grandes (100-150 ml) 110 V durante 3 horas.

#### 2.2.3.4. Visualización de los geles

Los geles fueron visualizados en un transiluminador *Visi-Blue* UVP modelo VB-26 así como en un sistema de documentación de geles de Bio-Rad “Gel Doc XR (170-8170) and ChemiDoc XRS (170-8070, 170-8071)”.

#### 2.2.3.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Mediante PCR hemos amplificado tres fragmentos pertenecientes al genoma mitocondrial de todas las especies empleadas en esta Tesis Doctoral y diferentes marcadores ISSRs del genoma de *E. plorans plorans*.

#### ❖ Secuencias mitocondriales

Hemos amplificado dos fragmentos del gen que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (COI) y un fragmento del gen que codifica para la subunidad V de la enzima NADH-deshidrogenasa (ND5):

- Los dos amplicones correspondientes al gen COI presentan 371 y 307 pb:
  - Amplicón de 371 pb (que denominaremos de ahora en adelante como COI, figura 2.18): hemos empleado los cebadores C1-J-1763 (también llamado UEA3 o Gof, cebador directo) y C1-N-2087 (también llamado UEA4 o Douda, cebador reverso).
  - Amplicón de 307 pb (que denominaremos COI-Leu): amplificado con los cebadores C1-J-2753 (también llamado UEA9 o Steve, cebador directo) y TL2-N-3014 (también llamado UEA10 o Pat, cebador reverso). El cebador TL2-N-3014 ancla en el gen que codifica para el ARN transferente de la Leucina (figura 2.18).

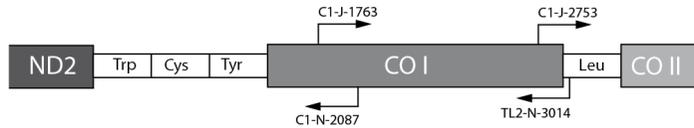


Figura 2.18. Esquema de las regiones amplificadas mediante el uso de las parejas de cebadores C1-J-1763/C1-N-2087 (denominada COI) y C1-J-2753/TL2-N-3014 (denominada COI-Leu).

- El amplicón obtenido a partir de la subunidad V del gen que codifica para la enzima NADH-deshidrogenasa (ND5), de ahora en adelante denominado *Nad5* (figura 2.19), presenta 688 pb y ha sido obtenido con los cebadores N5-J-6578 (o Imelda, directo) y N5-N-7225 (o Ferdinand, reverso).

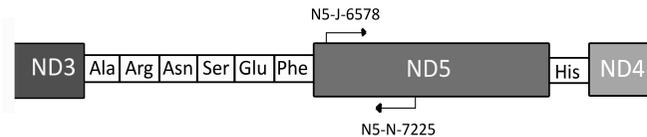


Figura 2.19. Esquema del fragmento amplificado mediante el uso de la pareja de cebadores N5-J-6578 y N5-N-7225 (denominado Nad5).

La secuencia de los cebadores empleados para cada caso es la siguiente:

Secuencia	Cebador	Secuencia de Oligonucleótidos (5' → 3')
COI -371 pb- (Lunt et al. 1996)	C1-J-1763	TATAGCATTCCCACGAATAAATAA
	C1-N-2087	AATTTTCGGTCAGTTAATAATATAG
COI-Leu -307 pb- (Lunt et al. 1996)	C1-J-2753	GTAAACCTAACATTTTTTCTCAACA
	TL2-N-3014	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA
Nad5 (Bensasson et al. 2000)	N5-J-6578	ACTCACCTCAACCAGAATCAA
	N5-N-7225	ACTCATGCTTTATTTAAGGCTTTA

La reacción de PCR para amplificar tanto los dos fragmentos del gen que codifica para COI como el del gen que codifica para ND5 es la siguiente:

Reactivos	Cantidad	Concentración final
Agua miliQ	29,6 $\mu$ l	
10x PCR <i>Buffer</i>	5 $\mu$ l	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l	2 mM
2 mM dNTPs	4 $\mu$ l	160 $\mu$ M
10 $\mu$ M cebador 1	3 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
10 $\mu$ M cebador 2	3 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
MBL-Taq ADN polimerasa (MBL002)	0,4 $\mu$ l	2U
ADN molde (10 ng/ $\mu$ l)	1* $\mu$ l	10ng
<b>Volumen final</b>	<b>50</b>	

\*En el caso ADN extraído de folículos testiculares, añadir 5  $\mu$ l de ADN molde.

Normalmente preparamos una máster mix que incluye las cantidades que aparecen en la tabla anterior de agua ultrapura, *buffer* 10x de PCR, cloruro magnésico, dNTPs, ambos cebadores y Taq polimerasa multiplicadas por el número total de reacciones que se vayan a realizar.

Los programas de PCR utilizados para amplificar las tres secuencias de ADN mitocondrial ha sido los siguientes:

- Para obtener los amplicones COI y COI-Leu:

Nº	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4'
35	95	40''
	<b>48</b>	1'
	72	1'
1	72	7'
1	4	$\infty$

- Para obtener el amplicón Nad5:

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4'
35	94	40''
	<b>52</b>	1'
	72	1'
1	72	7'
1	4	$\infty$

El producto de estas PCRs se observó en un gel pequeño al 1.5% (0.6 g de agarosa en 40 ml de 1x TBE). Estas reacciones de PCR se han llevado a cabo en un termociclador PTC-100 de Biorad.

La secuenciación se ha llevado a cabo en la empresa Macrogen Inc. ([http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen\\_main.jsp](http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp)), a la que se enviaban 20  $\mu\text{l}$  de producto de PCR purificado a una concentración de 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  junto con los cebadores empleados en la amplificación de las secuencias enviadas.

### ❖ Marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)

La secuencia de los seis cebadores empleados es la siguiente:

Cebador	Secuencia de Oligonucleótidos (5'→3')
ISSR-6 (Wolfe <i>et al.</i> 1998b)	(CT)8-RG
ISSR-7 (Culley <i>et al.</i> 2001)	(CTC)4-RC
ISSR-14 (Liu <i>et al.</i> 2006)	(CT)8-RA
ISSR-26 (Yockteng <i>et al.</i> 2003)	(CT)8-AC
ISSR-39 (Fang <i>et al.</i> 1997)	(GA)8-YG
ISSR-43 (Fang <i>et al.</i> 1997)	HVH-(TCC)5

La composición de la reacción de PCR ha sido:

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final
Agua miliQ	13,3	
10x PCR Buffer	2,5	1x
2 mM dNTPs	3	240 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ cebador 1	5	2 $\mu\text{M}$
Taq ADN polimerasa	0,2	1U
ADN molde (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	1	10 $\text{ng}$
<b>Volumen final</b>	<b>25</b>	

El programa utilizado para la amplificación de estos marcadores ISSRs fue el siguiente:

Nº de ciclos	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
1	94	3'
40	94	40''
	57	45''
	72	1.5'
1	72	5'
1	4	$\infty$

Estas reacciones de PCR se han llevado a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler ep Gradient. El producto de PCR ha sido visualizado en geles de agarosa al 1.5% en un sistema de documentación de geles de Bio-Rad "Gel Doc XR (170-8170) and ChemiDoc XRS (170-8070, 170-8071)" y el tamaño de los fragmentos

ha sido determinado empleando el marcador de peso molecular *HyperLadder II* (BIOLINE).

### ❖ **Cuantificación del fenómeno *Allelic Dropout***

Para realizar un seguimiento del porcentaje de *dropout* que presentan nuestras muestras hemos realizado los siguientes controles:

- **Control 1:** en cada PCR se seleccionaban una serie de muestras al azar del total de muestras que se iban a amplificar y se hacía dos réplicas de las mismas, con objeto de analizar la repetibilidad del patrón de bandas amplificadas. Esto implica que estas réplicas llevaban la misma máster mix y se realizaban al mismo tiempo.
- **Control 2:** implica la realización de dos réplicas de una serie de muestras escogidas también al azar, pero esta vez amplificadas en días diferentes. Estas reacciones no tenían la misma máster mix.

### ❖ **Análisis de herencia de los marcadores ISSR**

Hemos analizado el modo de herencia de los marcadores ISSR en una serie de cruzamientos controlados. En este caso, hemos seleccionado los cebadores a partir de los cuales se amplificaban las bandas más claras y nítidas, que fueron los cebadores ISSR6, ISSR7 e ISSR14. Hemos estudiado aquellos cruzamientos para los cuales difería el genotipo de los parentales y analizado el genotipo de la progenie. Puesto que los escasos trabajos publicados sobre transmisión de marcadores ISSR indican que lo hacen de forma mendeliana (Tsumura *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1999; Fang & Rose, 1997), hemos analizado las posibles distorsiones en la segregación de cada uno de los marcadores, y la posibilidad de que estas distorsiones puedan ser explicadas por *dropout*.

#### **2.2.3.6. Purificación del producto de PCR**

Para la purificación del producto de PCR hemos empleado el kit *GenElute™* PCR *Clean-Up* (NA1020) de SIGMA, según el protocolo suministrado por el fabricante.

- Preparamos la columna introduciéndola en un tubo limpio de 2 ml, añadimos 500 µl de *Column Preparation Solution* y centrifugamos a 12.000 x g durante 1 minuto. Descartamos el sobrenadante.

- Añadimos 5 volúmenes de *Binding Solution* a 1 volumen de producto de PCR, agitamos y transferimos la solución al tubo que contiene la columna que hemos preparado en el paso anterior. Centrifugamos a 16.000 x g durante 1 minuto y descartamos el sobrenadante.
- Añadimos 500 µl de *Wash Solution* a la columna y centrifugamos a 16.000 x g durante 1 minuto. Descartamos el sobrenadante y centrifugamos de nuevo durante 2 minutos a 16.000 x g, sin añadir *Wash Solution*, para eliminar el exceso de etanol que haya podido quedar adherido a la columna y descartamos de nuevo el sobrenadante.
- Transferimos la columna a un tubo limpio de 2 ml y añadimos 50 µl de *Elution Solution* (que previamente hemos introducido en una estufa a 60 °C para calentarlo y que actúe con mayor eficiencia). Incubamos a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Para eluir el ADN centrifugamos la columna a 16000 x g durante 1 minuto. El producto de PCR ahora está presente en la elución y listo para usarse. Debemos mantenerlo a -20 °C en caso de que no se vaya a utilizar de inmediato.

## 2.2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES

### 2.2.4.1. Tampones biológicos

#### ❖ Tampón fosfato (pH 6,8)

El tampón fosfato mantiene el pH en torno a 6,8 gracias al equilibrio entre un ácido débil (dihidrógeno fosfato) y su base (monohidrógeno fosfato). Para su preparación, disolvemos en 1 litro de agua destilada:

Reactivo	Cantidad (g)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,61
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4,66

Ajustamos el pH a 6.8.

#### ❖ Tris-HCl

El Tris (tris-[hidroxymethyl]amino-methane) es muy utilizado como tampón para determinadas enzimas y para resuspender ácidos nucleicos. La denominación Tris-HCl no indica que el tampón haya sido preparado con el hidrocloreto de Tris, sino que se ha utilizado HCl para ajustar el pH al valor deseado.

Para preparar Tris-HCl 1M (un litro), disolvemos 121,1 g de Tris-base en agua destilada y ajustamos hasta el pH que necesitemos añadiendo HCl según la tabla siguiente:

pH deseado	Volumen de HCl (ml)
7,4	70
7,6	60
8,0	42

### ❖ TE pH 8.0

Este tampón se emplea para resuspender ADN y oligonucleótidos. Está compuesto por Tris-HCl al pH deseado y EDTA. Para prepararlo, utilizaremos Tris-HCl 1M y EDTA 0.5M. Si deseamos TE a pH 8,0, utilizaremos Tris-HCl a pH 8,0.

Para preparar 50 ml de tampón, a 49,4 ml de agua destilada añadiremos las cantidades de cada reactivo que se muestran en la siguiente tabla:

Reactivo	Concentración del stock	Cantidad (µl)	Concentración final
EDTA, pH 8,0	0,5 M	100	1 mM
Tris-HCl, pH 8,0	1 M	500	10 mM

### ❖ Tampón Mcllvaine pH 7.0 (Mcllvaine, 1921)

Para preparar 200 ml de tampón Mcllvaine, debemos preparar previamente:

- 200 ml de ácido cítrico 100 mM, añadiendo 3,84 g de ácido cítrico a 200 ml de agua destilada.
- 200 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM, añadiendo 5,67 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 200 ml de agua destilada.

Una vez que tenemos estas dos soluciones preparadas, para obtener el tampón Mcllvaine, iremos añadiendo el ácido cítrico que hemos preparado a los 200 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hasta alcanzar el pH 7.0.

### ❖ Tampones de Electroforesis: 5x TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA)

Para preparar un litro, añadimos:

Reactivos	Cantidad
Tris-base	54 g
Ácido bórico	27,5 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	20 ml

Ajustamos el pH a 8,0 con ácido bórico. Diluiremos este stock (5x) a 1x para preparar los geles de agarosa y a 0.5x cuando lo usemos como tampón de electroforesis.

Todas las soluciones utilizadas son finalmente autoclavadas.

#### 2.2.4.2. Fijadores

##### ❖ Etanol: acético (3:1)

Es el fijador por excelencia para preservar la cromatina y visualizar los cromosomas. Es conveniente prepararlo en el momento en que vayamos a utilizarlo; para preparar 100 ml, mezclamos en una probeta:

Reactivos	Cantidad (ml)
Etanol absoluto	75
Ácido acético	25

##### ❖ Paraformaldehído 4% (w/v)

Este fijador es comúnmente empleado en la FISH puesto que preserva la morfología de los cromosomas y facilita la penetración de la sonda. Debemos prepararlo justo antes de su uso del siguiente modo:

- Añadimos 4 g de paraformaldehído a 70 ml de agua destilada.
- Calentamos en una cámara de extracción de gases a 60 °C en agitación.
- Añadimos 500 µl de NaOH 4M para clarificar la solución.
- Dejamos enfriar y enrasamos con agua destilada hasta 100 ml.

### 2.2.4.3. Reactivos

#### ❖ Colchicina

La colchicina es un compuesto antimitótico que inhibe la división celular en metafase o anafase, actuando sobre las proteínas citoesqueléticas del huso mitótico. Lo empleamos previamente a la fijación de ovariolas de hembras adultas y embriones para obtener un mayor número de células en metafase.

En el caso de las ovariolas utilizamos colchicina al 2% y al 0,1% para embriones, en solución salina.

Porcentaje	Cantidad de colchicina (g)	Volumen de solución salina (ml)
2%	2	100
0,1%	0,1	100

#### ❖ EDTA 0,5 M a pH 8,0

El EDTA (ácido etilén-diamino-tetra-acético) es un agente quelante que retiene iones tales como Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, utilizado en multitud de tampones biológicos. En el tampón TE atrapa iones Ca<sup>2+</sup> inactivando las nucleasas que puedan degradar moléculas de ácidos nucleicos.

Para preparar EDTA 0,5 M a pH 8,0, añadimos 181,6 g de EDTA a 800 ml de agua destilada y agitamos. Con la adición de NaOH (aproximadamente unos 20 g) se alcanza el pH correspondiente lo que clarifica la solución. Completamos con agua destilada hasta 1 litro y autoclavamos.

#### ❖ Pepsina

La pepsina es una peptidasa, una enzima digestiva que degrada proteínas a una temperatura óptima de 37 °C. Se emplea en la FISH para eliminar el citoplasma de las células, de forma que la sonda pueda acceder fácilmente a los cromosomas.

La solución de trabajo de pepsina utilizada en la FISH es de 50 µg/ml, obtenida a partir de un stock a 5 mg/ml en 0,01N de HCl.

### ❖ RNasa A, a 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 5 mM NaCl

La RNasa es una nucleasa que cataliza la hidrólisis del ARN. Se aplica a las preparaciones que van a ser tratadas mediante hibridación *in situ* para eliminar el ARN presente.

Para preparar la solución stock de RNasa A, a 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 5 mM NaCl, disolvemos en 10 ml de agua ultrapura,

Reactivos	Cantidad
RNasa	100 mg
1M Tris-HCl pH 7,5	100 $\mu$ l
5M NaCl	30 $\mu$ l

Una vez disuelta la mezcla, la calentamos a 100 °C durante 15 segundos al baño maría para eliminar contaminaciones de DNasa y la dejamos enfriar a temperatura ambiente. En caso de que se haya evaporado agua durante el calentamiento, debemos enrasar a 10 ml y preparar alícuotas de 1 ml que almacenamos a -20 °C. Cada preparación se trata con 200  $\mu$ l de RNasa a 100  $\mu$ g/ml, diluyendo el stock en 2x SSC pH 7,4.

### ❖ Formamida

La N,N-dimetilformamida es un compuesto orgánico empleado como disolvente en reacciones químicas.

Se utiliza en la FISH ayudando a determinar la astringencia de la hibridación puesto que impide la renaturalización del ADN desestabilizando las cadenas.

### ❖ DTT (Dithiothreitol)

El DTT estabiliza la polimerasa empleada en el marcaje con grupos sulfhídricos y se emplea en la FISH a una concentración 1M. Para preparar 200 ml de 1 M DTT, disolvemos 3,02 g de DTT en 200 ml de una solución de acetato sódico 10 mM a pH 5,2 y la esterilizamos por filtración. Hacemos alícuotas de 1 ml que deben mantenerse a -20 °C.

### ❖ Mezcla de nucleótidos no marcados, ACG

La mezcla de nucleótidos no marcados se utiliza para marcar la sonda mediante el método de nick translation. Esta mezcla lleva los nucleótidos adenina, citosina y guanina (ACG). El stock de cada uno de ellos está a una concentración de 100 mM y la solución de trabajo utilizada fue de 200  $\mu$ M.

### ❖ Esperma de salmón

El ADN de esperma de salmón se emplea en la mezcla de hibridación para evitar uniones inespecíficas de la sonda. La concentración de trabajo utilizada es de 50 ng/ml, obtenida a partir de un stock de 100 ng/ml.

### ❖ 10% SDS

El SDS es un detergente que disuelve moléculas hidrofóbicas, por lo que destruye las membranas celulares ayudando a la penetración de la sonda en la FISH, donde se utiliza al 10% y un pH de 7.2.

### ❖ DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole)

El DAPI es un fluorocromo que se une a los surcos menores del ADN en regiones ricas en AT que pertenece al grupo de los colorantes de indol. Se utiliza para la contratinción en tinciones inmunofluorescentes. Se excita dentro del espectro de luz ultravioleta, estando su máximo de absorción en 358 nm y su máximo de emisión en 461 nm. La solución stock es de 0.1 mg/ml en tampón McIlvaine pH 7,0, utilizándose en las tinciones a 20  $\mu$ g/ml.

## 2.2.4.3. Soluciones químicas

### ❖ Ácido acético al 50% y al 70%

Su empleo facilita la adherencia de los cromosomas al portaobjetos, eliminando las proteínas, lo que facilita el acceso al ADN de los cromosomas. Es conveniente utilizarlo recién preparado. Lo empleamos al 50% en agua destilada para las preparaciones de gónadas de adultos y al 70% para las de embriones.

### ❖ Solución salina (pH 7.3)

Disolvemos en 800 ml de agua destilada:

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	7,50
KCl	0,25
CaCl <sub>2</sub>	0,30
NaHCO <sub>3</sub>	0,20

Ajustamos el pH a 7.3 y completamos hasta 1 litro con agua destilada.

### ❖ 2x SSC

Esta solución salina (300mM NaCl, 30mM Citrato Sódico) regula la concentración de iones sodio y controla el pH. Se emplea para realizar lavados en técnicas citogenéticas como bandeo C y FISH; en esta última ayuda a controlar la astringencia de la reacción, facilitando la hibridación de la sonda puesto que a bajas concentraciones de iones Na<sup>+</sup>, desestabiliza la molécula de ADN (Roskams and Rodgers, 2002).

El 2x SSC usado para Bando C se utiliza a pH 6,8 mientras que para FISH se utiliza a pH 7,4. Para preparar un litro de esta solución:

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	17,52
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	8,82

### ❖ 4x SSC/Tween 20

Se emplea como solución de lavado en la FISH. Para su preparación, añadimos 20 ml de 20x SSC y 200 µl de Tween 20 a 80 ml de agua destilada.

### ❖ 5 M NaCl

Disolvemos 292,2 g de NaCl en 800 ml de agua destilada y enrasamos hasta 1 litro. Hacemos alícuotas y autoclavamos la solución.

### ❖ 1N HCl

Para preparar 1N HCl añadimos 86,2 ml de HCl a un litro de agua destilada. A partir de esta solución podemos preparar 0.1N HCl, necesario para diluir la pepsina, añadiendo 4,31 ml de 1N HCl a 500 ml de agua destilada.

### ❖ 10 N NaOH

Para preparar 100 ml de 10 N NaOH, disolvemos 40 g de NaOH en 100 ml de agua destilada. A partir de esta solución 10N preparamos la dilución 4N NaOH que necesitamos para clarificar el paraformaldehído que utilizamos en la técnica de hibridación, mezclando 400  $\mu$ l de 10N NaOH y 600  $\mu$ l de agua destilada, obteniendo un volumen final de 1 ml.

### ❖ 3 M de acetato sódico pH 5,2

Precipita los ácidos nucleicos, por lo que lo empleamos para precipitar la sonda durante el proceso de marcaje.

Para preparar 20 ml, disolvemos 12,30 g de acetato sódico en 18 ml de agua destilada, ajustamos el pH a 5,2 con ácido acético y enrasamos a 20 ml. Posteriormente lo autoclavamos y lo mantenemos a temperatura ambiente.

## 2.2.5. CAPTURA DE IMÁGENES

Las células fueron visualizadas con un microscopio Nikon Optiphot y fotografiadas con una cámara digital refrigerada Olympus DP70.

Para optimizar las imágenes tomadas en cuanto a contraste y brillo hemos utilizado el programa Adobe Photoshop CS2.

## 2.2.6. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Podemos dividir las herramientas informáticas que hemos empleado a lo largo de esta Tesis Doctoral en dos grupos, i) uno destinado al análisis de las secuencias mitocondriales utilizadas para la construcción de la filogenia de *Eyreprocnemidinos* y ii) un segundo grupo destinado al análisis de los datos ISSR.

### 2.2.6.1. Análisis de las secuencias mitocondriales y construcción de la filogenia

#### ❖ GenBank

Genbank es la base de datos de disponibilidad de secuencias de ADN perteneciente al National Institute of Health de Estados Unidos (NIH, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) de la que hemos obtenido las secuencias correspondientes a *Locusta migratoria* (entrada NC\_011119) y *Chortippus parallelus* (entrada NC\_011095), empleadas como outgroups en la construcción de nuestra filogenia de Eyprepocnemidinos.

#### ❖ Blast

Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) es un algoritmo que nos permite realizar un alineamiento local de secuencias de ADN y búsquedas de secuencias homólogas a una secuencia problema (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Un análisis con Blast confirmó que nuestras secuencias mostraban similitud con secuencias mitocondriales de ortópteros pertenecientes al gen que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa y al gen que codifica para la subunidad 5 de la NADH Deshidrogenasa.

#### ❖ BioEdit v7.0.5.3 (Hall TA, 1999)

El programa BioEdit es uno de los editores de secuencias de ADN más empleados. Mediante su uso hemos realizado la edición de todas las secuencias utilizadas en la construcción de la filogenia de Eyprepocnemidinos. Bioedit implementa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), algoritmo que ha sido utilizado para el alineamiento de las secuencias.

#### ❖ Modeltest v3.7 (Posada & Crandall, 1998)

Este programa nos ha permitido determinar el modelo de sustitución nucleotídica al que mejor se ajustan las secuencias de ADN utilizadas para los estudios filogenéticos, eligiendo entre 56 modelos. Requiere el uso de PAUP.

### ❖ MrModeltest v. 2.3

Desarrollado por Johan A. A. Nylander del Departamento de Zoología Sistemática de la Universidad de Uppsala, Suecia (<http://www.abc.se/~nylander/>), este programa es equivalente a Modeltest pero se emplea en el caso en que vayamos a utilizar MrBayes para reconstruir nuestra filogenia.

### ❖ PAUP v4b10 (Swofford, 2003)

PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*), es un programa informático muy utilizado actualmente para inferencia filogenética. Realiza análisis muy potentes de caracteres morfológicos y moleculares y establece árboles bajo diferentes criterios de optimización como son el de máxima parsimonia, máxima verosimilitud, etc, así como métodos de distancia.

Con PAUP hemos construido la filogenia de la subfamilia Eyprepocnemidinae mediante el uso de marcadores mitocondriales bajo el criterio de optimización de parsimonia y máxima verosimilitud.

Además, hemos empleado este programa para realizar dos test diferentes:

- Un **test de homogeneidad** implementado en PAUP v4b10 que analiza la heterogeneidad de diferentes secuencias y que permite, mediante un análisis estadístico, comprobar si las secuencias analizadas son o no homogéneas y si, por tanto, se pueden combinar para realizar un análisis conjunto de las mismas. En nuestro caso analizamos la posibilidad de concatenación de las secuencias COI y COI-Leu.
- Un **test de máxima verosimilitud** empleado para testar si una secuencia sigue o no un reloj molecular. La hipótesis nula  $L_0$  es que la secuencia sigue un reloj molecular, mientras que la alternativa,  $L_1$ , obvia el requisito del reloj. El valor de chi-cuadrado viene dado por  $2\log L = 2(\log L_0 - \log L_1)$ , donde  $L_0$  y  $L_1$  son los valores de probabilidad del árbol según las condiciones de partida. El valor de probabilidad  $p$  se calcula para  $s-2$  grados de libertad, donde  $s$  es el número de ramas terminales o, en su caso, taxones, empleados en la construcción del árbol (Felsenstein, 1981).

### ❖ MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)

MrBayes es un programa para la estimación Bayesiana de filogenias basada en la técnica de simulación llamada *Cadenas de Markov de Monte Carlo*

(MCMC). Hemos empleado MrBayes para reconstruir nuestra filogenia con marcadores mitocondriales de la subfamilia Eyprepocnemidinae.

#### ❖ **BEAST v1.4 (Drummond & Rambaut, 2007)**

BEAST es un programa de análisis molecular de secuencias basado, al igual que MrBayes, en la técnica de simulación MCMC, pero a diferencia de éste, BEAST está orientado específicamente, entre otras funciones, a la datación de las ramas de la filogenia empleando el reloj molecular, aunque puede ser igualmente utilizado como método de reconstrucción filogenético mediante coalescencia.

Su uso requiere la utilización de otros programas incluido en el paquete de BEAST, entre los que cabe destacar i) BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) que construye el fichero de entrada para BEAST, ii) Tracer, que se encarga de chequear el buen funcionamiento de BEAST y la fiabilidad de sus resultados, iii) TreeAnnotator, que genera el árbol consenso a partir de todos los posibles árboles generados con BEAST.

#### ❖ **Mega v4 (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008)**

El programa MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, es una herramienta muy potente que permite realizar alineamientos de secuencias, editarlas, inferir árboles filogenéticos, estimar tasas de evolución molecular y testar hipótesis evolutivas. Hemos empleado este programa para analizar las secuencias obtenidas mediante marcadores mitocondriales de los individuos pertenecientes a la subfamilia Eyprepocnemidinae y reconstruir su filogenia mediante el método de máxima parsimonia.

#### ❖ **PhyML (Guindon & Gascuel, 2003; Guindon *et al.*, 2005)**

Mediante el algoritmo online PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) hemos realizado nuestra filogenia empleando marcadores mitocondriales de la subfamilia Eyprepocnemidinae mediante máxima verosimilitud.

#### ❖ **DNAsp (Librado & Rozas, 2009)**

El DNAsp (*DNA sequence polymorphism*) es un programa diseñado para el análisis de polimorfismo de secuencias nucleotídicas, calculando diferentes parámetros de variación. Hemos empleado DNAsp para establecer el número de

haplotipos para cada una de las tres secuencias que hemos analizado (COI, COI-Leu y Nad5) y nos ha sido de gran utilidad en el cálculo de los siguientes parámetros:

- Composición nucleotídica.
- Determinación de sitios invariables frente a sitios variables (tanto parsimoniosamente informativos como *singleton*).
- Cambios sinónimos y no sinónimos.
- Número efectivo de codones (ENC) e índice de sesgo codónico (CBI).
- Diversidad nucleotídica por sitio ( $\pi$ ) y número medio de sustituciones ( $k$ ).
- D de Tajima o test de neutralidad.

#### ❖ DAMBE (Xia & Xie, 2001)

DAMBE, *Data Analysis in Molecular Biology and Evolution*, es un programa que posibilita, desde editar secuencias, hasta realizar análisis filogenéticos complejos.

Este programa implementa un test que nos ha permitido conocer el índice de saturación de nuestras secuencias de ADN, información necesaria cuando pretendemos realizar inferencias filogenéticas, puesto que la saturación en los niveles de sustitución de las secuencias de ADN implica la pérdida de información filogenética. Altos valores de saturación harían inapropiada a una secuencia para su uso como marcador filogenético.

#### ❖ TSC1.21 (Clement *et al.*, 2000)

Mediante este programa hemos construido la red de haplotipos para Nad5 de las dos subespecies de *Eyrepocnemis plorans*, *E.p. plorans* y *E. p. meridionalis*.

### 2.2.6.2. Análisis de los marcadores ISSR

#### ❖ Hickory v1.1 (Holsinger KE & Lewis PO, 2003)

Este software se emplea para el análisis de estructura geográfica partiendo de datos genéticos procedentes tanto de marcadores dominantes como codominantes.

Con este software hemos obtenido las frecuencias de cada uno de los marcadores ISSR en las poblaciones analizadas y sus F-estadísticos, asociados lo que

nos ha permitido realizar una estima del nivel de diferenciación poblacional existente entre las diez poblaciones de *E. plorans plorans* empleadas en este estudio.

#### ❖ **Structure v2.3.1 (Falush *et al.*, 2007)**

El programa Structure identifica grupos de individuos genéticamente homogéneos dentro de una muestra, asumiendo un modelo en el que hay K poblaciones o grupos, caracterizados por un conjunto de frecuencias alélicas para cada locus. Los individuos de la muestra estudiada se asignan, probabilísticamente, a cada uno de los grupos o a varios de ellos si están mezclados. Para estimar el número de grupos más probable, se utiliza el logaritmo de un valor de probabilidad que este programa asigna a cada uno de los valores de K, y que hemos representado como  $L(K)$ .

Mediante este programa hemos obtenido datos de estructura poblacional utilizando marcadores ISSR y valores de asignación de cada uno de los individuos estudiados a las diferentes poblaciones.

#### ❖ **AFLP-surv (Vekemans *et al.*, 2002)**

Este programa realiza estimas de diversidad genética y estructura genética poblacional de muestras analizadas mediante marcadores dominantes así como cálculos de matrices de distancias genéticas entre poblaciones.

En nuestro caso hemos empleado AFLP-surv para el cálculo de la matriz de distancias genéticas entre las poblaciones analizadas mediante marcadores ISSR.

#### ❖ **Phylip v3.69 (Felsenstein, 1989)**

Phylip es un paquete de programas también muy utilizado en inferencia filogenética. De entre los programas que incluye hemos utilizado Neighbor que implementa el método de Neighbor-Joining para inferir las relaciones filogenéticas entre las poblaciones que hemos analizado mediante marcadores ISSR partiendo de la matriz de distancias genéticas entre ellas.

#### ❖ **Zt-win (Bonnet & Van de Peer, 2002)**

Hemos empleado este programa para analizar la existencia de aislamiento por distancia entre las poblaciones analizadas mediante el test de Mantel.

### ❖ **Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010)**

Con este programa hemos realizado un análisis molecular de la varianza (AMOVA) con los datos ISSR para obtener información sobre la proporción de variación existente dentro de poblaciones y entre poblaciones.

### ❖ **FAMD v1.25 (Schlüter & Harris, 2006)**

Mediante este programa hemos calculado el coeficiente de similitud de DICE entre pares de individuos, obtenido por comparación de los marcadores ISSR presentes (obviando las ausentes).

### ❖ **Statistica v 7.1 (data analysis software system)**

Los análisis estadísticos los hemos realizado con el software Statistica (StatSoft, Inc., 2005).

### ❖ **Odds Ratio Calculator**

El algoritmo online *Odds Ratio Calculator* ha sido empleado para el análisis de la asociación de los cromosomas B con los marcadores ISSR ([www.hutchon.net/ConfidOR.htm](http://www.hutchon.net/ConfidOR.htm)).

## **2.2.7. INTRODUCCIÓN ARTIFICIAL DEL CROMOSOMA B<sub>2</sub> DE SALOBREÑA EN EL GALLEGO (ALBACETE)**

### **2.2.7.1. Estimación del tamaño poblacional en El Gallego**

Mediante captura-marcaje-recaptura, durante los días 30 de septiembre, 1 y 2 de octubre de 1994, Ricardo Gómez (comunicación personal) analizó una extensión de 2000 m<sup>2</sup> correspondiente a la población de El Gallego (Albacete), situada en un campo de cultivo a orillas del río Segura justo por encima del pantano de El Cenajo (figuras 2.9 y 2.11); el tamaño poblacional de saltamontes pertenecientes a la especie *Eyprepocnemis plorans* fue estimado en 1439 individuos antes de la liberación de los especímenes portadores de cromosomas B procedentes de Salobreña. Esta estima se realizó del siguiente modo:

- ❖ Primer día de captura (30 de septiembre): se toma una muestra de  $r_1$  individuos, se marcan y se liberan. En nuestro caso se marcaron 71 machos y 45 hembras.

- ❖ Segundo día (1 de octubre): se capturan  $n_2$  individuos, de los cuales  $m_{2\ 1}$  se marcaron el primer día. Estos individuos  $r_2$ , se vuelven a marcar (independientemente de que ya estuvieran marcados del primer día) y se liberan. El número total de capturas fue de 60 machos y 42 hembras, de los cuales 6 machos y 2 hembras habían sido marcados el primer día.
- ❖ Tercer día (2 de octubre): Se capturan  $n_3$  individuos de los cuales,  $m_{3\ 1}$  llevan la marca de haber sido capturados el primer día y  $m_{3\ 2}$  llevan la de haber sido capturados el segundo día (los individuos que lleven ambas marcas se incluyen en el grupo de los  $m_{3\ 2}$ ). El número total de capturas fue de 65 machos y 44 hembras de los cuales presentaban:
  - Marca del primer día: 6 machos y 2 hembras.
  - Marca del segundo día: 4 machos y 1 hembra.
  - Marca de ambos días: 1 macho.

Antes de comenzar las capturas, se recorría la zona de muestreo durante 15 minutos (sólo durante el segundo y tercer día) con objeto de homogeneizar la población, marcada previamente, con el resto. Durante este paseo previo se hacía saltar y desplazarse a los saltamontes. Posteriormente, se dejaba a la población de 15 a 20 minutos de descanso e inmediatamente comenzaba el muestreo.

En la tabla 2.2 aparece resumido todo el material capturado, marcado y liberado durante los tres días de muestreo.

Tabla 2.2. Resumen del material capturado y marcado durante los tres días de muestreo.

Individuos (♂♂+♀♀)	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día
Capturados		102 ( $n_2$ )	109 ( $n_3$ )
Marcados (día 1)		8 ( $m_{2\ 1}$ )	8 ( $m_{3\ 1}$ )
Marcados (día 2)			6 ( $m_{3\ 2}$ )
Liberados	116 ( $r_1$ )	102 ( $r_2$ )	

Si la proporción de individuos marcados es la misma en la muestra y en la población, entonces:

$$\frac{M_{2\ 1}}{N_2} = \frac{m_{2\ 1}}{n_2}$$

y por tanto,

$$N_2 = \frac{M_{2\ 1} n_2}{m_{2\ 1}}$$

Basándonos en los datos que aparecen en la tabla 2.2, la estima del tamaño poblacional en El Gallego se calcula a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\widehat{M}_{21} = \frac{m_{31}(r_2 + 1)}{(m_{32} + 1)} + m_{21} \rightarrow \widehat{M}_{21} = \frac{8 \times 103}{7} + 8 = 125.714$$

De modo que el tamaño poblacional estimado es de:

$$\widehat{N}_2 = \frac{(n_2 + 1) \widehat{M}_{21}}{(m_{21} + 1)} \rightarrow \widehat{N}_2 = \frac{(102 + 1) 125.714}{(8 + 1)} = 1438.730$$

La tasa de supervivencia:

$$\widehat{\phi}_1 = \frac{\widehat{M}_{21}}{r_1} \rightarrow \widehat{\phi}_1 = \frac{125.714}{116} = 1.084$$

Y la tasa de crecimiento:

$$\widehat{b}_2 = 1 - \left[ \frac{(m_{31} + 1) n_2}{(n_3 + 1) m_{21}} \right] \rightarrow \widehat{b}_2 = 1 - \left[ \frac{(8 + 1) 102}{(109 + 1) 8} \right] = -0.043$$

Puesto que el intervalo de tiempo transcurrido entre el primer y segundo día de muestreo y entre el segundo y tercero (24 horas),

$$\widehat{\phi}_2 = \widehat{\phi}_1 = 1.084$$

$$\widehat{b}_1 = \widehat{b}_2 = -0.043$$

$$\widehat{N}_3 = \frac{\widehat{N}_{21} \widehat{\phi}_2}{1 - \widehat{b}_2} \approx \widehat{N}_2 = 1438.73$$

$$\widehat{N}_1 = \frac{(1 - \widehat{b}_1) \widehat{N}_2}{\widehat{\phi}_1} \approx \widehat{N}_2 \approx 1438.73$$

Finalmente, el error estándar se calcula del siguiente modo:

➤ Para el tamaño poblacional:

$$SE_{N_2} = \sqrt{\hat{N}_2(\hat{N}_2 - n_2) \left\{ \frac{\hat{M}_{21} - m_{21} + r_2}{\hat{M}_{21}} \left( \frac{1}{m_{32}} - \frac{1}{r_2} \right) + \frac{1}{m_{21}} - \frac{1}{n_2} \right\}}$$

$$\downarrow$$

$$SE_{N_2} = \sqrt{1438.73(1438.73 - 102) \left\{ \frac{125.714 - 8 + 102}{125.714} \left( \frac{1}{6} - \frac{1}{102} \right) + \frac{1}{8} - \frac{1}{102} \right\}}$$

$$SE_{N_2} = 865.319$$

➤ Para la tasa de supervivencia:

$$SE_{\hat{\varphi}_1} = \sqrt{\hat{\varphi}_1^2 \left\{ \frac{(\hat{M}_{21} - m_{21})(\hat{M}_{21} - m_{21} + r_2)}{\hat{M}_{21}^2} \left( \frac{1}{m_{32}} - \frac{1}{r_2} \right) + \frac{1}{\hat{M}_{21}} - \frac{1}{r_1} \right\}}$$

$$\downarrow$$

$$SE_{\hat{\varphi}_1} = \sqrt{1.084^2 \left\{ \frac{(125.714 - 8)(125.714 - 8 + 102)}{125.714^2} \left( \frac{1}{6} - \frac{1}{102} \right) + \frac{1}{125.714} - \frac{1}{116} \right\}}$$

$$SE_{\hat{\varphi}_1} = 0.5485$$

Asimismo, hemos realizamos los cálculos anteriores por sexos, para ver la tasa de supervivencia que presentan machos y hembras por separado. Las tablas 2.3 y 2.4 muestran el número de machos y de hembras, respectivamente, capturados, marcados y liberados durante los tres días de muestreo. Los resultados aparecen bajo las tablas.

Tabla 2.3. Resumen de los machos capturados y marcados durante los tres días de muestreo.

Individuos (♂♂)	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día
Capturados		60 ( $n_2$ )	65 ( $n_3$ )
Marcados (día 1)		6 ( $m_{21}$ )	6 ( $m_{31}$ )
Marcados (día 2)			5 ( $m_{32}$ )
Liberados	71 ( $r_1$ )	60 ( $r_2$ )	

$$\hat{M}_{2,1} = 67$$

$$\hat{N}_2 = 583.857$$

$$\hat{\phi}_1 = 0.944$$

$$b_2 = -0.061$$

Tabla 2.4. Resumen de las hembras capturadas y marcadas durante los tres días de muestreo.

Individuos (♀♀)	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día
Capturados		42 ( $n_2$ )	44 ( $n_3$ )
Marcados (día 1)		2 ( $m_{2,1}$ )	2 ( $m_{3,1}$ )
Marcados (día 2)			1 ( $m_{3,2}$ )
Liberados	45 ( $r_1$ )	42 ( $r_2$ )	

$$\hat{M}_{2,1} = 45$$

$$\hat{N}_2 = 645$$

$$\hat{\phi}_1 = 1$$

$$b_2 = -0.4$$

Podemos observar que la tasa de supervivencia es prácticamente la misma tanto para los machos como para las hembras.

La elección de esta población estuvo basada en su aislamiento geográfico en las dos direcciones del río Segura, el pantano de El Cenajo aguas abajo y una zona muy angosta y carente de cultivos laterales aguas arriba.

### 2.2.7.2. Liberación de machos procedentes de Salobreña y seguimiento de la frecuencia de los cromosomas B en El Gallego durante doce años

Posteriormente liberamos 50 machos vivos procedentes de la población de Salobreña (Granada), donde el B predominante es B<sub>2</sub> (Henriques-Gil y Arana, 1990), con una frecuencia que se mantenía bastante estable a lo largo de los años y muy cercana a 0.8 (Camacho *et al.*, 1997). Con estos datos estimamos la frecuencia de B en la población mezclada de 1994, que era aproximadamente de 0.03.

Durante los años 1996, 1999, 2000, 2002, 2006 y 2008 tomamos muestras de la población de El Gallego para realizar un seguimiento de la frecuencia del B introducido, así como de su morfología. Además se realizaron cruzamientos controlados con las muestras procedentes de los años 1999 y 2000.

El estudio de la frecuencia de cromosomas B se llevó a cabo según el apartado 2.2.2. La técnica de tinción con cromomicina de núcleos interfásicos procedentes de hemolinfa (Cabreró *et al.*, 2006) sólo se aplicó en las muestras procedentes del año 2000 puesto que fue entonces cuando la desarrollamos.

Para estudiar la transmisión del cromosoma B a través de las hembras nuestro objetivo era realizar cruzamientos entre hembras 1B y machos 0B, pero ante la imposibilidad de conocer el cariotipo de las hembras vivas con las muestras anteriores al año 2000 (puesto que aún no contábamos con la técnica de tinción con cromomicina de núcleos interfásicos procedentes de hemolinfa), realizamos el siguiente procedimiento: estudiamos el cariotipo de los machos y separamos aquellos que portaban B de los que no portaban. Posteriormente cruzamos ambos grupos de machos con hembras al azar, para establecer líneas de alta frecuencia de Bs (con los machos que portaban Bs) y de baja frecuencia (con aquellos que no portaban). Cuando las  $F_1$  obtenidas a partir de estos cruces alcanzaran la edad adulta, cruzaríamos las hembras procedentes de la línea de alta frecuencia de Bs, en su mayoría portadoras de cromosomas B, con machos estudiados previamente y que fueran 0B, procedentes de la línea de baja frecuencia, y estudiaríamos el cariotipo de su descendencia mediante bandeo C.

Pero no pudimos concluir este plan puesto que existió una alta tasa de mortalidad en la  $F_1$  de ambas líneas y los saltamontes no llegaron a la edad adulta. Es frecuente que exista una alta tasa de mortalidad en el laboratorio de los saltamontes procedentes de Albacete, a diferencia de aquellos que proceden de poblaciones costeras que presentan altas tasas de supervivencia. Por tanto tuvimos que desarrollar una estrategia alternativa que nos permitiese detectar la presencia de cromosomas B en hembras vivas recién capturadas, y una vez que contábamos con ella, optamos por volver a muestrear El Gallego en el año 2000, aunque nuestra idea inicial fuese hacerlo cada 3 años aproximadamente para no alterar mucho la población.

Una vez que estudiamos las hembras vivas correspondientes a la muestra del año 2000, cruzamos aquellas que presentaban cromosomas B (sólo 3 de ellas) con machos 0B, para hacer un seguimiento de la transmisión del B a través de la hembra.

Como control positivo adicional de la introgresión artificial en El Gallego del cromosoma  $B_2$  procedente de Salobreña, hemos empleado dos métodos que han

consistido en: i) el análisis, mediante hibridación *in situ* de cinco individuos al azar en cada muestreo, de la presencia de ADNsat en los autosomas  $S_9$ ,  $S_{10}$  y  $S_{11}$ , dado que estos marcadores sirven para diferenciar las poblaciones de Salobreña y El Gallego (Cabrero *et al.*, 2003a) y ii), el análisis de marcadores ISSR presentes en Salobreña, en El Gallego y en las restantes cuatro poblaciones muestreadas en Albacete (Claras, Socovos, Mundo y Calasparra), para identificar posibles individuos en El Gallego que presenten ascendencia de Salobreña, mediante el software Structure v2.3.1 (Falush *et al.*, 2007).

### **2.2.7.3. Mediciones de las proporciones relativas de ADNsat y ADNr en el cromosoma B de El Gallego y tamaño relativo con respecto al cromosoma X**

Todas las medidas han sido tomadas en imágenes digitales sobre los cromosomas con el programa AutoCad (Empresa desarrolladora Autodesk) midiendo, por una lado, el tamaño del cromosoma B que ocupaba la parte correspondiente a ADN satélite y, por otro, la parte correspondiente a ADN ribosómico, para calcular qué proporción del cromosoma ocupa cada uno de estos dos tipos de ADN. A su vez, hemos medido el tamaño total del cromosoma B y del cromosoma X de la población de El Gallego para calcular la proporción de tamaño relativo de ambos cromosomas.

# Detection of B chromosomes in interphase hemolymph nuclei from living specimens of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*

J. Cabrero M.I. Manrique-Poyato J.P.M. Camacho

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada (Spain)

Manuscript received 17 October 2005; accepted in revised form for publication by M. Schmid, 15 November 2005.

**Abstract.** The two most important evolutionary properties of B chromosomes are their transmission rate (which suggests their selfishness when significantly higher than 0.5) and their net effects on carrier fitness (usually negative for parasitic Bs). The study of transmission rate unavoidably requires the analysis of many controlled crosses in order to accurately measure population average transmission rate. Therefore, getting a marker closely associated to B presence is of crucial importance to alleviate the load of performing many useless crosses between lacking B individuals. After investigating several cytogenetic techniques on several tissues that may be sampled without drastically damaging live specimens of the grasshop-

per *Eyprepocnemis plorans*, we report here the excellent results provided by the CMA<sub>3</sub> fluorescence and C-banding techniques applied to hemocyte nuclei. These cells may be easily obtained from both males and females and provide information on B presence even during the interphase stage. The two cytogenetic techniques take advantage of the heterochromatic nature of the B chromosomes, so that Bs made predominantly of ribosomal DNA are revealed by CMA<sub>3</sub> as bright bodies in the interphase hemocytes, and Bs mostly made of satellite DNA are visualized by C-banding as intensely stained bodies in these cells.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

B chromosomes are extra chromosomes present in about 15% of eukaryotes which, in most cases, behave as parasitic chromosomes whose main role is maintaining themselves through a variety of exploiting mechanisms providing them transmission advantage irrespectively of being harmful for the individuals carrying them (for recent reviews, see Camacho, 2004, 2005). Therefore, one of the most important determinants of B chromosome evolution is transmission rate. The study of this parameter is usually difficult in terms of

material availability (not all species can be easily bred in the lab to perform controlled crosses) and costly in terms of the research effort needed to get a significant number of valid crosses (with data on both parents and a high number of offspring). This explains why transmission rates have been studied in so few B chromosome polymorphisms (see Jones and Rees, 1982; Camacho, 2004, 2005), since they require performing a high number of controlled crosses in order to get the average transmission rate through males and females with different numbers of B chromosomes. Establishing these crosses by blindly choosing pairs usually leads to much useless work (e.g. crosses between 0B males and females). The diagnosis of B number in living specimens prior to the establishment of these pairs can thus hugely alleviate this work, especially when B chromosome frequency is low.

In the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, B chromosome transmission rate through females is non-Mendelian when the B chromosome invades new populations but later it is reduced to Mendelian values (0.5) by the action of suppressor genes

Supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BOS2003-06635) and Plan Andaluz de Investigación (CVI-165).

Request reprints from J.P.M. Camacho

Departamento de Genética, Facultad de Ciencias  
Universidad de Granada, ES-18071 Granada (Spain)  
telephone: +34 958 248925; fax: +34 958 244073  
e-mail: jpmcamac@ugr.es

in the A chromosomes (Camacho et al., 1997; Zurita et al., 1998; Perfectti et al., 2004). These temporal changes in the transmission rate can only be studied through controlled crosses, so that a method is necessary for ascertaining the number of Bs in living individuals to avoid performing useless crosses. To date, we are able to do it in males by extracting a few testis follicles through a small cut in the dorsal abdomen, after which males retained their mating ability. But this technique was not appropriate in females because vivisection dramatically affected survival. In addition, we have failed to find B-specific DNA probes, which might serve this purpose, through microdissection and cloning of B chromosomes (unpublished data). In the present report we show two techniques that are useful for the living diagnosis of B presence in both sexes, both being based on analyzing interphase nuclei obtained from the hemolymph. The possibility to reveal B presence in interphase nuclei stands on the heterochromatic nature of the B chromosomes, which are mainly composed of ribosomal DNA and a 180-bp satDNA, with a high variety of B chromosome types differing in the relative amounts of both DNAs (Cabrero et al., 1999). For Bs where the rDNA predominates, we conclude that the simplest and fastest technique is staining with the CMA<sub>3</sub> fluorochrome, which reveals the rDNA cluster in the B chromosome as the largest one in the genome. For B chromosomes where the satDNA is predominant, C-banding is the simplest and most reliable technique revealing B chromosomes in hemolymph interphase nuclei. The benefits of these techniques are very large in terms of avoidance of performing useless crosses involving OB females.

## Materials and methods

Males and females of the grasshopper *E. plorans* collected at different populations from southern Spain were assayed with several cytological techniques that might be candidates to reveal B chromosome presence in interphase nuclei. Most analyses were however performed on specimens from Albacete and Málaga (Spain), collected at localities where the predominant B chromosomes are especially rich in rDNA (El Gallego) and satDNA (Torrox), respectively.

The tissues examined for the living diagnosis of B presence were those that can be taken off from the specimens without compromising their life and reproductive ability. We performed assays in two tissues, i.e. the femur muscle of a jumping leg, which can be removed without affecting survival or courtship (males in this species do not stridulate), and in a small drop of hemolymph. The femur was dissected and the muscle was immersed in 1:3 acetic-ethanol and stored at 4°C. To get the hemolymph, we punctured, with a fine needle attached to a small syringe, the pleura of the thorax at the basement of the third leg pair, and aspirated a small drop of hemolymph which was spread onto several clean slides. When these preparations were dried, we covered them with 1:3 acetic acid:ethanol for 15 min before performing the different cytological techniques assayed.

Several cytological techniques were chosen because of their ability to reveal heterochromatin: C-banding revealing any kind of heterochromatin, and fluorochrome banding with DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) revealing heterochromatin containing AT-rich DNA and CMA<sub>3</sub> (chromomycin A<sub>3</sub>) revealing heterochromatin containing GC-rich DNA (Schweizer, 1976). These techniques might be appropriate for B chromosomes in *E. plorans* since they are mainly made of heterochromatin containing two repetitive DNAs: ribosomal DNA (rDNA), which is rich in GC pairs, and a 180-bp satDNA, which is rich in AT pairs (López-León

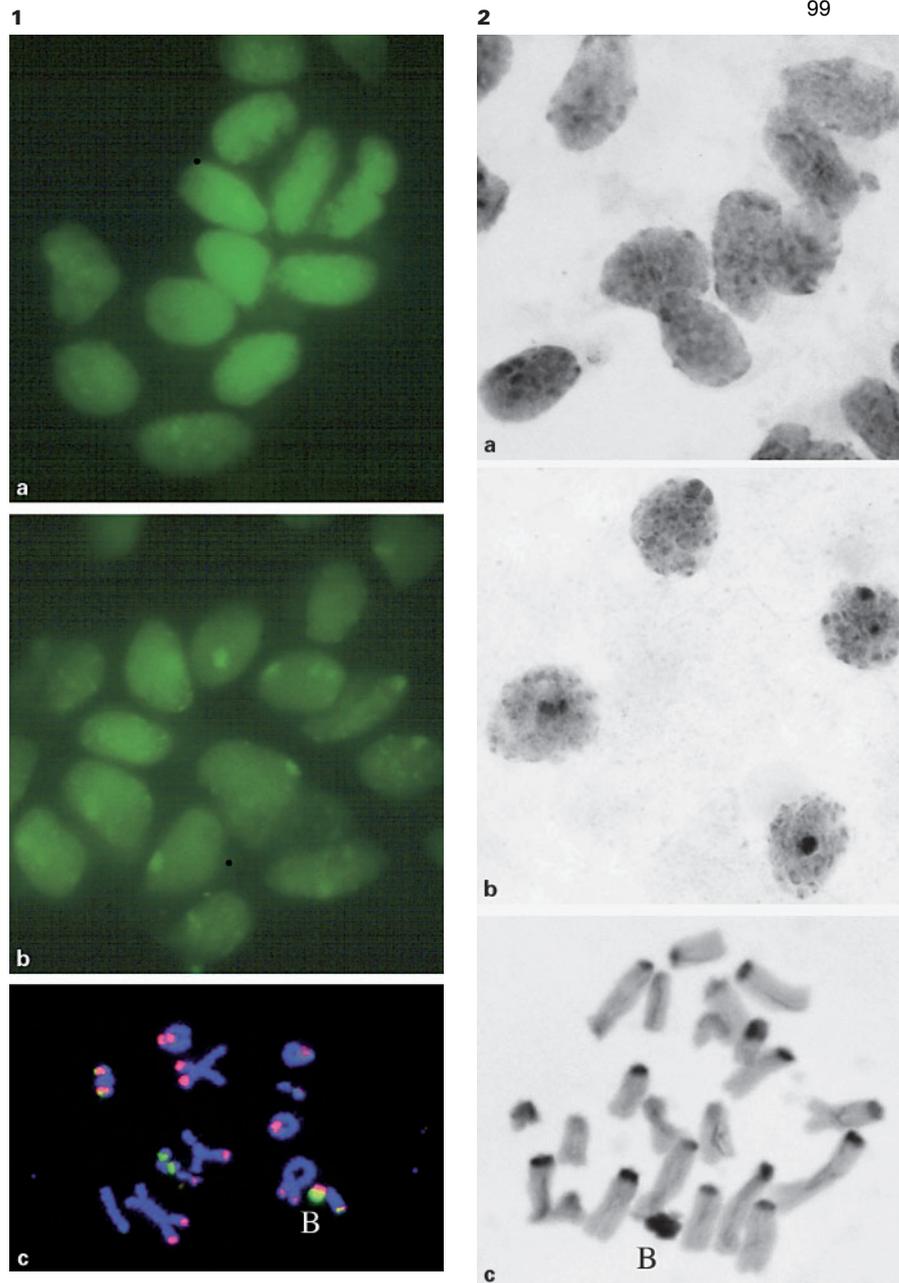
et al., 1994, 1995). C-banding was performed following the procedure described in Camacho et al. (1991) with some modifications to reveal C-bands in interphase nuclei. Briefly, the slides were sequentially immersed in 1 N HCl for 30 min at 28°C, Ba(OH)<sub>2</sub> for 5 min at 28°C, 2 × SSC for 60 min at 60°C, and 5% Giemsa for 1 min at room temperature. DAPI and CMA<sub>3</sub> staining were performed by means of the triple staining technique (Schweizer et al., 1983): the slides were stained with CMA<sub>3</sub> (0.5 mg/ml in McIlvaine buffer, pH 7.0, containing 1 M MgCl<sub>2</sub>) for 60 min, washed with distilled water, stained with distamycin A (0.1 mg/ml) for 15 min, washed again and stained with DAPI (0.5 µg/ml) for 40 min. After washing, the preparation was mounted in Vectashield anti-fading solution.

## Results and discussion

The hemolymph is the best material for analyzing living specimens of grasshoppers, since a small drop has been demonstrated to be enough for performing the cytological techniques needed to reveal B chromosome presence. All punctured grasshoppers showed no survival problem, indicating that the technique is completely harmless. This tissue provided interphase nuclei very useful for the techniques employed. In contrast, the removal of a jumping leg is a more injurious manipulation which provides low quality interphase nuclei.

For the purpose of revealing B chromosome presence, the most appropriate technique depended on the B chromosome variant. For B chromosomes mostly made of rDNA, as was the case for those found in El Gallego, the best technique is CMA<sub>3</sub> staining which reveals the B as the largest bright body in the nucleus (Fig. 1a, b), as expected from the fact that these Bs contain the largest rDNA cluster in the genome (Fig. 1c). DAPI staining, however, failed to reveal B chromosome presence in interphase nuclei irrespectively of whether Bs were mainly composed of rDNA or satDNA (data not shown). This latter class of B chromosomes (e.g. B<sub>24</sub> in the Torrox population), however, was clearly visualized by the C-banding technique. B chromosomes appeared as intensely stained large bodies (Fig. 2b) that were not apparent in the hemocytes of OB individuals (Fig. 2a), as expected from the different responses of chromosomes to this technique (Fig. 2c).

Invertebrate hemolymph is a complex tissue with broad significance to important biological functions such as cold tolerance (Duman and Horwath, 1983; Lallier and Truchot, 1989), oxygen transport (Cerenius and Soderhall, 2004) or immune response (Brennan and Anderson, 2004; Carton et al., 2005). The presence of B chromosomes in *E. plorans* hemocytes reinforces the idea that these chromosomes in this species are present in all somatic tissues. We had previously observed that the B chromosome number is the same in all cells of both testes and gastric caeca from the same individual (unpublished results), which suggested their mitotic stability. Hemocytes are a second class of somatic cells showing B presence thus suggesting that B chromosomes in this species are not eliminated from somatic tissues as a strategy to become less harmful for the host soma but are preserving their transmission ability through the germ line (see Camacho, 2005). Examples of germ-line-restricted B chromosomes have been reported in the marsupial mammal *Echymipera kalabu*



**Fig. 1.** Interphase nuclei of hemocytes (**a** and **b**) and spermatocyte at diplotene (**c**) from the grasshopper *E. plorans* collected at El Gallego, stained with CMA<sub>3</sub> (**a**, **b**) or double FISH (**c**) with rDNA (green) and satDNA (red). (**a**) 0B female. (**b**) 1B female. (**c**) 1B male. Note in **b** the presence of a bright body in each nucleus corresponding to the GC-rich rDNA which makes up most of the B chromosome (see **c**).

**Fig. 2.** C-banded hemocyte interphase nuclei (**a** and **b**) and embryonic mitotic metaphase cell (**c**) from the grasshopper *E. plorans* collected at Torrox. (**a**) 0B female. (**b**) 1B female. (**c**) 1B male embryo. Note in **b** the presence of an intensely stained body in each nucleus corresponding to the darkly C-banded (see **c**) satDNA-rich B<sub>24</sub>.

(Hayman et al., 1969) and the Japanese hagfish *Eptatretus okinoseanus* (Kubota et al., 1992).

Finally, the present paper shows that hemolymph interphase nuclei are an excellent material to ascertain B chromosome presence without the need of sacrificing the animal. With some knowledge on the nature of the B, in respect to A chromosomes of the same species, it is possible to differentiate them. In *E. plorans*, the enrichment of the B in either rDNA or satDNA permitted us to reveal its presence in hemolymph nuclei with CMA<sub>3</sub> staining or C-banding, respectively. Other B chromosome characteristics might facilitate, with the appropriate techniques, their visualization in hemolymph of living specimens in other insects. This might sim-

plify the huge amount of work usually needed to perform controlled crosses to ascertain B chromosome transmission rate, which is one of the main causes of the scarcity of transmission studies in B chromosomes (Camacho, 2005).

#### Acknowledgement

We thank A.J. Muñoz-Pajares for providing material of some specimens for C-banding.

## References

- Brennan CA, Anderson KV: *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response. *Ann Rev Immunol* 22:457–483 (2004).
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M, Camacho JPM: Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83:435–439 (1999).
- Camacho JPM: B Chromosomes in the Eukaryote Genome (Karger, Basel 2004).
- Camacho JPM: B chromosomes, in Gregory TR (ed): *The Evolution of the Genome* (Elsevier Inc., San Diego 2005).
- Camacho JPM, Cabrero J, Viseras E, López-León MD, Navas-Castillo J, Alché JD: G-banding in two species of grasshoppers and its relationship to C, N and fluorescence banding techniques. *Genome* 34:638–643 (1991).
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J: Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am Nat* 149:1030–1050 (1997).
- Carton Y, Nappi AJ, Poirie M: Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Dev Comp Immunol* 29:9–32 (2005).
- Cerenius L, Soderhall K: The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198:116–126 (2004).
- Duman JG, Horwath K: The role of hemolymph proteins in the cold tolerance of insects. *Ann Rev Physiol* 45:261–270 (1983).
- Hayman DL, Martin PG, Waller PF: Parallel mosaicism of supernumerary chromosomes and sex chromosomes in *Echymipera kalabu* (Marsupialia). *Chromosoma* 27:371–380 (1969).
- Jones RN, Rees H: B chromosomes (Academic Press, New York 1982).
- Kubota S, Nakai Y, Kuroo M, Kohno S: Germ line restricted supernumerary (B) chromosomes in *Eptatretus okinoseanus*. *Cytogenet Cell Genet* 60:224–228 (1992).
- Lallier F, Truchot JP: Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respir Physiol* 77:323–336 (1989).
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM, Camacho JPM: Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2:87–92 (1994).
- López-León MD, Vázquez P, Hewitt GM, Camacho JPM: Cloning and sequence analysis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75:370–375 (1995).
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA, Cabrero J, Bakkali M, López-León MD, Camacho JPM: Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenet Genome Res* 106:338–343 (2004).
- Schweizer D: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307–324 (1976).
- Schweizer D, Mendelak M, White MJD, Contreras N: Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba virgo* and its bisexual relatives. X. Pattern of fluorescent banding. *Chromosoma* 88:227–236 (1983).
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM: Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52:274–277 (1998).

### **3. Historia evolutiva de *Eyprepocnemis plorans***

---





### 3.1. INTRODUCCIÓN

El uso del ADN mitocondrial como marcador molecular para inferir relaciones filogenéticas está muy extendido, debido a una serie de ventajas como, por ejemplo, un elevado número de copias, su fácil aislamiento, la ausencia de recombinación, la conservación de su secuencia y estructura en metazoos, y un rango de tasa mutacional en las diferentes partes de la molécula (Moritz *et al.*, 1987; Harrison, 1989; Simon, 1991; Avise, 1991, 1994; Wolstenholme, 1992). En insectos ha sido ampliamente utilizado para dilucidar relaciones filogenéticas en insectos tanto a nivel inter- (Yassin *et al.*, 2009; Bacci *et al.*, 2009; Coeur d'acier *et al.*, 2007) como intraespecífico (Aikhionbare *et al.*, 2000; Shufrán *et al.*, 2000; Fröhlich *et al.*, 1999; Suárez *et al.*, 2009). En saltamontes, se han realizado estudios poblacionales utilizando ADNmt en las especies *Sinipta dalmani* (Pensel *et al.*, 2005; Sesarini & Remis, 2008) y *Chortthipus parallelus* (Lunt *et al.*, 1998). En *E. plorans*, Clemente *et al.* (2001) analizaron el patrón de variación para fragmentos de restricción mitocondriales en varias poblaciones naturales del sur y este de la Península Ibérica, y encontraron tres tipos mitocondriales para EcoRI, y sugirieron la posibilidad de que estos tipos estaban sufriendo un proceso de sustitución independiente al mostrado entre algunas variantes de los cromosomas B de esa zona.

La molécula de ADN mitocondrial animal tiene aproximadamente 16 Kb y en insectos presenta 37 genes, dos para ARN ribosómico, 22 genes para ARN transferente y 13 genes codificantes (Clary & Wolstenholme, 1985; Crozier & Crozier, 1993; Mitchel *et al.*, 1993). Entre estos últimos encontramos el gen que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo oxidasa y el gen que codifica para la subunidad V de la enzima NADH deshidrogenasa, que son los que hemos escogido para nuestro estudio.

La subunidad I de la enzima citocromo oxidasa (COI), consta de 511 aminoácidos frente a los 228 de la subunidad II o los 261 de la III (Clary and Wolstenholme, 1985). Esta subunidad presenta una función catalítica terminal en la cadena respiratoria y parece estar bien conservada en cuanto a su tamaño y estructura entre todos los organismos aeróbicos estudiados (Saraste, 1990). Los residuos aminoacídicos que forman parte del centro de reacción constituyen una pequeña proporción de la molécula, permitiendo así que algunas regiones presenten variabilidad, siendo esta mezcla de regiones conservadas y variables lo que hacen de este gen una potente herramienta para estudios evolutivos (Lunt *et al.*, 1996). Esta subunidad ha sido ampliamente utilizada como marcador en estudios filogenéticos de insectos, y en ortópteros podemos encontrar numerosos trabajos como, por ejemplo, los de Contreras & Chapco (2006) o Bugrov *et al.*, (2006) sobre diferentes

especies pertenecientes a las subfamilias Gomphocerinae, o el de Fries *et al.*, (2007) sobre la subfamilia Oedipodinae, destacando los realizados en la subfamilia Melanoplinae, a diferentes escalas filogenéticas, desde tribu hasta subespecie (Litzenberger & Chapco, 2001, 2003; Chapco & Litzenberger, 2002; Chapco, 2006).

Lunt *et al.* (1996) realizaron un estudio comparativo de la secuencia del gen para COI en nueve taxones diferentes de insectos pertenecientes a los órdenes Hymenoptera, Orthoptera y Diptera, analizando en detalle la estructura y secuencia de este gen en *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acridoidea), donde COI está flanqueado por Tyr-ARNt, en el extremo 5', y por Leu-ARNt en el 3', con un total de 1537 pb. No se apreciaron eventos indels aparentes en ninguno de los insectos utilizados, lo que facilita enormemente los alineamientos de secuencias. La conclusión más importante que podemos destacar en este estudio es que diferentes regiones de este gen presentan diferentes tasas de evolución, lo que lo convierte en una buena herramienta para estudios a diferentes escalas evolutivas, desde niveles inter- hasta intraespecíficos.

La Subunidad V de la enzima NADH (ND5) forma parte de un complejo multienzimático mitocondrial conocido como complejo NADH deshidrogenasa o Complejo I, encargado de realizar el proceso de fosforilación oxidativa. El gen que codifica para ND5 es uno de los genes que muestra la tasa evolutiva más rápida y presenta un tamaño adecuado para realizar análisis estadísticos en filogenias moleculares (Clary & Wolstenholme, 1985; Garesse, 1988). Gracias a su rápida tasa evolutiva ha sido utilizado para la reconstrucción de filogenias a baja escala evolutiva en diferentes taxones de insectos. Así, en lepidópteros, Albre *et al.* (2008) analizaron este gen en diferentes subespecies del género *Erebia* y distintas poblaciones de cada especie; Kato & Yagi (2004) realizaron una filogeografía de distintas subespecies de *Parides alcinous*, y Narita *et al.* (2007), publicaron una filogeografía de dos especies hermanas del género *Eurema*. En dípteros, Morgan *et al.* (2009) analizaron ND5 en diferentes especies del género *Anopheles*, en coleópteros, Su *et al.* (1996, 2004a,b) la analizaron en diferentes especies pertenecientes a diversas tribus de la subfamilia Carabinae y, Kim *et al.* (2000) trabajaron incluso a nivel poblacional con diversas subespecies del género *Leptocarabus*. En ortópteros, este gen ha sido empleado en estudios filogenéticos como el de Contreras & Chapco (2006) sobre distintas especies de la subfamilia Gomphocerinae y el de Fries *et al.* (2007), sobre la subfamilia Oedipodinae.

*Eyprepocnemis plorans* es, con mucho, el saltamontes eyprepocnemidino que ha sido objeto de más estudios, a nivel citogenético, molecular y evolutivo; entre ellos destacan el estudio genético de John & Lewis (1965), quienes analizaron la meiosis de híbridos obtenidos en el laboratorio, entre varias subespecies de *E.*

*plorans*. El descubrimiento de la presencia de cromosomas B en poblaciones españolas de *E. plorans plorans* (Camacho *et al.*, 1980), el aislamiento y secuenciación de un ADN repetido en tándem (López-León *et al.*, 1995) y localizado en la región paracentromérica de la mayoría de los cromosomas A y en el cromosoma B (López-León *et al.*, 1994a), y la realización de una serie de investigaciones sobre la transmisión y efectos de los cromosomas B en varias poblaciones españolas con la propuesta del modelo casi-neutro de evolución de los cromosomas B (Camacho *et al.*, 1997), ha convertido a *E. plorans* en una de las especies cuyo sistema de cromosomas B ha sido mejor estudiado.

Para intentar obtener evidencias sobre el origen evolutivo del sistema de cromosomas B del saltamontes *E. plorans* subsp. *plorans*, hemos planteado el presente estudio que combina el análisis de un número elevado de poblaciones de esta subespecie, que es la única que posee cromosomas B, con el de especímenes de la subespecie *E. plorans* subsp. *meridionalis* (procedente de Sudáfrica), así como de otras cuatro especies pertenecientes a la subfamilia Eyprepocnemidinae: *Heteracris adspersa*, *Heteracris pterosticha*, *Shirakiacris shirakii* y *Eyprepocnemis unicolor*. Todos estos taxones presentan un cariotipo compuesto por cromosomas acrocéntricos ( $2n=22+X0♂/XX♀$ ), con dos cromosomas grandes ( $L_1$  y  $L_2$ ), seis medianos ( $M_3-M_8$ ), tres pequeños ( $S_9-S_{11}$ ) y un cromosomas sexual (X) que presenta un tamaño similar al más grande de los autosomas medianos (Camacho *et al.*, 1980). Con este abanico de poblaciones y taxones, pretendemos obtener información tanto filogeográfica, para intentar revelar las rutas de colonización euroasiática por parte de *E. plorans* (una especie de origen africano), como filogenética, que permitirá encuadrar evolutivamente a las dos subespecies de *E. plorans* en el contexto de esta subfamilia. Para ello, hemos analizado los genes COI y ND5 en un total de 46 individuos.

### 3.2. RESULTADOS

Hemos amplificado tres regiones del genoma mitocondrial en machos adultos de cinco especies pertenecientes a la subfamilia Eyprepocnemidinae (*Heteracris adspersa*, *Heteracris pterosticha*, *Shirakiacris shirakii*, *Eyprepocnemis unicolor* y *Eyprepocnemis plorans* -subespecies *plorans* y *meridionalis*-). La tabla 3.1 resume el material empleado para la realización de la filogenia, constituido por 46 individuos capturados en diferentes regiones de los continentes europeo, asiático y africano.

Tabla 3.1. Resumen del material utilizado en la construcción de la filogenia.

<b>Especie</b>	<b>Población</b>	<b>Provincia</b>	<b>País</b>	<b>Nº indiv.</b>
<i>Eyprepocnemis plorans plorans</i>	Algarrobo	Málaga	España	2
"	Torrox	Málaga	España	2
"	Nerja0	Málaga	España	2
"	Nerja1	Málaga	España	2
"	Tetuán	Málaga	España	2
"	Maro	Málaga	España	2
"	Salobreña	Granada	España	2
"	Socovos	Albacete	España	2
"	El Gallego	Albacete	España	2
"	Claras	Albacete	España	2
"	Mundo	Albacete	España	2
"	Calasparra	Murcia	España	2
"	Smir		Marruecos	4
"	Variko		Grecia	6
"	Hrazdan		Armenia	4
<i>Eyprepocnemis plorans meridionalis</i>	Springbok		Sudáfrica	1
<i>Eyprepocnemis unicolor</i>	Tajikistán		Tajikistán	3
<i>Shirakiacris shirakii</i>	Primorskij Kray		Rusia	2
<i>Heteracris adspersa</i>	Daghestán		Daghestán	1
<i>Heteracris pterosticha</i>	Daghestán		Daghestán	1
			<b>Total</b>	<b>46</b>

El tamaño completo de los tres amplicones obtenidos, incluyendo los cebadores, es de 371 pb para COI, 307 para COI-Leu y 688 para Nad5 (figuras 3.1, 3.2 y 3.8, respectivamente). La parte de las secuencias correspondiente a los cebadores no ha sido considerada para la realización de los análisis que se han llevado a cabo y el tamaño final ha sido de 323 pb para COI, 256 para COI-Leu y 643 para Nad5.

Todos los productos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos y su identidad confirmada con la herramienta Blast, coincidiendo con las regiones descritas anteriormente para los genes que codifican para la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa y para la subunidad V de la enzima NADH deshidrogenasa en ortópteros. Las secuencias correspondientes a *Locusta migratoria* (EU287446) y a

*Chorthippus chinensis* (EU029161), utilizadas como outgroups, han sido extraídas de GenBank.

La ausencia de codones de stop y de indels en las secuencias indica que no se trata de pseudogenes sino de copias activas (realmente sí aparece un codón de stop en la secuencia COI-Leu puesto que corresponde a la parte final del gen que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa, pero este codón de stop está incluido en la secuencia del cebador reverso, que ancla en el gen que codifica para el ARN transferente de la leucina). Además, la amplificación por PCR de una única banda del tamaño esperado según los cebadores empleados también sugiere la amplificación de copias funcionales.

Para comprobar si las secuencias analizadas tienen un nivel bajo de saturación en el conjunto de especies analizadas, sirviendo así como marcadores filogenéticos apropiados, hemos aplicado el test del índice de saturación de Xia *et al.* (2003) implementado en el programa DAMBE. La saturación en los niveles de sustitución de las secuencias implicaría la pérdida de información filogenética, por lo que conocer esta información es fundamental cuando nos disponemos a realizar inferencias filogenéticas. La tabla 3.2 muestra que el índice de saturación de sustituciones (iss) es significativamente menor que el valor crítico (iss.c) para las tres secuencias analizadas, lo que indica que los niveles de saturación son bajos para las tres secuencias.

Tabla 3.2. Resultados del test de saturación aplicado a las secuencias.

Secuencia	Iss	Iss.c	P
Nad5	0.1135	0.7281	<0.001
COI	0.2818	0.6913	<0.001
COI-Leu	0.3354	0.6906	<0.001

Iss: índice de saturación de sustituciones.

Iss.c: índice crítico de saturación de sustituciones.

En reconstrucción filogenética es necesario conocer el modelo evolutivo al que mejor se ajustan las secuencias empleadas, con objeto de saber la probabilidad con la que se dan los distintos eventos de sustitución entre nucleótidos y poder, así, corregir o compensar las sustituciones no observadas a lo largo de la filogenia.

Para conocer el modelo evolutivo al que se ajustan nuestras secuencias hemos empleado el programa Modeltest v3.7 de Posada & Crandall (1998), utilizando el criterio de información de Akaike, AIC (tabla 3.3). Para la secuencia Nad5, el modelo seleccionado ha sido TIM (Modelo de Transición), mientras que para las secuencias COI y COI-Leu el modelo seleccionado ha sido GTR (Modelo

General de Tiempo Reversible); GTR permite seis tasas diferentes de sustituciones reversibles y diferencias en la frecuencia de las bases.

Tabla 3.3. Modelo de sustitución obtenido mediante Modeltest v3.7 de Posada & Crandall, 1998.

Modelo evolutivo	COI (AIC)	COI-Leu (AIC)	Nad5 (AIC)
	GTR+G	GTR+I	TIM+G
	a, b, c, d, e, f	a, b, c, d, e, f	a=f, b, c=d, e
Modelo de sustitución	R(a) [A-C] = 1.527	R(a) [A-C] = 0.263	R(a) [A-C] = 1.000
	R(b) [A-G] = 3.565	R(b) [A-G] = 5.669	R(b) [A-G] = 6.891
	R(c) [A-T] = 4.260	R(c) [A-T] = 4.959	R(c) [A-T] = 3.060
	R(d) [C-G] = 0.000	R(d) [C-G] = 0.000	R(d) [C-G] = 3.060
	R(e) [C-T] = 12.184	R(e) [C-T] = 25.506	R(e) [C-T] = 20.695
	R(f) [G-T] = 1.000	R(f) [G-T] = 1.000	R(f) [G-T] = 1.000
Proporción de sitios invariables	0.533	0.586	0
Distribución gamma	Igual tasa para todos los sitios	Igual tasa para todos los sitios	0.279

Las diferencias existentes entre la secuencia Nad5 y las secuencias COI y COI-Leu en cuanto al modelo evolutivo y al modelo de sustitución justifica no concatenar los tres fragmentos. Por el contrario, COI y COI-Leu siguen tanto el mismo modelo evolutivo como el mismo modelo de sustitución, lo que sí los haría aptos para ser concatenados y utilizados a la vez en la construcción de los árboles. Para investigar la bondad de esta concatenación, hemos aplicado un test de homogeneidad implementado en PAUP v4b10 (Swofford, 2003) que analiza la heterogeneidad de ambas secuencias y que permite, mediante un análisis estadístico, comprobar si las secuencias son o no homogéneas y si, por tanto, se pueden combinar. El resultado muestra un valor de p de 0.86 (>0.05), lo que sugiere que no existe conflicto entre ambas secuencias y que pueden concatenarse. Denominaremos COIc a la secuencia resultante de concatenar COI y COI-Leu.

### 3.2.1. Subunidad I del gen que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa (COI, COI-Leu)

Las figuras 3.1 y 3.2 muestran los fragmentos de 371 y 307 pb pertenecientes, respectivamente, a COI y COI-Leu.

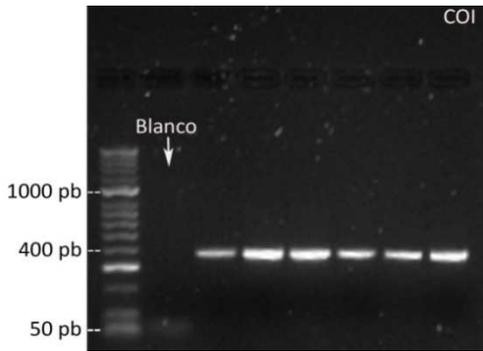
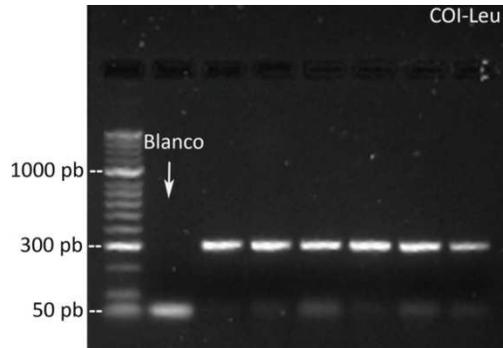


Figura 3.1. Gel de agarosa al 1.5% donde podemos observar la banda de 371 pb correspondiente a COI.

Figura 3.2. Gel de agarosa al 1.5% donde observamos la banda de 307 pb que corresponde a COI-Leu.



La tabla 3.4 muestra los valores de composición nucleotídica de ambos fragmentos, calculados con el programa Modeltest v3.7 (Posada & Crandall 1998):

Tabla 3.4. Composición nucleotídica (%).

Nucleótidos	COI	COI-Leu	COIc
T(U)	32.14	31.51	32.40
C	21.22	17.35	19.16
A	29.57	38.87	33.65
G	17.07	12.27	14.79
G+C	38.29	29.62	33.95

Como podemos observar en la tabla 3.1, el número total de secuencias analizadas fue de 46, de las cuales hemos obtenido un total de 15 haplotipos para COI y 11 para COI-Leu (exceptuando, en ambas, los outgroups). COI codifica para 107 aminoácidos, en su mayoría conservados, presentando 232 sitios nucleotídicos invariables frente a 91 variables (de los cuales, 45 son parsimoniosamente informativos). La mayoría de las sustituciones observadas son sinónimas (99), y sólo 4 son no sinónimas. Por otra parte, COI-Leu codifica para 85 aminoácidos, en su

mayor parte también conservados, presentando 204 sitios nucleotídicos invariables frente a 52 variables (de los cuales 28 son parsimoniosamente informativos). Por tanto, también muestra mayoría de sustituciones sinónimas (46 frente a sólo 7 sustituciones no sinónimas). La tabla 3.5 resume esta información, junto con los datos resultantes de concatenar los dos fragmentos del gen COI (COIc).

Tabla 3.5. Características generales de las secuencias de ADN de COI, COI-Leu y COIc.

Tamaño (pb)	COI		COI-Leu		COIc	
	323		256		579	
Sitios invariables	232	71.83%	204	79.69%	436	75.3%
Sitios variables	91	28.17%	52	20.30%	143	24.7%
Sitios parsimoniosamente informativos	45	13.93%	28	10.94%	73	51.04%
Singleton	46	14.24%	24	9.36%	70	48.96%
Nº total de cambios	103		53		156	
Nº total de cambios sinónimos	99	96.12%	46	86.79%	145	92.9%
Nº total de reemplazamientos	4	3.88%	7	13.21%	11	7.1%

El número efectivo de codones es un parámetro interesante, en el caso de secuencias codificantes como las que nos ocupan. Es medido por el índice ENC (*Effective number of codons*), que permite detectar la posible existencia de preferencia en el uso de codones en las especies analizadas (Wright, 1990). Su valor está comprendido entre 20 (indicando que existe preferencia entre codones sinónimos) y 61 (donde el uso de los codones sinónimos es aleatorio). La preferencia en el uso de codones es una característica descrita en muchos organismos, y las razones por las que ocurre varían según los grupos taxonómicos. Por ejemplo, se tiende a usar aquellos codones para los que hay más abundancia de los ARNt correspondientes. Otro índice para probar la existencia de sesgo codónico es CBI (*Codon Bias Index*, Morton 1993), cuyo valor está comprendido entre 0 (indicando un uso uniforme para todos los codones sinónimos) y 1 (sesgo codónico máximo). COI presenta un valor de ENC de 40.38 y de CBI igual a 0.63 mientras que COI-Leu de 32.85 y 0.69, respectivamente, lo que indica que, en ambas, se aprecia un cierto sesgo en el uso de codones sinónimos. En el caso de COIc, los valores de ENC y de CBI son de 36.285 y 0.622, respectivamente.

Para conocer si estas secuencias evolucionan de forma neutral o bien lo hacen bajo selección direccional o purificadora, hemos aplicado el test de neutralidad de Tajima (Tajima, 1989). La tabla 3.6 muestra tanto el valor obtenido al aplicar el test (D de Tajima) como la razón entre cambios no sinónimos y sinónimos. El resultado del test es estadísticamente significativo tanto para COI como para COI-Leu, lo que indica que estas secuencias no evolucionan de forma neutra. La razón entre cambios no sinónimos y sinónimos, cuyo valor es menor que uno, indica que

existe selección purificadora actuando sobre las secuencias, especialmente sobre el fragmento COI.

Tabla 3.6. Resultados del test de neutralidad de Tajima.

	COI	COI-Leu	COIc
D de Tajima	-2.03569* (p<0.05)	-1.85159* (p<0.05)	-2.00618* (P<0.05)
Razón NS/S de Tajima	0.53718	0.81149	0.76802

\*Estadísticamente significativo

NS/S: Razón de cambios No sinónimos / Sinónimos

Por último, hemos calculado, mediante el programa DNAsp (Librado & Rozas, 2009) los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplotípica (Hd) y el número de sustituciones (K) para COI y COI-Leu. Hemos realizado tres cálculos: i) para todo el conjunto de secuencias estudiadas, que asciende a 46 en total (como puede verse en la tabla 3.1), ii) para el conjunto de secuencias correspondientes a los individuos de *E. plorans plorans* procedentes de la Península y Marruecos (P/M) y iii) para los individuos de *E. plorans plorans* analizados de Armenia y Grecia (A/G), que podemos observar en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Comparación de los valores de diversidad nucleotídica y número medio de sustituciones de COI, COI-Leu y COIc ( $\pm$  SD).

	Secuencias	$\pi$	Hd	Nº haplotipos	K
COI	Todas	0.03370 $\pm$ 0.00861	0.738 $\pm$ 0.067	15	10.89
	P/M	0.00109 $\pm$ 0.00040	0.328 $\pm$ 0.112	5	
	A/G	0.00557 $\pm$ 0.00093	0.644 $\pm$ 0.101	4	
COI-Leu	Todas	0.02442 $\pm$ 0.00635	0.642 $\pm$ 0.068	11	6.25
	P/M	0.00056 $\pm$ 0.00035	0.140 $\pm$ 0.087	3	
	A/G	0	0	1	
COIc	Todas	0.02960 $\pm$ 0.0076	0.781 $\pm$ 0.061	18	17.14
	P/M	0.00085 $\pm$ 0.00026	0.442 $\pm$ 0.116	7	
	A/G	0.00311 $\pm$ 0.00052	0.644 $\pm$ 0.101	3	

$\pi$ , diversidad nucleotídica por sitio.

K, número medio de sustituciones.

Hd, diversidad haplotípica.

Un test t de Student mostró que las secuencias de A/G muestran significativamente mayor diversidad nucleotídica que las de P/M (t=13.2, df=36, P<0.000001) y mayor diversidad haplotípica (t=5.22, df=36, P=0.000004).

Una vez concatenadas las secuencias COI y COI-Leu, el número de haplotipos se elevó a 18 (excluyendo los dos outgroups), de los cuales 11

corresponden a *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*. En la tabla 3.8 podemos observar la frecuencia de cada haplotipo. Los siete haplotipos restantes corresponden a cada uno de los individuos analizados de las especies *Eyprepocnemis unicolor*, *Shirakiacris shirakii*, *Heteracris adspersa* y *Heteracris pterosticha*.

Tabla 3.8. Frecuencia de cada uno de los haplotipos obtenidos en las dos subespecies de *E. plorans* para las secuencias concatenadas COI y COI-Leu.

Haplotipo	Subespecie	Poblaciones / País	Nº de indiv.
1	<i>E. plorans plorans</i>	Claras, El Gallego, Socovos y Mundo (Albacete)	21*
		Calasparra (Murcia) Salobreña (Granada)	
2	"	Algarrobo, Torrox, Nerja0, Nerja1, Maro y Tetuán (Málaga)	1
		Algarrobo (Málaga)	
3	"	Tetuán (Málaga)	1
4	"	Torrox (Málaga)	1
5	"	Smir (Marruecos)	2
6	"	Smir (Marruecos)	1
7	"	Smir (Marruecos)	1
8	<i>E. plorans meridionalis</i>	Springbok (Sudáfrica)	1
9	<i>E. plorans plorans</i>	Hrazdan (Armenia)	4
10	"	Variko (Grecia)	1
11	"	Variko (Grecia)	5
12	<i>E. unicolor</i>	Tajikistán	1
13	<i>E. unicolor</i>	Tajikistán	1
14	<i>E. unicolor</i>	Tajikistán	1
15	<i>S. shirakii</i>	Primorskij Kray	1
16	<i>S. shirakii</i>	Primorskij Kray	1
17	<i>H. adspersa</i>	Daghestán	1
18	<i>H. pterosticha</i>	Daghestán	1
<b>Total de individuos secuenciados</b>			<b>46</b>

\*21 de los 39 individuos secuenciados tienen el haplotipo 1.

Mediante el software TSC v1.21 (Clement *et al.*, 2000) hemos construido una red de haplotipos (figura 3.4) donde podemos observar los pasos mutacionales existentes entre cada dos haplotipos. La localización geográfica de cada haplotipo aparece representada en la figura 3.3.

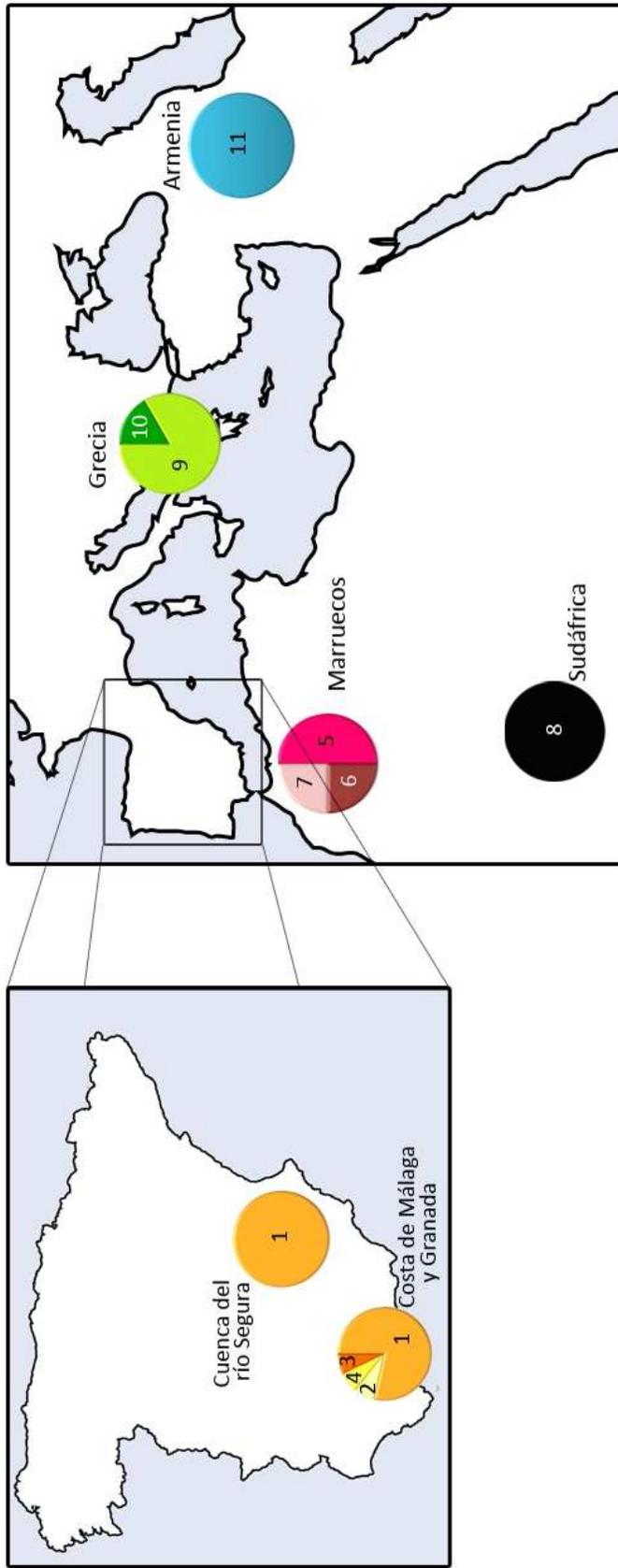


Figura 3.3. Correspondencia geográfica y abundancia relativa dentro de cada región de cada uno de los haplotipos obtenidos para COI y COI-Leu en *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*.

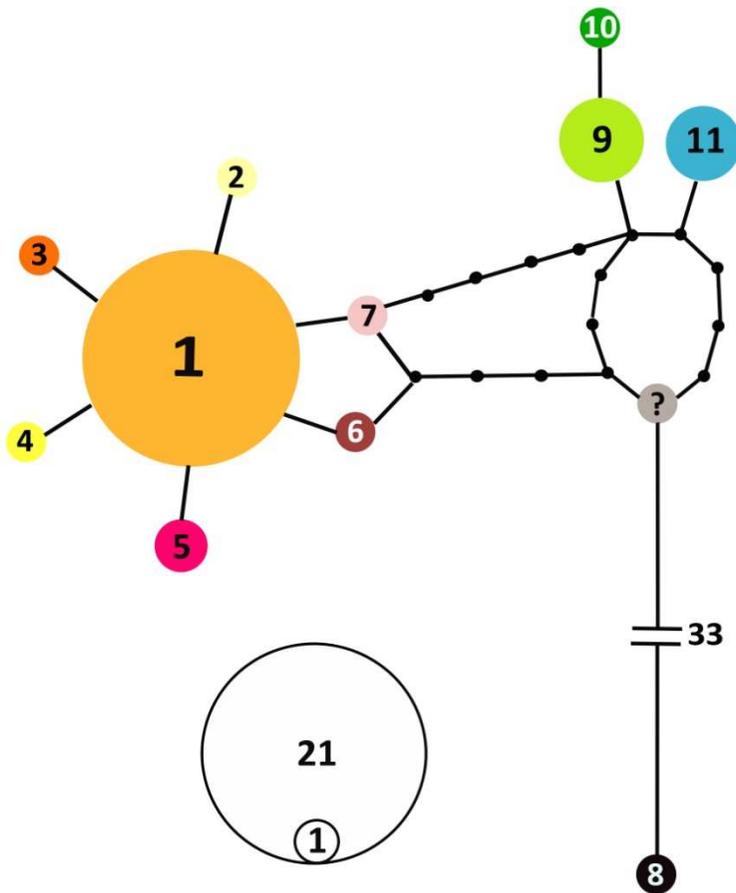


Figura 3.4. Red de haplotipos obtenida para la secuencia COIc en las subespecies *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*. Las líneas interrumpidas indican que hay más de un cambio mutacional entre dos haplotipos y el número que las acompaña indica el número de cambios mutacionales. El número que aparece en el interior de los círculos sin color indica el número de individuos que presentan ese haplotipo, siendo el tamaño de cada círculo proporcional a la representación que tiene cada haplotipo.

Con estos haplotipos hemos inferido diferentes árboles filogenéticos empleando tres métodos:

- Máxima parsimonia mediante el programa MEGA v4 (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008) y PAUP v4.0.b10 (Swofford, 2002) con bootstrapping de 500 réplicas que puede observarse en la figura 3.5. Hemos utilizado estos dos programas para analizar la congruencia del método de máxima parsimonia.
- Máxima verosimilitud, utilizando el software PhyML (Guindon & Gascuel, 2003; Guindon *et al.*, 2005) y PAUP v4.0.b10 (Swofford, 2002). El árbol filogenético inferido puede observarse en la figura 3.6. Para analizar su congruencia hemos aplicado un bootstrapping de 500 réplicas. También hemos empleado estos dos programas para ver la congruencia del método de máxima verosimilitud.
- Inferencia bayesiana, utilizando el programa MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), infiriendo el árbol filogenético que aparece en la figura 3.7. Hemos empleado, en este caso, 5.000.000 de generaciones para analizar la congruencia del árbol.

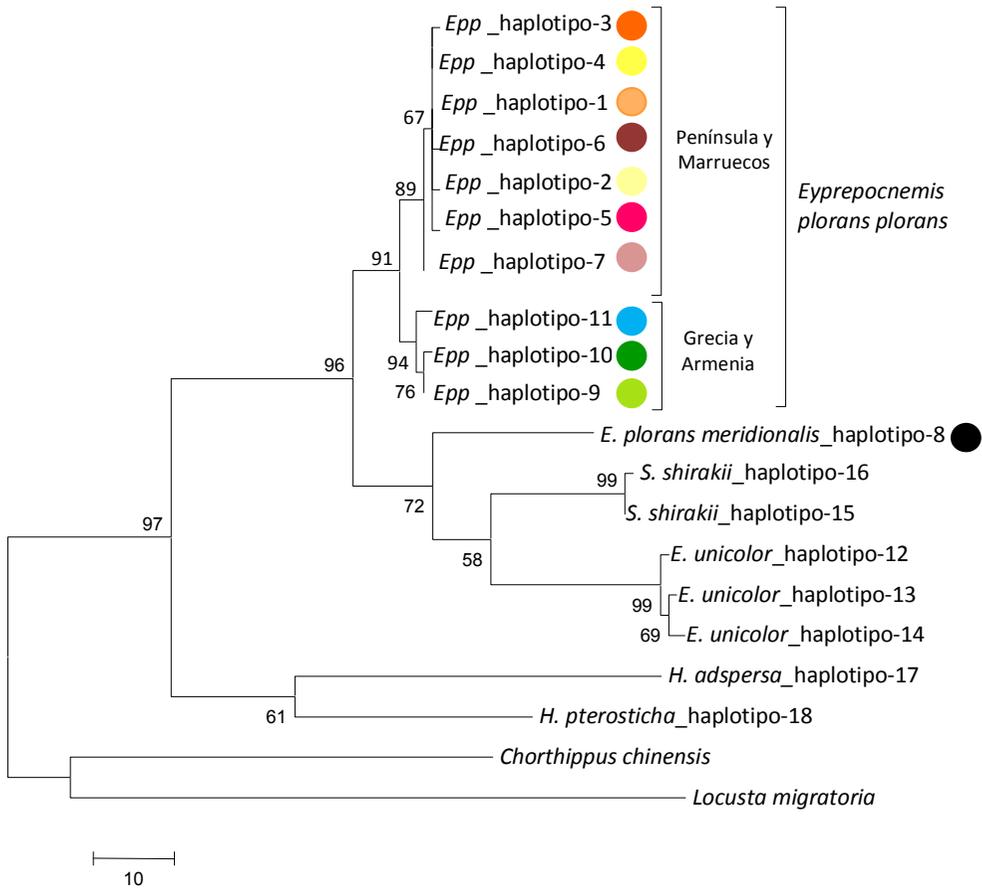


Figura 3.5. Árbol filogenético obtenido por máxima parsimonia, tanto con MEGA v4 como con PAUP, para la secuencias COI y COI-Leu concatenadas. La congruencia de este árbol fue calculada por bootstrapping con 500 réplicas. Las siglas “Epp” hacen referencia a *Eyprepocnemis plorans plorans*.

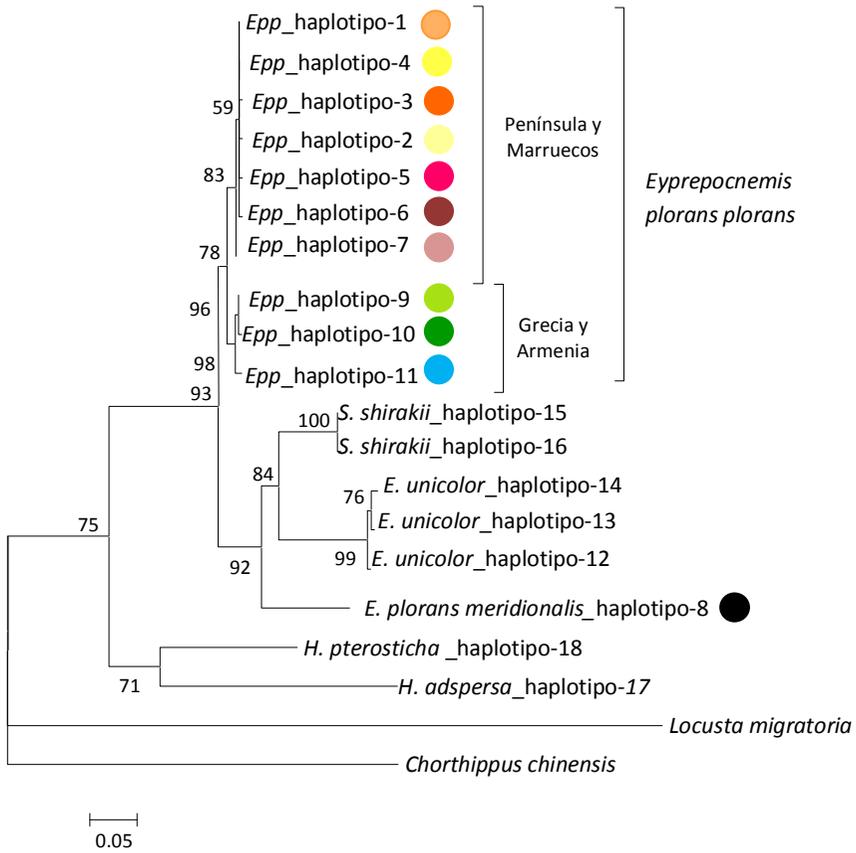


Figura 3.6. Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud tanto con PhyML como con PAUP con las secuencias COI y COI-Leu concatenadas. Se ha aplicado un bootstrap de 500 réplicas para ver su congruencia.

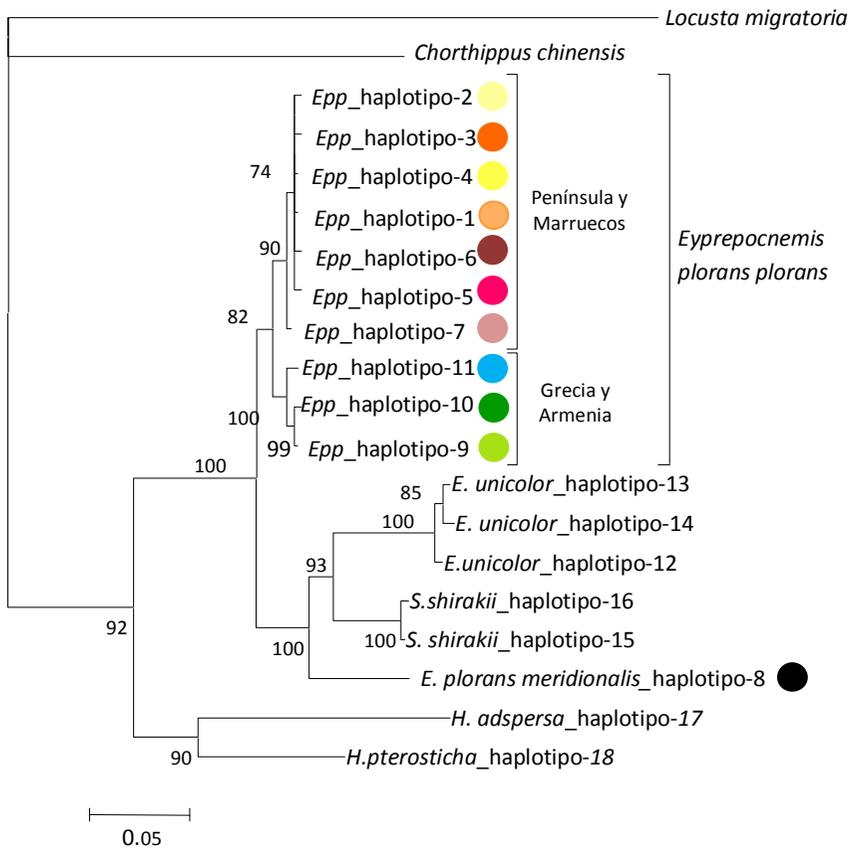


Figura 3.7. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana empleando MrBayes con las secuencias COI y COI-Leu concatenadas. El número de generaciones utilizado para ver la congruencia del árbol ha sido de 5.000.000.

También construimos árboles, mediante los tres métodos anteriores, para las secuencias COI y COI-Leu, por separado, y resultaron ser similares a los mostrados en las páginas anteriores.

### 3.2.2. Subunidad V del gen que codifica para la enzima NADH deshidrogenasa (Nad5)

La figura 3.8 muestra el fragmento de 688 pb perteneciente al gen que codifica para la subunidad V de la enzima NADH deshidrogenasa, Nad5.

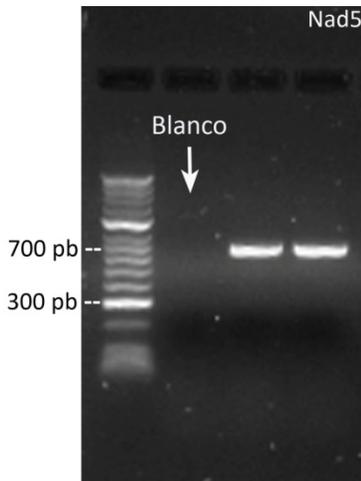


Figura 3.8. Gel de agarosa al 1.5% donde podemos observar la banda de 688 pb correspondiente al gen de la subunidad V de la enzima NADH deshidrogenasa.

En la tabla 3.9 se resumen los parámetros de composición nucleotídica que presenta esta secuencia y la tabla 3.10 muestra las características de esta secuencia, que codifica para 214 aminoácidos, con un total de 510 sitios invariables frente a 133 variables, de los cuales 89 son parsimoniosamente informativos. Las sustituciones observadas son, en su mayoría, sinónimas (98), y 35 eran no sinónimas. Presenta un valor de ENC de 27.150 y de CBI de 0.849, lo que indica claramente que existe sesgo codónico.

Tabla 3.9. Parámetros básicos de composición nucleotídica (%).

Nucleótidos	Nad5
T(U)	24.27
C	12.56
A	53.94
G	9.22
G+C	21.78

Tabla 3.10. Características generales de la secuencia Nad5.

	Nad5	
Tamaño (pb)	643	
Sitios invariables	510	79.32%
Sitios variables	133	20.68%
Sitios parsimoniosamente informativos	89	66.9%
Singleton	44	33.02
Nº total de cambios	133	
Nº total de cambios sinónimos	98	73.68%
Nº total de reemplazamientos	35	26.32%

A diferencia de lo que ocurre con las secuencias COI y COI-Leu, el resultado del test de Tajima para Nad5 no es estadísticamente significativo, lo que indica que esta secuencia sigue un modelo de evolución neutra (tabla 3.11).

Tabla 3.11. Resultados del test de neutralidad de Tajima.

	Nad5
D de Tajima	-1.60669 (p>0.05)
Razón NS/S de Tajima	1.26228

NS/S: Razón de cambios No sinónimos / Sinónimos

Al igual que para las secuencias COI y COI-Leu, hemos realizado tres cálculos de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica (Hd): i) para el total de secuencias analizadas (46, tabla 3.1), ii) para los individuos de *E. plorans plorans* procedentes de la Península y Marruecos (P/M) y iii) un tercero para los que pertenecen a Armenia y a Grecia (A/G). Como se observa en la tabla 3.12, el número medio de sustituciones en las 46 secuencias analizadas es de 18.89.

Tabla 3.12. Comparación de los valores de diversidad nucleotídica y número medio de sustituciones de Nad5.

Nad5	Secuencias*	$\pi$	Hd	Nº Haplotipos	K
	Todas	0.02938 $\pm$ 0.00655	0.773 $\pm$ 0.060	17	18.890
	P/M	0.00085 $\pm$ 0.00026	0.434 $\pm$ 0.111	5	
	A/G	0.00093 $\pm$ 0.00037	0.533 $\pm$ 0.180	4	

$\pi$ , diversidad nucleotídica por sitio.

K, número medio de sustituciones.

Hd, diversidad haplotípica.

Un test t de Student mostró que no existen diferencias significativas entre la diversidad nucleotídica de las secuencias de A/G y las de P/M (t=0.63, df=36, P=0.267) ni tampoco en la diversidad haplotípica (t=1.633, df=36, P=0.56).

El número de haplotipos observados para la secuencia Nad5 fue 17 (excluyendo los dos outgroups). De estos 17 haplotipos, 10 corresponden a las subespecies *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*. La frecuencia de cada uno de estos haplotipos es mostrada en la tabla 3.13, y su localización geográfica en la figura 3.9. Los siete restantes corresponden a cada uno de los individuos analizados de las especies *Eyrepocnemis unicolor*, *Shirakiacris shirakii*, *Heteracris adspersa* y *Heteracris pterosticha*.

Tabla 3.13. Frecuencia de cada uno de los haplotipos obtenidos en las dos subespecies de *E. plorans* para Nad5.

Haplotipo	Subespecie	Poblaciones	Nº de indiv.
1	<i>E. plorans plorans</i>	El Gallego y Socovos (Albacete) Salobreña (Granada)	21*
		Algarrobo, Torrox, Nerja0, Nerja1, Maro y Tetuán (Málaga) Smir (Marruecos)	
2	"	Claros, Mundo (Albacete)	3
3	"	Calasparra (Murcia)	2
4	"	El Gallego (Albacete)	1
5	"	Claros (Albacete)	1
6	<i>E. plorans meridionalis</i>	Springbok (Sudáfrica)	1
7	<i>E. plorans plorans</i>	Hrazdan (Armenia)	1
8	"	Hrazdan (Armenia)	7
		Variko (Grecia)	
9	"	Hrazdan (Armenia)	1
10	"	Variko (Grecia)	1
11	<i>E. unicolor</i>	Tajikistán	1
12	<i>E. unicolor</i>	"	1
13	<i>E. unicolor</i>	"	1
14	<i>S. shirakii</i>	Primorskij Kray	1
15	<i>S. shirakii</i>	"	1
16	<i>H. adspersa</i>	Daghestán	1
17	<i>H. pterosticha</i>	"	1
Total de individuos secuenciados			46

\*21 de los 39 individuos secuenciados tienen el haplotipo 1.

Al igual que con la secuencia COIc, hemos construido una red de haplotipos para Nad 5 (figura 3.10), donde podemos observar los pasos mutacionales existentes entre cada dos haplotipos.

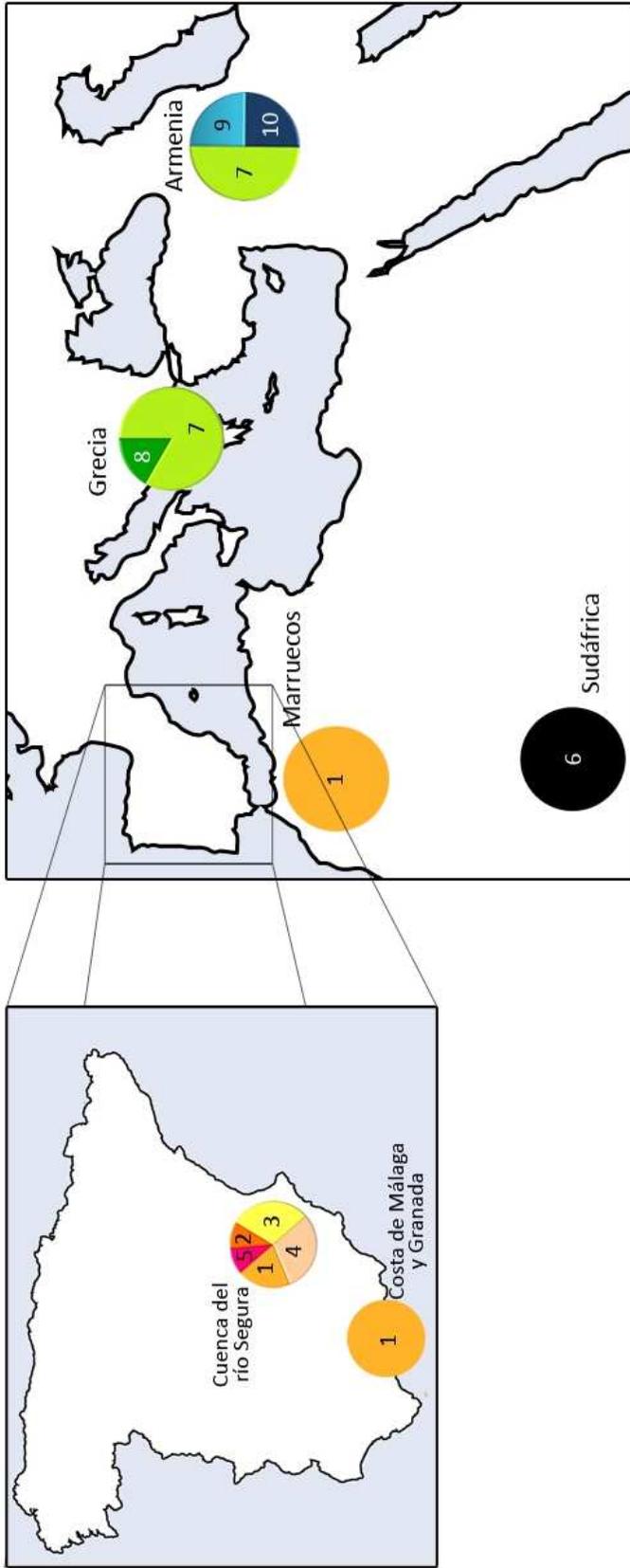


Figura 3-9. Correspondencia geográfica y abundancia relativa de cada uno de los haplotipos obtenidos para Nad5 en *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*.

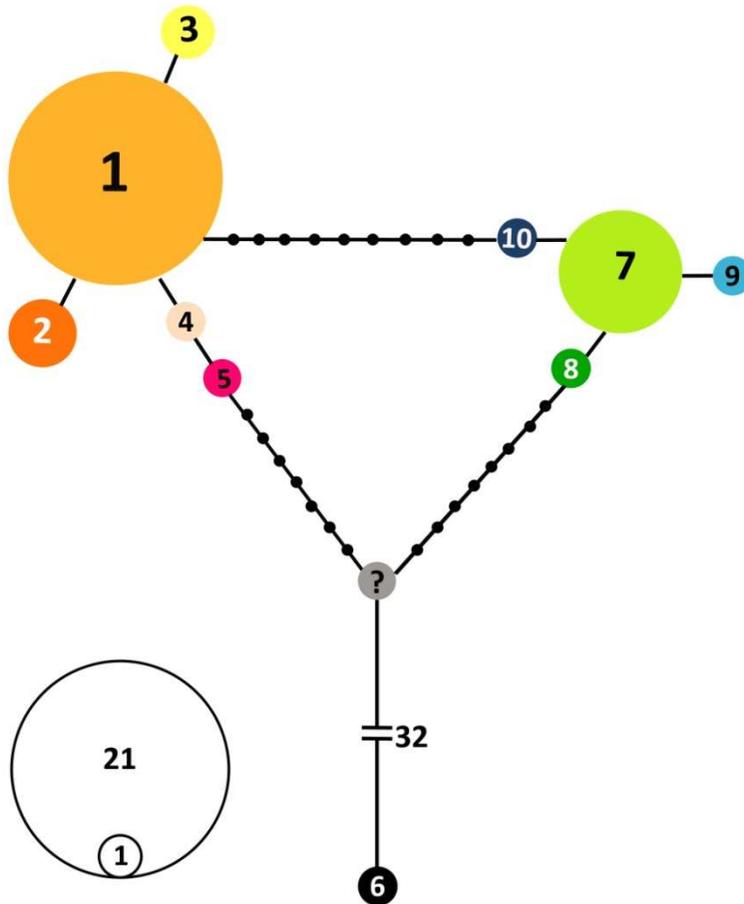


Figura 3.10. Red de haplotipos obtenida para la secuencia Nad5 en las subespecies *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*. Las líneas interrumpidas indican que hay más de un cambio mutacional entre dos haplotipos y el número que las acompaña indica el número de cambios mutacionales. El número que aparece en el interior de los círculos sin color indica el número de individuos que presentan ese haplotipo, siendo el tamaño de cada círculo proporcional a la representación que tiene cada haplotipo.

Empleando los mismos métodos que en el caso de las secuencias concatenadas COI y COI-Leu, hemos obtenido los árboles filogenéticos que pueden observarse en las figuras 3.11-3.13.

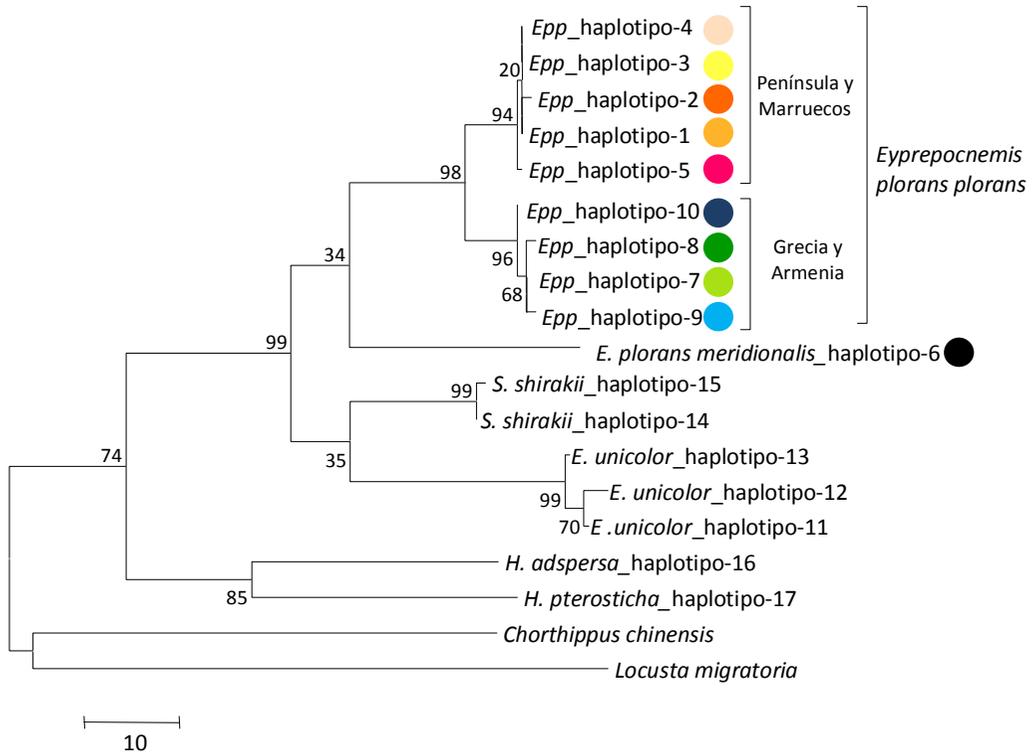


Figura 3.11. Árbol filogenético obtenido por máxima parsimonia, tanto con MEGA v4 como con PAUP, para Nad5. Para ver la congruencia de este árbol hemos aplicado un bootstrap de 500 réplicas.

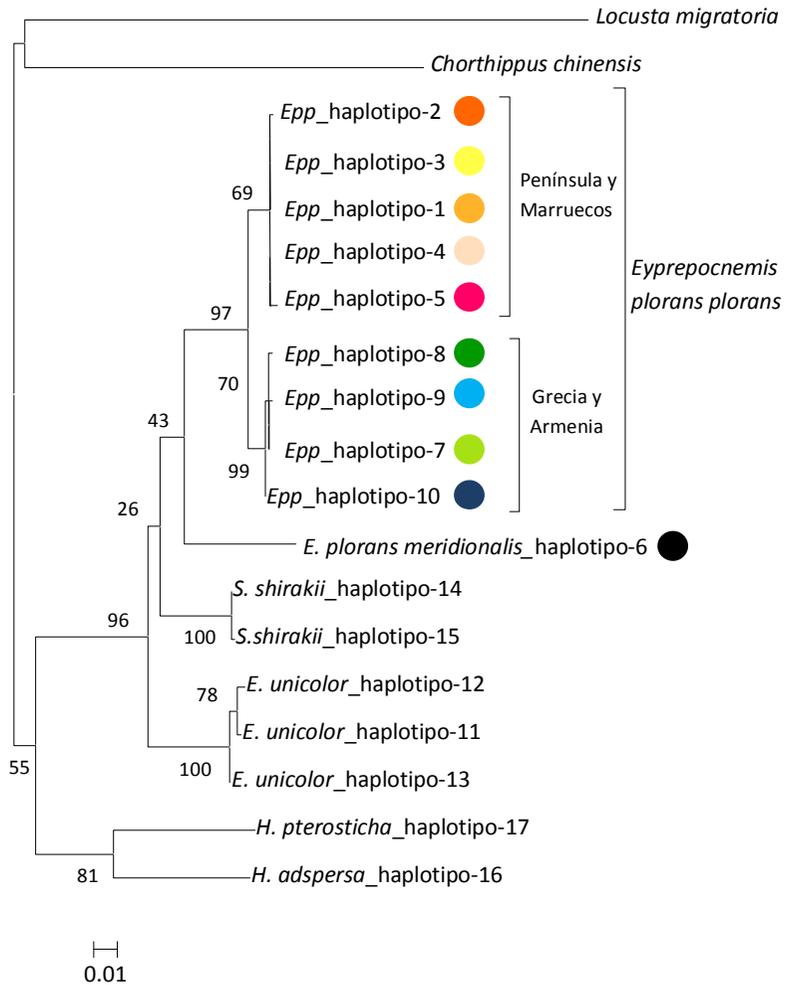


Figura 3.12. Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud con PhyML para Nad5. Se ha aplicado un bootstrap de 500 réplicas para ver su congruencia.

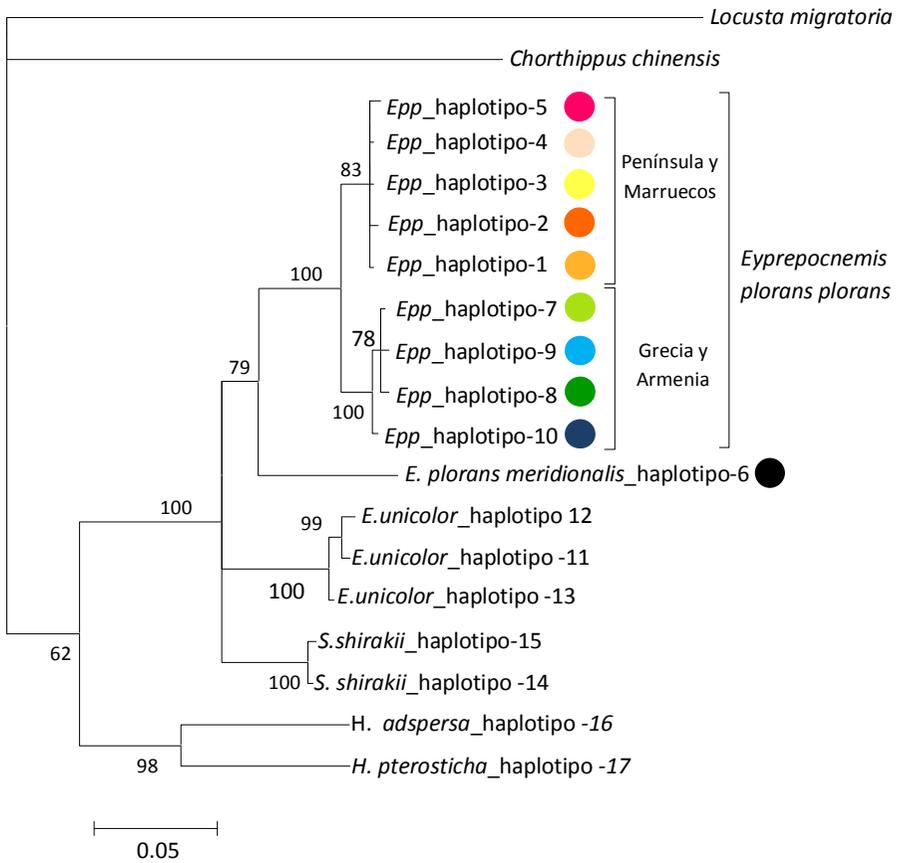


Figura 3.13 Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana empleando MrBayes para Nad5. El número de generaciones utilizado para ver la congruencia del árbol ha sido de 5.000.000.

### 3.2.3. Presencia y datación de ADN satélite y cromosomas B en *Eyreprocnemis plorans*

López-León *et al.* (1995) aislaron y secuenciaron un ADN repetido en tándem (unidad de 180 pb), localizado en la región paracentromérica de la mayoría de los cromosomas (López-León *et al.*, 1994a). Este ADN satélite está presente en *E. plorans meridionalis* (López-León *et al.*, 2008), y en diferentes poblaciones de *E. plorans plorans* (Cabrero *et al.*, 2003a), pero no en las otras especies de eyreprocnemídeos analizadas en este trabajo (Cabrero *et al.*, 2003c). Por ello, podemos decir que este ADN satélite es específico de *E. plorans*.

Por otra parte, la subespecie *E. plorans plorans* presenta cromosomas B en la mayoría de las poblaciones analizadas de España, Marruecos, Grecia, Turquía, Armenia y Dhaguestán (ver López-León *et al.*, 2008), pero no se han detectado en las subespecies *ornatipes* y *meridionalis* (John & Lewis, 1965; López-León *et al.*, 2008). Aunque el número de individuos y poblaciones analizado de estas otras subespecies es escaso, con la información disponible podemos afirmar que los cromosomas B parecen estar restringidos a la subespecie *plorans*.

Como hemos visto anteriormente, las secuencias COI están sujetas a selección purificadora, por lo que proporcionan un reloj molecular pobre, comparadas con Nad5, para la que el test de Tajima mostró evolución neutra. Por ello, sólo hemos usado Nad5 como reloj molecular. El test de máxima verosimilitud empleado para probar el reloj molecular indica que la secuencia Nad5 sigue un reloj molecular ( $L_0 = 2271.1107$ ,  $\log L_0 = 3.356$ ;  $L_1 = 2262.11327$ ,  $\log L_1 = 3.354$ ,  $-2\log L = 0.004$ , g.l.=17, donde el valor crítico para  $P = 0.05$  es 27.59, que es mucho mayor que 0.004), de modo que la edad absoluta de los eventos de especiación pueden ser estimados usando una tasa de sustitución homogénea a lo largo de todas las ramas de la filogenia inferida mediante BEAST v1.5.4 (figuras 3.14 y 3.15). Para ello hemos utilizado una tasa de sustitución reconocida como reloj molecular universal para insectos cuyo valor es de 0.0115 sustituciones por linaje por millón de años (Brower, 1994; Bocak & Yagi, 2009).

El árbol de la figura 3.14 sugiere que el ADN satélite de *E. plorans* se originó hace de unos 3.3 a 4.1 millones de años, es decir, el período comprendido entre los nodos en que *E. plorans* se separó de las otras especies y el que separó a las diferentes subespecies de *E. plorans*. Este mismo árbol sugiere que la edad de los cromosomas B de la subespecie *E. plorans plorans* es menor de 3.3 millones de años (figura 3.15).

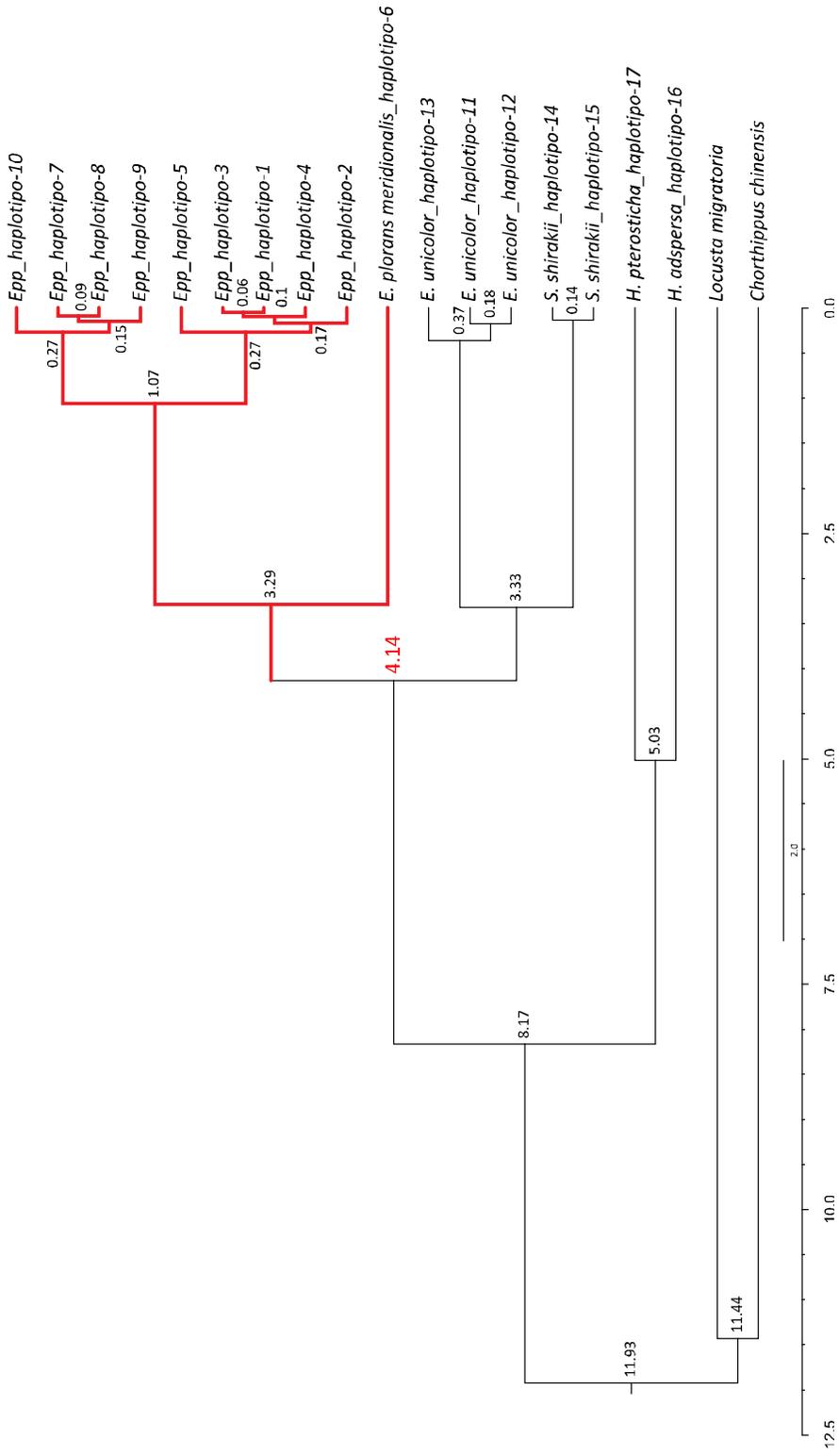


Figura 3.14. Árbol filogenético inferido mediante Beast v1.5.4 empleando Nad5. En rojo aparecen marcados los clústers que presentan ADN satélite y aparece resaltada en rojo la edad máxima aproximada de aparición del ADN satélite en las subespecies *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*.

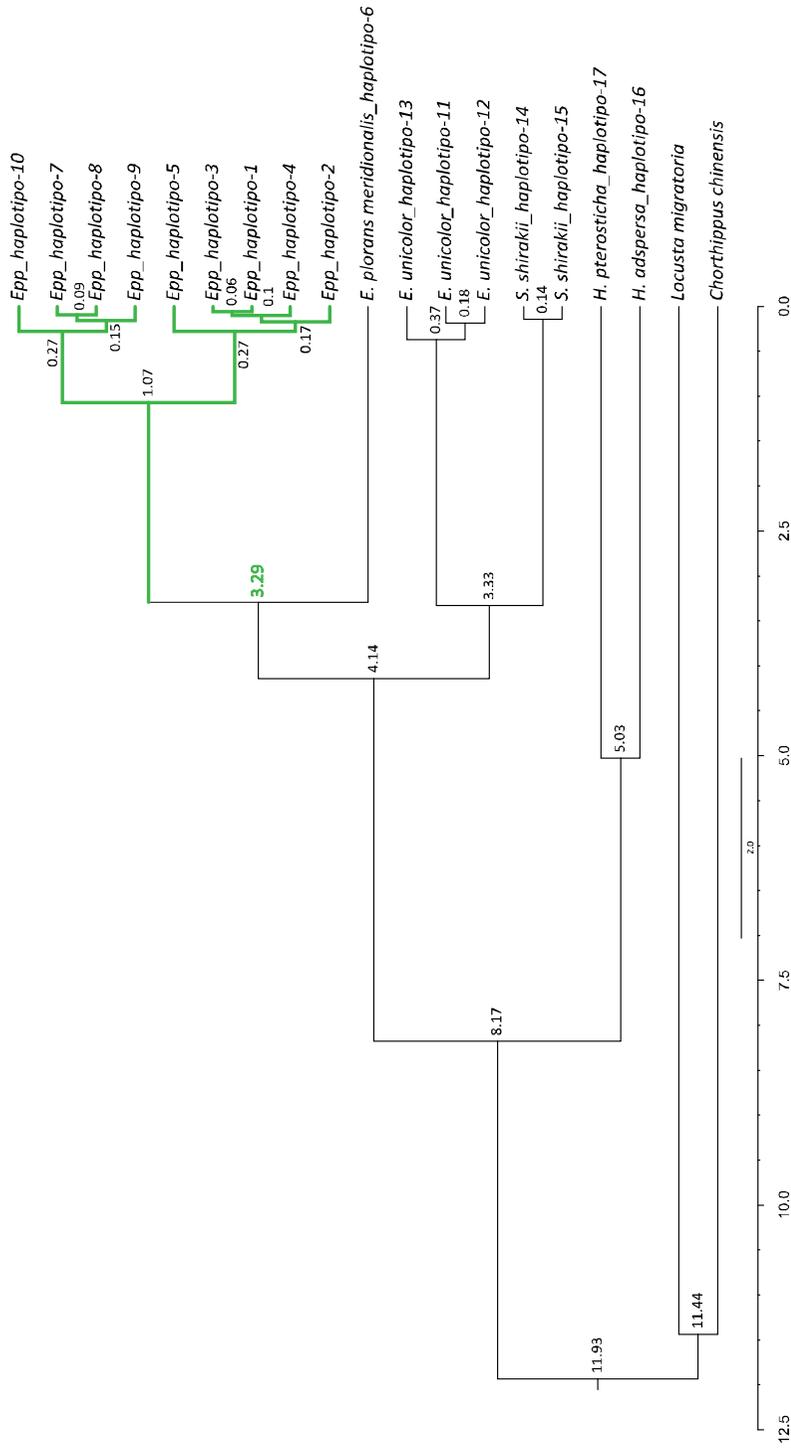


Figura 3.15. Árbol filogenético inferido mediante Beast v1.5.4 empleando Nad5. En verde aparecen marcados los clústers que presentan cromosomas B y que corresponden a todas las poblaciones analizadas de la subespecie *E. plorans plorans*. Aparece resaltada en verde la edad máxima aproximada de aparición de estos cromosomas B.

### 3.3. DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral hemos empleado secuencias pertenecientes al gen que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa (COI) y al gen que codifica para la subunidad V de la enzima NADH deshidrogenasa (ND5). Son numerosos los estudios donde se ha comprobado que ambos genes presentan la variabilidad suficiente como para ser empleados en estudios filogenéticos a baja escala donde se incluyen poblaciones pertenecientes a la misma especie y subespecies.

Con respecto al gen que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa, tanto Lunt *et al.*, (1996) como Zhang & Hewitt, en el mismo año, comprobaron que este gen contiene diferentes regiones que evolucionan con tasas diferentes y que las parejas de cebadores UEA3/UEA4 y UEA9/UEA10 (que codifican para COI y COI-Leu, respectivamente) son las que amplifican las regiones con mayor variabilidad de este gen, por lo que serían las más aptas para realizar análisis filogenéticos entre especies muy relacionadas, entre subespecies o entre distintas poblaciones de la misma especie. Por su parte, el gen que codifica para la subunidad V de la enzima NADH deshidrogenasa presenta una rápida tasa evolutiva que ha permitido su uso en reconstrucción de filogenias también a baja escala evolutiva (ver introducción).

En nuestro estudio, el bajo índice de saturación que presentan las secuencias analizadas las hacen aptas para ser utilizadas como marcadores filogenéticos. La ausencia de codones de stop y de indels en las secuencias analizadas, sumada a un claro sesgo codónico en Nad5 e incipiente en COI avalan la funcionalidad de estas secuencias. El bajo porcentaje de GC observado para los fragmentos COIc y Nad5 (33.9 y 21.8, respectivamente), no debe interpretarse necesariamente como un indicio de escasa actividad transcripcional ya que existe un gran debate sobre si el porcentaje en GC está correlacionado positivamente con el nivel de expresión de un gen. De hecho, numerosos estudios apoyan esta idea (Lercher *et al.*, 2002; Vinogradov *et al.*, 2003; Urrutia *et al.*, 2003) mientras que otros han obtenido correlaciones negativas (Gonçalves *et al.*, 2000; Duret *et al.*, 2002). Un ejemplo muy ilustrativo que rechaza la idea de que los genes con altos niveles de expresión deben mostrar porcentajes altos de GC es el de las  $\alpha$ - y  $\beta$ -globinas, dos proteínas con diferente contenido en GC a nivel del tercer codón (alto y bajo, respectivamente), que se expresan en el mismo tipo celular (eritrocitos) y que se encuentran en la misma cantidad aproximadamente, lo que indica que los genes que las codifican presentan un mismo nivel de expresión (Li, 1997). Por otra parte, el contenido moderado de GC que presentan las secuencias que hemos analizado es congruente con el alto sesgo que presenta el genoma mitocondrial, y especialmente el gen COI, hacia secuencias ricas en AT (Gerber *et al.*, 2001; Brower & DeSalle,

1998). Además, el contenido en GC puede variar incluso dentro de cada nivel taxonómico (Chandra *et al.*, 2006; Clare *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos al aplicar el test de Tajima (Tajima, 1989) rechazan la hipótesis de neutralidad para la secuencia concatenada COIc ( $D=-2.00618$ , con un valor de  $p<0.05$ ). El valor negativo significativo del estadístico D y la razón entre cambios no sinónimos y sinónimos, cuyo valor es menor que uno, indica que una selección purificadora está actuando sobre las secuencias, apareciendo polimorfismos para variantes con baja frecuencia. Otros estudios en los que también se han obtenido valores negativos del parámetro D estadísticamente significativos para secuencias pertenecientes al gen COI son los publicados por Faccoli *et al.* (2005) o Anducho-Reyes *et al.* (2008) en coleópteros, Vandewoestijne *et al.* (2004) en lepidópteros o Loaiza *et al.* (2010) en *Anopheles albimanus*. Por el contrario, para Nad5 el valor D de Tajima no es estadísticamente significativo, lo que indica que sigue una evolución neutra, resultado acorde con los obtenidos por Maia *et al.* (2009) en *Aedes albopictus* o por Temu & Yan (2005) en *Anopheles arabiensis*, ambas especies de dípteros.

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) para COI es significativamente mayor para el conjunto de individuos pertenecientes a Armenia y Grecia que para los de Península Ibérica y Marruecos. Por el contrario, la diversidad nucleotídica para Nad5 no difiere significativamente para estas dos regiones.

La proporción de cambios no sinónimos frente a sinónimos es mayor en Nad5 que en COIc, siendo mayor también el valor de K (número medio de sustituciones por sitio en una secuencia), lo que indica que Nad5 puede ser más resolutivo que COIc a la escala en la que hemos trabajado (especie, subespecie y población). A nivel de especie, tanto COIc como Nad5 han resuelto árboles similares, agrupando juntas a las especies *Shirakiacris shirakii* y *Eyprepocnemis unicolor* en un clúster con *Eyprepocnemis plorans* y a *Heteracris adspersa* y a *Heteracris pterosticha* en otro. Pero es a nivel de subespecie donde Nad5 ha tenido una mayor resolución que COIc, puesto que ésta última incluye a *Eyprepocnemis plorans meridionalis* en el clúster de *S. shirakii* y *E. unicolor*, en lugar de incluirlo en el de *E. plorans plorans*, como deberíamos esperar. Además, teniendo en cuenta que las dos subespecies de *Eyprepocnemis plorans* contienen ADN satélite de 180 pb, que está ausente en el resto de eyprepocnemídeos (Cabrero *et al.*, 2003c), los árboles construidos a partir de COIc implicarían la aparición del ADNsat dos veces, o su desaparición de *E. unicolor* y *S. shirakii* (figura 3.16), mientras que, por el contrario, el árbol construido con Nad5 es totalmente congruente con la aparición del ADN satélite sólo una vez en el clúster de *Eyprepocnemis plorans* (figura 3.17). El ADN satélite se ha utilizado para la resolución de relaciones filogenéticas (Stepien & Kocher, 1997). El análisis de la presencia o ausencia de diferentes familias de ADN repetitivo ha ayudado a realizar

inferencias filogenéticas en algunos casos. Por ejemplo, Hartley & Davidson (1994a, b), analizaron la distribución de ADN repetitivo aislado de la trucha ártica *Salvelinus alpinus* en otras especies del género *Salvelinus*, por hibridación Southern, empleando la presencia o ausencia del monómero de repetición como marcador en sus análisis filogenéticos. Igualmente, Garrido-Ramos *et al.* (1995), demostraron la presencia exclusiva de ADN satélite perteneciente a la familia Dral en el genoma de las especies pertenecientes al género *Pagrus*, y eso permitió su agrupación como un linaje monofilético distinto al linaje que incluye a los géneros *Sparus*, *Diplodus*, *Lithognathus* y *Spondyliosoma*, dentro de la familia Sparidae. Finalmente, Robles *et al.* (2004) utilizaron la presencia o ausencia del ADN satélite de la familia HindIII en la familia Acipenseridae para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de los géneros *Acipenser*, *Huso* y *Scaphirhynchus*. De forma similar, nosotros pensamos que la presencia del ADNsat de 180 pb en las dos subespecies de *E. plorans*, y su ausencia en las otras especies de Eyprepocnemidinos es un carácter filogenético que proporciona mejor soporte a la filogenia obtenida con Nad5 que con COIc.

La existencia de un único haplotipo para Nad5 en la población marroquí de Smir, y su coincidencia con el haplotipo predominante en la Península Ibérica, indica la existencia de una similitud genética en el ADN mitocondrial que también ocurre para la composición de los cromosomas B (Cabrero *et al.*, 1999). La explicación más plausible es la existencia de una elevada tasa de flujo génico entre el sur de la Península Ibérica y el norte de Marruecos. La elevada similitud en ambos marcadores indica que las migraciones deben ser recientes, presumiblemente asociadas a los movimientos migratorios humanos. Hace varios años, observamos la presencia de varios ejemplares de *E. plorans* en plantas de la especie *Thuja occidentalis* de un vivero de Granada y este año hemos capturado ejemplares en los alrededores del vivero. Esta especie no la habíamos encontrado anteriormente a menos de 30 Km de Granada, preguntamos en el vivero la procedencia de aquellas plantas, y nos dijeron que venían de Valencia, donde *E. plorans* es muy abundante. Esto indica que el transporte de plantas puede ser un vehículo importante para la migración a larga distancia de esta especie, pudiendo haber contribuido enormemente a la homogenización genética de muchas poblaciones de la Península Ibérica y Marruecos, dos zonas que, por su cercanía geográfica y alta relación histórica y comercial, han tenido un elevado grado de conexión, especialmente desde la ocupación árabe, entre los siglos VIII y XV (ver Gaubert *et al.*, 2009). Hacia las poblaciones de la cuenca del río Segura el flujo génico parece estar más restringido dado el mayor número de haplotipos presentes.

Es de resaltar que tanto COIc como Nad5 han agrupado las poblaciones de *E. plorans plorans* en dos clusters, uno incluyendo a los haplotipos procedentes de las poblaciones occidentales (Península Ibérica y Marruecos) y el otro a las de las orientales (Grecia y Armenia), con valores de bootstrap altos, y con un período de

divergencia comprendido entre hace un millón y 270.000 años (ver la figura 3.14). La subdivisión en clados orientales y occidentales observada en cada una de las dos especies de erizos europeos, *Erinaceus europaeus* y *E. concolor* ha sido atribuida a la influencia de las glaciaciones del Pleistoceno (Santucci, 1998). Análisis filogeográficos moleculares en diversos organismos del sur de Europa han revelado que muchas especies contienen genomas divergentes y están frecuentemente subdivididas geográficamente (para revisión, ver Hewitt, 2001). Según este autor, esto es debido, probablemente, a que estas regiones proporcionaron refugios a través de las contracciones y expansiones climáticas de las glaciaciones, de forma que los genomas sobrevivieron y divergieron sin gran desplazamiento geográfico.

Las sucesivas glaciaciones del Pleistoceno, desde hace 2.6 millones de años, modificaron considerablemente la distribución geográfica de muchas especies de animales y plantas (Hewitt, 2001). *E. plorans* tiene actualmente una distribución circummediterránea, prolongándose hacia el Cáucaso a través de Turquía y Armenia. Es una especie frecuente en las penínsulas que sirvieron de refugio para muchas especies europeas de animales y plantas, durante las glaciaciones (Iberia, Italia y Grecia y Anatolia). Aunque esta especie no habita en los climas que más se vieron afectados por el avance del hielo, al ser una especie de origen africano (Dirsh, 1958) que vive en clima templado de zonas costeras, adentrándose hacia regiones interiores a través de las cuencas de los ríos mediterráneos, pudo afectarle también la disminución general de la temperatura que tuvo lugar en cada glaciación, restringiendo su rango geográfico a las regiones más al sur. En el último millón de años ha habido unas 10 glaciaciones (una cada 100000 años, aproximadamente), que han proporcionado amplias oportunidades para la extinción y recolonización de las poblaciones situadas a mayor altitud. Los datos del ADNmt indican un elevado grado de aislamiento entre *E. plorans plorans* de la Península Ibérica y Marruecos con respecto a los de Grecia y Armenia, como lo sugieren los 10 pasos mutacionales entre los haplotipos de una y otra zona (ver figura 3.10). Diferencias paralelas muestran los cromosomas B de ambas zonas, ya que los de España y Marruecos están constituidos por ADNsat de 180 pb y por ADNr, en proporciones no muy diferentes, mientras que los de Grecia y Armenia están compuestos mayoritariamente de ADNr (López-León *et al.*, 2008).

La figuras 3.4 y 3.10 muestran las redes de haplotipos para COIc y Nad5, respectivamente, y ambas sugieren que las poblaciones actuales de *E. plorans plorans* derivan de un hipotético ancestral, probablemente, localizado hacia África central, que evolucionó en *E. p. meridionalis* hacia el sur, y en *E. p. plorans* hacia el norte, a través de dos rutas, una hacia oriente, alcanzando Armenia y Grecia, y otra hacia occidente, quizás por Marruecos y la Península Ibérica, aunque no podemos descartar el paso al mediterráneo norte a través del estrecho de Sicilia. La figura 3.10 muestra también que, para Nad5, el número de pasos entre haplotipos es similar en

los tres lados del triángulo, lo que permite estimar en aproximadamente un millón de años la existencia del hipotético ancestral centroafricano, ya que esta es la estima que obtuvimos, mediante métodos de coalescencia (con BEAST) entre las poblaciones del este (Armenia y Grecia) y del oeste (Península Ibérica y Marruecos). Esta posibilidad es avalada por la formación de corredores, durante las glaciaciones del Pleistoceno, entre el suroeste y el nordeste de África, a través de las montañas del este de África (Balinsky, 1962; Verdcourt, 1969; Van Zinderen Bakker, 1975; Goldblatt, 1978; Jurgens, 1997; Coleman *et al.*, 2003). No obstante, dada la íntima asociación de la distribución geográfica de *E. plorans* con los ríos, al menos en la Península Ibérica, no podemos descartar que el Nilo hubiera servido de corredor para la migración de este hipotético antecesor hacia el norte de África.

La relación filogenética entre *Eyprepocnemis plorans*, *Eyprepocnemis unicolor* y *Shirakiacris shirakii* es muy elevada y sólo el marcador con la mayor tasa de sustitución (Nad5) ha mostrado la resolución necesaria para reconstruir una historia filogenética entre estas tres especies acorde con la presencia exclusiva de ADNsat en *E. plorans* (Cabrero *et al.*, 2003a). El origen del clado de *Eyprepocnemis* (que incluye a *S. shirakii*, ver figura 3.14) data de hace unos cuatro a ocho millones de años. Este período incluye la etapa final del Mioceno, la época Messiniense, entre 7,25 y 5,33 Ma (millones de años atrás), durante la cual se secó el mar Mediterráneo y se crearon varios puentes de tierra entre África y el sur de Europa (por ejemplo, a través de los estrechos de Gibraltar y de Sicilia). Este pudo ser un período apropiado para la llegada de antecesores de *Eyprepocnemis* desde África. Aunque no podemos profundizar más en este aspecto, nuestros resultados tienen un mensaje claro para la posición taxonómica de *Shirakiacris shirakii*, que debería ser revisada.

Assumiendo el reloj molecular universal para insectos (Bocak *et al.*, 2009), hemos estimado que el clúster de *E. plorans* tiene una antigüedad entre 4.14 y 3.29 millones de años aproximadamente (figura 3.14) y en este intervalo temporal muy posiblemente se originó el ADN satélite de 180 pb, exclusivo de esta especie. Podemos considerar que el origen de este ADNsat es relativamente reciente, puesto que otros estudios muestran familias de ADNsat más antiguas, como es el caso de la familia PIM357 del género *Pimelia*, que tiene más de 8 millones de años (Pons *et al.*, 2002), del ADNsat TkS1 del género *Triturus*, datado en unos 10 millones de años (Varley *et al.*, 1990), de la familia pvB370 BamHI en especies pertenecientes al grupo de *Drosophila* (Heikkinen *et al.*, 1995) datado en 20 millones de años o incluso más antiguos como son el ADNsat de cetáceos, datado en 40 millones de años (Árnason *et al.*, 1992) o la familia PstI encontrado en más de 13 especies de esturiones con más de 100 millones de años (ver Robles *et al.*, 2004).

Por otra parte, la separación entre las dos subespecies puede indicarnos la edad máxima del cromosoma B de *E. plorans plorans*, puesto que, hasta el

momento, no se ha detectado la presencia de cromosomas B en otras subespecies (Jonh & Lewis 1965; López-León *et al.*, 2008). Esta edad sería inferior 3.29 millones de años, aproximadamente. Dada la capacidad invasiva de los cromosomas B parásitos, como son los de *E. plorans* cuando llegan a poblaciones nuevas, es concebible que la edad del B sea muy inferior a la cifra señalada. De hecho, las dos invasiones de cromosomas B registradas por nuestro grupo, en Torrox (Zurita *et al.*, 1998) y Pollensa (Riera *et al.*, 2004) se han producido con incrementos enormes de la frecuencia de Bs en el curso de menos de diez años. Además, estudios recientes de un marcador SCAR presente en los cromosomas B de esta especie han mostrado la práctica identidad de su secuencia de ADN en los Bs de poblaciones tan alejadas geográficamente como la Península Ibérica, Marruecos, Grecia o Armenia, lo que sugiere un origen único y reciente del SCAR, y por tanto del B, ya que este marcador no se encuentra, como tal, en los cromosomas A, sino separado en dos trozos independientes (Muñoz-Pajares *et al.*, en preparación). Las estimas de la edad de los cromosomas B en otras especies arrojan cifras muy variadas, desde los 8,000–10,000 años en el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt and Ruscoe, 1971) hasta dos millones de años en el maíz (Lamb *et al.*, 2007), pasando por los 750,000 años en *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010). En *E. plorans*, será necesario analizar comparativamente secuencias del B con las secuencias equivalentes en los cromosomas A, para obtener estimas más precisas de la edad del B.

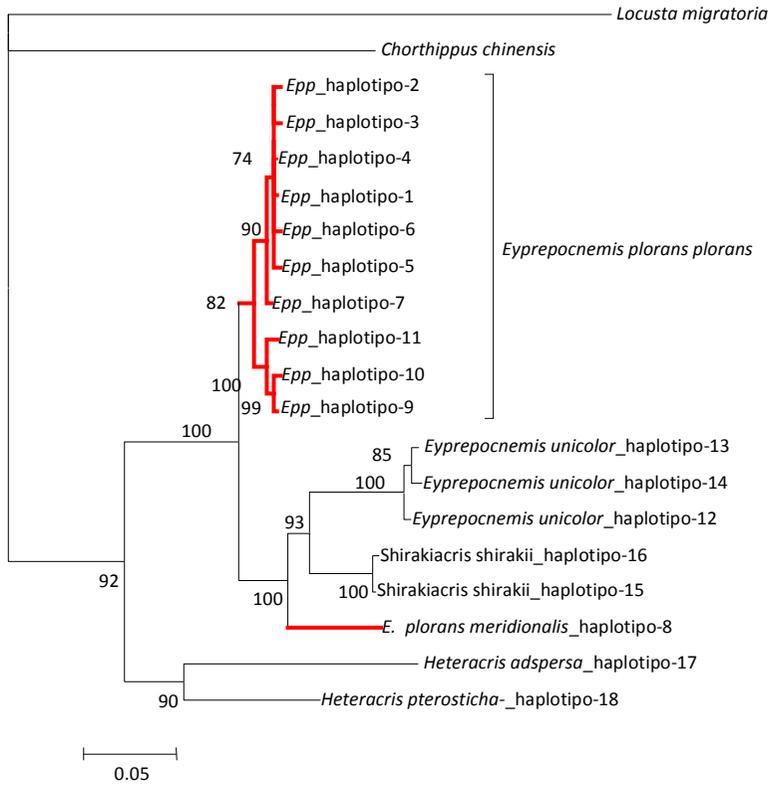


Figura 3.16. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana empleando MrBayes con las secuencias COI y COI-Leu concatenadas. En rojo podemos observar las ramas de los taxones que presentan ADN satélite.

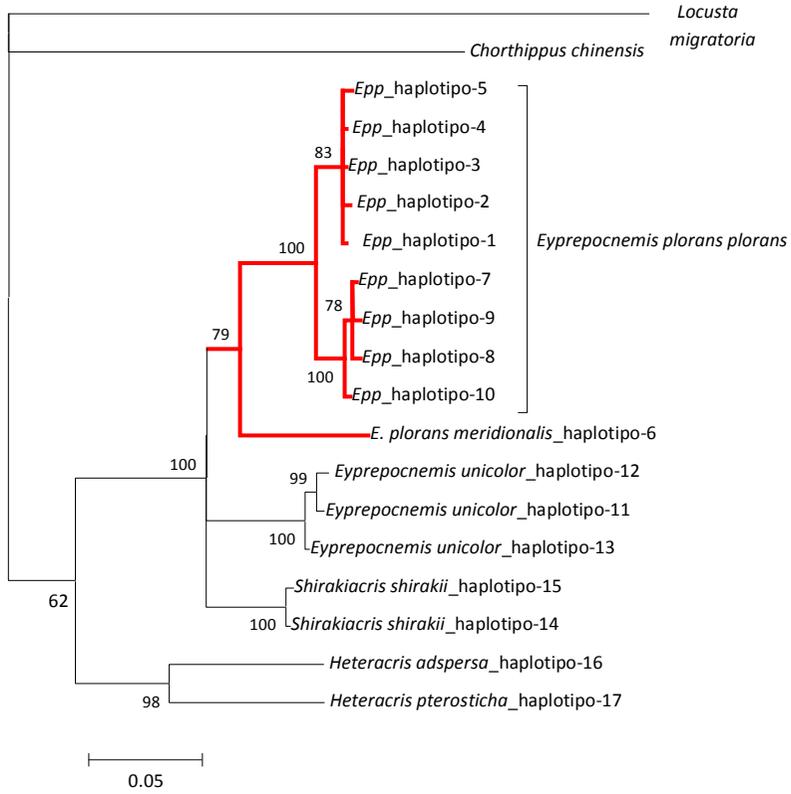


Figura 3.17. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana empleando MrBayes con la secuencia Nad5. En rojo podemos observar las ramas de los taxones que presentan ADN satélite.

Tabla 3.14. Relación de trabajos publicados en la clase Insecta con *COI* y *ND5* donde se citan valores de diversidad nucleotídica y haplotípica.

Autor	Especie	Escala geográfica		Diversidad	
		Nucleotídica	Haplotípica	Nucleotídica	Haplotípica
COI	Presente estudio	Subfamilia Eyprepocnemidinae	España, Marruecos, Sudáfrica, Grecia y este de Europa	0.033 - 0.0244	0.73 - 0.642
	Vandewoestijne <i>et al.</i> , 2004	<i>Aglais urticae</i>	Paleártico	0.009839	0.9647
	Anducho-Reyes <i>et al.</i> , 2008	<i>Dendroctonus mexicanus</i>	Méjico y Guatemala	0.0154	0.849
	Faccoli <i>et al.</i> , 2005	<i>Tomiscus destruens</i> <i>Tomiscus piniperda</i>	Italia	0.001172 - 0.005449 0.007681-0.000560	0.5667-0.3987 0.7576-0.1947
	Martisen <i>et al.</i> , 2009	Género <i>Dolichopoda</i>	España, Francia, Italia, Grecia y Rusia	0.005-0.0225	--
Maroja <i>et al.</i> , 2007	<i>Dendroctonus rufipennis</i>	Norteamérica	0.046-0	1-0	
ND5	Presente estudio	Subfamilia Eyprepocnemidinae	España, Marruecos, Sudáfrica, Grecia y este de Europa	0.02938	0.773
	Birungi & Munstermann, 2002	<i>Aedes albopictus</i> (Diptera)	EEUU, Brasil, Madagascar, Malasia, Indonesia y Japón	0.0158	0.539
	Temu & Yan, 2005	<i>Anopheles arabiensis</i> (Diptera)	Kenya	0.0047-0.0057	0.83-0.86
	Norgate <i>et al.</i> , 2009	<i>Heteronympha merope</i> (Lepidoptera)	Australia	0.00288	--
	Solorzano <i>et al.</i> , 2010	<i>Aedes vexans</i> (Diptera)	Nueva Orleans	0.006-0.013	0.887-0.975

#### **4. Análisis de la estructura genética y del flujo génico en *Eyprepocnemis plorans***





## 4.1. INTRODUCCIÓN

### 4.1.1. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs)

Los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) son marcadores moleculares dominantes basados en microsatélites ampliamente utilizados en estudios genéticos. Para su amplificación por PCR (ISSR-PCR) se emplean cebadores complementarios a un microsatélite o SSR (Simple Sequence Repeat). Estos cebadores se diseñan para unirse a un motivo repetido de di- o trinucleótidos de la secuencia de un microsatélite, el cual está formado por secuencias cortas (generalmente menos de 100 pb) compuestas de unidades repetidas en tándem de penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos dispersas por el genoma nuclear eucarionte, generalmente en las regiones no codificantes. De este modo, estos marcadores nos permiten obtener los niveles de variación en las regiones del genoma con microsatélites.

La longitud de los microsatélites es altamente variable entre individuos puesto que experimentan altas tasas de mutación, ya que cuando el ADN se replica, puede ocurrir un deslizamiento de la cadena molde o de la de nueva síntesis generando deleciones o adiciones de nuevas unidades de repetición, respectivamente. El resultado es que las cadenas resultantes presentarán un mayor o menor número de unidades de repetición que las parentales (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000).

Mediante esta técnica utilizamos un único cebador cuya secuencia sea complementaria a dos microsatélites inversamente orientados y que se encuentren lo suficientemente cerca (a menos de 2000 pb, Luque *et al.*, 2002) como para que pueda ser amplificada la secuencia que hay entre ellos. Es conveniente incorporar secuencias de anclaje de varios nucleótidos (dos o tres) en los extremos 3' o 5' del cebador para evitar la aparición de variabilidad en el producto de PCR, que puede producirse por el deslizamiento del cebador en la cadena de ADN, provocado por la existencia de los motivos repetidos en tándem que caracterizan los microsatélites, asegurándonos de este modo que la amplificación se inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite. Como podemos observar en la figura 4.1, el producto de PCR resultante del uso de cebadores con anclaje en 3' es de menor tamaño que el obtenido con cebadores con anclaje en 5', ya que estos últimos incluyen los microsatélites flanqueantes (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001; Pradeep, 2002). También pueden usarse dos cebadores diferentes (técnica conocida como ppISSR-PCR, de "primer pair").

Estas unidades de anclaje suelen incluir posiciones variables del tipo R=A/G o Y=C/T, lo que permite amplificar un mayor número de bandas; además, distintos

cebadores con el mismo motivo de repetición pero bases de anclaje diferentes, como por ejemplo  $(CT)_8$ -RG y  $(CT)_8$ -RA, amplificarán un patrón de bandas diferente.

Estos marcadores se consideran dominantes, de forma que la presencia de la banda corresponde al fenotipo dominante (homocigoto o heterocigoto) mientras que su ausencia representa el fenotipo recesivo, asumiéndose que existen dos alelos por locus.

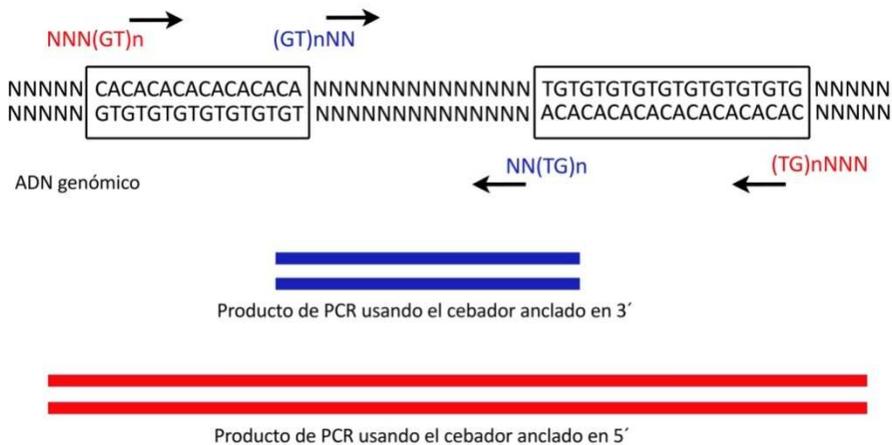


Figura 4.1. Amplificación de un marcador ISSR. En el interior de los rectángulos observamos dos microsatélites, que presentan el mismo motivo de repetición, orientados inversamente y cercanos el uno del otro. En rojo se representa el cebador con anclaje en 5' y su producto de PCR, que incluye los dos microsatélites, mientras que en azul se observa el primer anclado en 3', cuyo producto de PCR sólo incluye la secuencia intermedia entre los dos microsatélites.

El uso de marcadores ISSR presenta numerosas ventajas, entre las que cabe destacar que no es necesario disponer de altas concentraciones ADN genómico de partida para su amplificación y que no se requiere información previa sobre la secuencia del genoma del organismo que vamos a estudiar para el diseño de los primers. Además presenta una alta reproducibilidad, puesto que se emplean altas temperaturas de alineación y podemos visualizarlos fácilmente en un gel de agarosa. Junto con los RAPDs, los ISSRs se consideran los marcadores dominantes con mayor reproducibilidad (Fang & Roose, 1997; Nagaoka & Ogihara 1997).

Pero igualmente presentan ciertas desventajas que deben mencionarse, puesto que al ser marcadores dominantes la ausencia del marcador puede deberse a varios factores, entre los que se encuentran la ausencia de la diana completa de

unión del primer debido a una mutación puntual, reordenaciones estructurales en los cromosomas durante la meiosis o inserciones o deleciones en la región microsatélite. Además, por tratarse de marcadores dominantes, la imposibilidad de distinguir entre homocigotos dominantes o heterocigotos impide realizar estimas como  $F_{is}$  o  $F_{it}$  de Wright (1965).

Los ISSRs fueron descritos en 1994 (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994) y los primeros experimentos se realizaron en plantas, pero, poco a poco, su uso se ha extendido potenciado por la facilidad de esta técnica y su capacidad para detectar altos niveles de variación genética. Las aplicaciones de esta técnica han sido muy variadas, utilizándose en la diferenciación de variedades intraespecíficas de cultivos con importancia económica como el maíz (Kantety *et al.*, 1995), el trigo (Nagaoka & Ogihara, 1997) o la cebada (Fernández *et al.*, 2002), en la caracterización genética de diferentes organismos (Sobhian *et al.*, 2003; Cano *et al.*, 2005), para establecer diversidad genética (Qui *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), para identificar loci asociados a caracteres o ligados a genes implicados en la resistencia a enfermedades (Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Arcade *et al.*, 2000), en el establecimiento de relaciones filogenéticas (Wolfe and Liston, 1998a; Joshi *et al.*, 2000; Wolfe and Randle, 2001; Datwyler & Wolfe, 2004; Wu *et al.*, 2005) e incluso en la elaboración de mapas genéticos gracias a la amplia distribución de los microsatélites en los genomas (Kojima *et al.*, 1998).

En insectos, concretamente, se han empleado en la caracterización de diferentes linajes del gusano de seda, *Bombyx mori* (Reddy *et al.*, 1999; Nagaraju *et al.*, 2001; Pradeep *et al.*, 2005) y *Antheraea mylitta* (Kar *et al.*, 2005), así como en estudios de hibridación (Hundsdoerfer *et al.*, 2005), de diversidad y genética de poblaciones (Phillips *et al.*, 2002; De León & Jones, 2005; Ren *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2007) y de la conservación (Vijayan *et al.*, 2006).

Puesto que los marcadores ISSR evolucionan rápidamente, proporcionan un elevado número de marcadores polimórficos (Roux *et al.*, 2007). Por tanto, esta técnica es útil para la identificación genotípica de individuos, incluso estrechamente relacionados, y para estudios de la estructura poblacional en especies no modelo donde la información genómica molecular es escasa, como es el caso del saltamontes *E. plorans*. Nuestro estudio con estos marcadores pretende averiguar aspectos evolutivos desconocidos en esta especie, tales como la estructura poblacional y la tasa de migración entre poblaciones, que pueden ser muy informativos con respecto a los factores que determinan la distribución geográfica de los cromosomas B en esta especie. Para ello, hemos incluido en nuestro análisis diez poblaciones de dos áreas geográficas de la Península Ibérica, una en las costas granadina y malagueña, donde los cromosomas B están universalmente presentes, y la otra en zonas de interior en las provincias de Albacete y Murcia, en la cuenca del

río Segura, donde previamente hemos observado que los cromosomas B (de una variante diferente a los del área costera) no están presentes en la cabecera de los ríos Segura y Mundo (Cabrero *et al.*, 1997).

#### 4.1.2. ALLELIC DROPOUT

Los marcadores ISSR presentan varias ventajas que han facilitado su aplicación en una variedad de organismos, ya que no requieren altas concentraciones de ADN, pueden visualizarse fácilmente en geles tanto de agarosa como de poliacrilamida, no es necesario conocer la secuencia del genoma que se va a estudiar, y muestran altos niveles de variabilidad poblacional. No obstante, al estar basados en amplificación mediante PCR, presentan también dificultades, un problema que no es exclusivo de estos marcadores sino que afecta también a otros basados en la PCR, tales como microsatélites y AFLPs. Uno de los problemas es debido a lo que se ha denominado *Allelic Dropout*, que consiste en el fallo estocástico de la amplificación de uno de los dos alelos que porta cada individuo para un determinado locus (Navidi *et al.*, 1992; Taberlet *et al.*, 1996), lo que conlleva a un genotipado erróneo de los individuos analizados para ese locus. Se produce cuando el ADN es pipeteado en la máster mix y de nuevo cuando los cebadores y la polimerasa se unen al ADN durante el proceso de PCR; si el ADN está a una concentración baja y es de mala calidad, un alelo puede, por pura casualidad, ser amplificado más que otro (Miller *et al.*, 2002), aunque también se ha descrito este fenómeno para el caso de ADN de alta calidad (Soulsbury *et al.*, 2007).

El *dropout* puede producirse durante el proceso de pipeteo, en la preparación de la máster mix, y también cuando los cebadores y la polimerasa se unen al ADN durante el proceso de PCR. Incluso si el ADN está a baja concentración, o es de mala calidad, un alelo puede, por pura casualidad, ser amplificado más que otro (Miller *et al.*, 2002; Gerloff *et al.*, 1995; Gagneaux *et al.*, 1997; Goosens *et al.*, 1998). Pero también se ha descrito este fenómeno incluso en el caso de ADN de alta calidad (Jeffery *et al.*, 2001; Soulsbury *et al.*, 2007), por lo que el *allelic dropout* puede hacernos cometer errores de genotipado que pueden sesgar significativamente los resultados de muchas investigaciones. Además, y puesto que estos marcadores se espera que se hereden según las leyes de Mendel (Tsumura *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1999; Fang & Rose, 1997), el *dropout* podría ser responsable de distorsiones en la segregación en favor del alelo “ausencia de banda”, aunque se han descrito otros posibles fenómenos como los causantes de algunas distorsiones observada en sólo uno de los sexos (McMeniman & Barker, 2006). Es por ello que todo estudio de ISSRs debería incluir un análisis del posible efecto del *dropout* sobre el genotipado y también sobre los análisis de herencia de estos marcadores

(Hoffman & Amos 2005, Tester *et al.*, 2006; Johnson & Haydon, 2007; Soulsbury *et al.*, 2007).

Nuestro estudio con los marcadores ISSR en *E. plorans* incluye, por tanto, un análisis de la posible incidencia del *dropout*, tanto al nivel del genotipado de los individuos, analizando la repetibilidad de los diagnósticos en dos situaciones diferentes, como también las posibles distorsiones en la segregación en cruzamientos controlados, y la posibilidad de que las distorsiones sean producto del *dropout*.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Análisis de los ISSRs

La abundancia y variabilidad del número de marcadores ISSR obtenidos mediante PCR depende del motivo de repetición considerado y de las características del cebador empleado, así como de las condiciones de amplificación y del organismo estudiado. Nosotros hemos analizado muestras del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* procedentes de 10 localidades de la Península Ibérica, cinco capturadas en las costas granadina (Salobreña) y malagueña (Algarrobo, Torrox, Nerja0 y Tetuán) y las otras cinco (Claras, Socovos, El Gallego, Mundo y Calasparra) en las provincias de Albacete y Murcia, en la cuenca del río Segura (figura 2.3-2.14 del capítulo 2 “Material y Métodos” y tabla 4.1). En total, hemos detectado 97 marcadores ISSR (tabla 4.2), con los que hemos realizado un análisis de la dinámica y estructura genética de estas poblaciones.

Tabla 4.1. Número de individuos analizados con los diferentes cebadores para ISSRs.

Población	Nº de individuos analizados por población y cebador					
	ISSR6	ISSR7	ISSR14	ISSR26	ISSR39	ISSR43
Algarrobo	28	<b>29</b>	29	28	26	28
Torrox	26	23	<b>27</b>	25	18	25
Nerja0	<b>30</b>	29	29	28	26	28
Tetuán	29	28	29	29	26	<b>30</b>
Salobreña	<b>23</b>	21	23	23	21	22
Claras	<b>7</b>	7	7	7	7	7
El Gallego*	47	48	48	47	36	43
Socovos**	<b>15</b>	13	14	14	13	12
Mundo	<b>15</b>	15	15	15	10	15
Calasparra	28	29	28	27	27	<b>30</b>
Total	248	242	249	243	210	240

El número total de amplificaciones ha sido de 1432. En rojo aparecen el número máximo de individuos analizados en cada población (\*salvo en El Gallego, donde este valor ha sido de 50), de modo que el número total de individuos analizados ha sido de 256.

\*\*Todos los individuos empleados han sido machos salvo en esta población, donde se han estudiado, además, cinco hembras para aumentar el número de individuos analizados.

Tabla 4.2. Número de marcadores obtenidos con cada uno de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia de Oligonucleótidos (5'→3')	Nº marcadores
ISSR-6	(CT)8-RG	16
ISSR-7	(CTC)4-RC	19
ISSR-14	(CT)8-RA	11
ISSR-26	(CT)8-AC	22
ISSR-39	(GA)8-YG	18
ISSR-43	HVH-(TCC)5	11
		Total = 97

La figura 4.2 muestra ejemplos de los geles obtenidos tras la amplificación con cada uno de los cebadores utilizados, y la tabla 4.3 resume el tamaño de los fragmentos obtenidos.

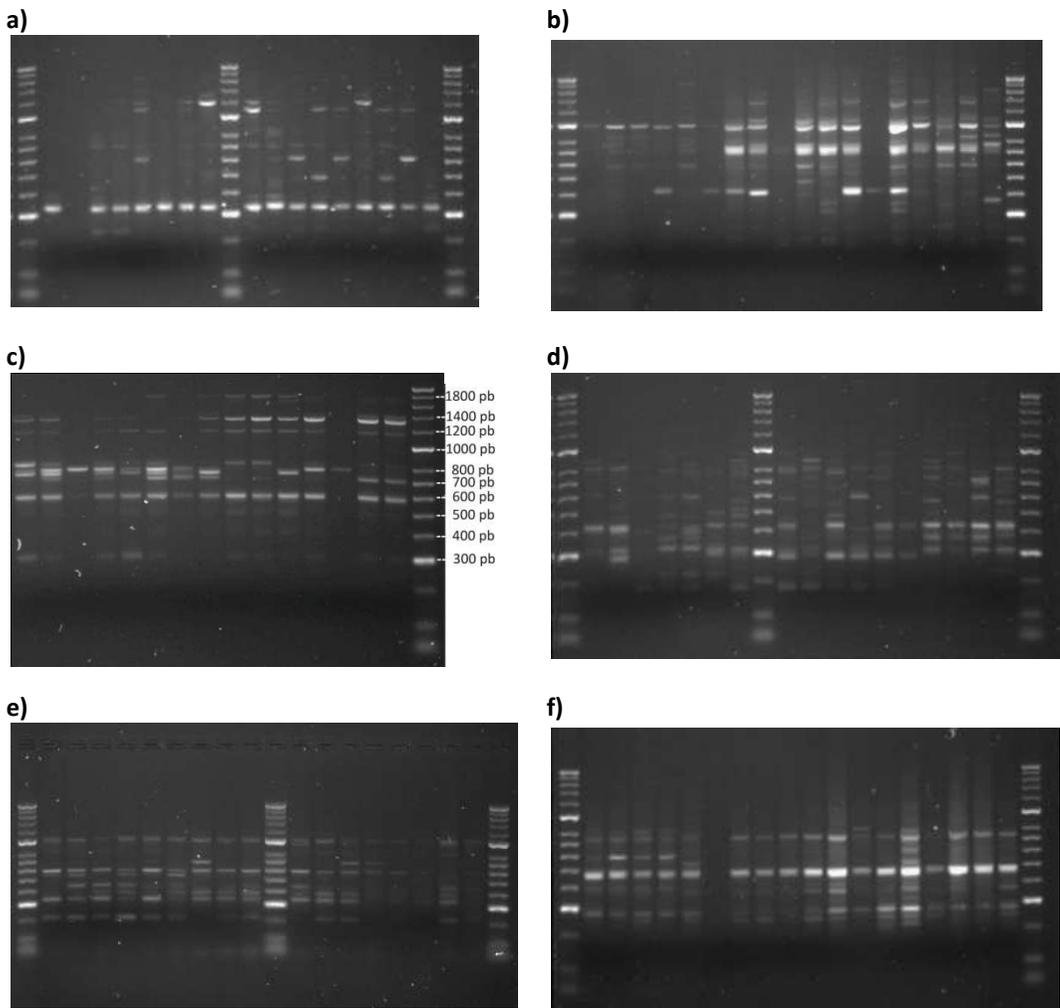


Figura 4.2. Geles de agarosa al 1.5% mostrando algunos ejemplos de los fragmentos obtenidos mediante los cebadores ISSR6 (a), ISSR7 (b), ISSR14 (c), ISSR26 (d), ISSR39 (e) e ISSR43 (f).

Tabla 4.3. Tamaño, en pares de bases, de cada uno de los fragmentos amplificados con los diferentes cebadores empleados.

ISSR6	ISSR7	ISSR14	ISSR26	ISSR39	ISSR43
250	250	300	280	180	250
330	320	400	300	200	280
350	350	500	340	220	320
380	380	600	380	250	380
450	430	750	430	280	400
500	480	800	480	320	490
550	550	850	500	390	540
630	600	1250	550	410	600
750	650	1400	600	450	650
800	700	1450	650	500	780
900	800	1800	700	550	800
1000	900		750	600	
1200	1000		800	650	
1300	1100		900	700	
1400	1150		1000	800	
1600	1400		1100	880	
	1600		1200	1000	
	1800		1300	1100	
	2000		1600		
			1800		
			2000		
			>2000		

La presencia o ausencia de cada fragmento fue codificada como 1 y 0, respectivamente, y su frecuencia fue analizada con el programa Hickory v1.1 (Holsinger KE & Lewis PO, 2003), teniendo en cuenta el comportamiento dominante de estos marcadores.

Los anexos 4.1-4.6 muestran la frecuencia de cada uno de los marcadores en las diez poblaciones analizadas. Además estos marcadores nos han permitido analizar la estructura genética de las poblaciones analizadas, con el software Structure (Falush *et al.*, 2007), así como una estima del grado de aislamiento por distancia entre poblaciones, mediante el test de Mantel.

#### 4.2.1.1. Polimorfismo de los marcadores ISSR

El valor del porcentaje de loci polimórficos es del 100% si consideramos el conjunto de las diez poblaciones analizadas, mientras que desciende al 97% si sólo tenemos en cuenta a las poblaciones de la costa y al 96% en el conjunto de poblaciones del Segura. En la tabla 4.4. Podemos observar el porcentaje de loci polimórficos en cada una de las poblaciones por separado.

Tabla 4.4. Porcentaje de loci polimórficos en las poblaciones analizadas.

Población	Nº de loci polimórficos	% de loci polimórficos
Algarrobo	76	78
Torrox	79	81
Nerja0	78	80
Tetuán	73	75
Salobreña	72	74
Promedio Costa	75.6 ( $\pm 3.05$ )	77.6 ( $\pm 3.05$ )
Claras	58	60
El Gallego	83	85
Socovos	57	59
Mundo	76	78
Calasparra	72	74
Promedio Segura	69.2 ( $\pm 11.39$ )	71.2 ( $\pm 11.39$ )

Los valores de polimorfismo de los marcadores en las poblaciones de la costa son mayores que en las poblaciones del Segura, pero mediante un test t-Student hemos podido comprobar que estas diferencias en el número de loci polimórficos entre ambas regiones no son significativas ( $t=1.21$ , g.l.=8,  $p=0.26$ ; previamente nos hemos cerciorado de que las muestras siguen una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilks,  $w=0.85$ ,  $p=0.066$ ).

#### 4.2.1.2. Análisis de la diversidad genética entre poblaciones geográficas

El análisis de los datos ISSR mediante métodos bayesianos, empleando el software Hickory v1.1 (Holsinger KE & Lewis PO, 2003), nos ha permitido realizar una estima del nivel de diferenciación poblacional existente entre las diez poblaciones empleadas en este estudio.

Los datos fueron analizados según cuatro modelos diferentes: i) el modelo completo (*full model*), donde los valores de diferenciación poblacional ( $\theta$ ,  $\theta$ , análogo al parámetro  $F_{st}$  de Wright) y de endogamia ( $f$ , análogo a  $F_{is}$ ) son distintos de cero; ii) el modelo  $f=0$ , que asume que no hay consanguinidad intrapoblacional; iii) el modelo  $\theta=0$ , basado en la ausencia de diferenciación poblacional, y iv) el modelo *f libre* o *free model*, donde se eligen aleatoriamente valores de  $f$  durante el análisis de los datos sin tener en cuenta información previa.

La elección del modelo al que más se ajustan nuestros datos se basa en el parámetro DIC, análogo a AIC en la selección de modelos bayesianos (Spiegelhalter *et al.*, 2002). El modelo más apropiado será aquel que minimiza los valores de la suma de la medida del ajuste del modelo,  $D_{bar}$ , con la medida de la complejidad del modelo  $pD$  ( $DIC=D_{bar}+pD$ ), siendo  $pD$  el número efectivo de parámetros estimados ( $pD = D_{bar} - D_{hat}$ ) y  $D_{hat}$ , la desviación de la media posterior de los parámetros. La

tabla 4.5 muestra que el valor más bajo de DIC indicaría que el modelo que mejor se ajustaría a nuestros datos es el *Full model*; también hay que tener en cuenta los valores más bajos del parámetro *Dbar* (que nos vuelve a indicar que el *Full model* es el más apropiado). Pero Hickory presenta limitaciones en el cálculo de la endogamia para marcadores dominantes, como es nuestro caso, puesto que no es posible diferenciar los heterocigotos de los homocigotos dominantes; los autores recomiendan observar el valor de endogamia proporcionado por este programa y valorar si es o no congruente con los conocimientos previos que se tienen sobre el sistema de apareamiento del organismo con el que se está trabajando. El valor de endogamia que Hickory nos calcula con nuestros datos bajo el *Full model* alcanza un valor de 0.95, demasiado alto para un organismo poliginándrico como *E. plorans* (Pardo *et al.*, 1995). Esto nos lleva a elegir el modelo  $f=0$  como aquel al que mejor se ajustan nuestros datos, teniendo en cuenta, además, que este modelo obtuvo valores muy próximos a los del *full model* (ver tabla 4.5).

Tabla 4.5. Parámetros estadísticos de los modelos en base a los que se analizan los datos mediante inferencia bayesiana con Hickory.

Modelo	Dbar	Dhat	pD	DIC
<i>Full</i>	3073.18	2495.46	577.726	3650.51
$f=0$	3075.32	2480.37	594.951	3670.27
<i>theta=0</i>	5884.71	5792.54	92.175	5976.89
<i>ffree</i>	3202.31	2490.61	711.692	3914

La existencia de grandes diferencias entre los valores de DIC de diferentes modelos indica que hay diferencias genéticas entre las poblaciones analizadas.

En el modelo  $f=0$ , Hickory proporciona tres valores diferentes para theta:  $\theta^{(i)}$ , que corresponde directamente al parámetro  $F_{st}$  de Wright,  $\theta^{(ii)}$ , que es análogo al parámetro  $G_{st}$  de Nei, la mejor medida de la proporción de diversidad genética debida a diferencias entre poblaciones contemporáneas y  $\theta^{(iii)}$ , que estima la diversidad genética pero requiere haber muestreado el total de poblaciones potencialmente intercambiadoras de genes (de no ser así,  $\theta^{(iii)}$  será la mejor estima de diversidad genética).

Otros parámetros calculados por Hickory son  $h_s$ , que estima la diversidad genética de cada población como la media de la heterocigosidad en caso de panmixia y  $H_s$ , definido como la media de todas las  $h_s$  de todas las poblaciones analizadas. Asimismo nos da información sobre la diversidad genética total del conjunto de poblaciones analizadas, basada en la media de las frecuencias alélicas en las poblaciones ( $H_t$ ). Cada uno de estos valores va acompañado de la desviación estándar y el intervalo de confianza al 97.5% (tabla 4.6).

Hickory proporciona también un parámetro bayesiano (Gst-B) análogo a Gst de Nei. Anteriormente hemos comentado que  $\theta^{(II)}$  también es análogo a Gst de Nei, de manera que, a menos que se tengan razones para ignorar la estocasticidad en el proceso evolutivo, tendrá más importancia el valor que tome  $\theta^{(II)}$  que el de Gst-B. En nuestro caso, no obstante, ambos valores son casi idénticos (tabla 4.6).

Tabla 4.6. Valores de la diversidad genética bajo el modelo  $f=0$  obtenidos mediante Hickory.

Parámetro	Media	SD	2.5%	97.5%
theta-I, $\theta^{(I)}$	0.297	0.022	0.256	0.343
theta-II, $\theta^{(II)}$	0.108	0.007	0.095	0.124
theta-III, $\theta^{(III)}$	0.080	0.004	0.074	0.087
hs[Algarrobo]	0.227	0.005	0.217	0.237
hs[Torrox]	0.228	0.005	0.218	0.239
hs[Nerja0]	0.216	0.005	0.206	0.226
hs[Tetuán]	0.226	0.005	0.217	0.236
hs[Salobreña]	0.227	0.005	0.217	0.237
hs[Claras]	0.225	0.008	0.210	0.241
hs[El Gallego]	0.209	0.004	0.201	0.217
hs[Socovos]	0.192	0.007	0.179	0.205
hs[Mundo]	0.233	0.007	0.219	0.246
hs[Calasparra]	0.209	0.005	0.199	0.219
Hs	0.219	0.002	0.215	0.223
Ht	0.245	0.002	0.241	0.249
Gst-B	0.105	0.005	0.096	0.115

A partir de Gst podemos estimar el número medio histórico de migrantes (Nm) en el conjunto de poblaciones mediante la ecuación  $Nm = 0.25 (1 - Gst) / Gst$ , que resultó ser próximo a 2. Esto indica que la diversificación genética de estas poblaciones por deriva genética es impedida por un elevado flujo génico.

Este mismo análisis lo hemos repetido dos veces más, para subconjuntos de poblaciones: i) con las 5 poblaciones costeras, y ii) con las 5 poblaciones del Segura.

Al igual que ocurría cuando hemos analizado las diez poblaciones conjuntamente, al analizarlas por separado observamos que los valores más bajos tanto de DIC como de Dbar corresponden al *Full model*, pero volvemos a encontrarnos con el mismo problema: los valores de endogamia que nos presenta el *Full model* son demasiado elevados para *E. plorans* (0.87 y 0.83 para las poblaciones del Segura y para las de la costa, respectivamente) que, como comentamos anteriormente, nos parecen elevados para una especie poliginándrica. Esto nos lleva, de nuevo, a escoger el modelo  $f=0$  como aquel al que mejor se ajustan nuestros datos, dado que en ambos análisis los valores de DIC entre los modelos *Full* y  $f=0$  son muy similares (tablas 4.7 y 4.9).

Tabla 4.7. Parámetros estadísticos correspondientes a las poblaciones costeras de los modelos bajo los que se analizan los datos mediante inferencia bayesiana con Hickory.

<b>Modelo</b>	<b>Dbar</b>	<b>Dhat</b>	<b>pD</b>	<b>DIC</b>
<i>Full</i>	1636.85	1354.79	282.062	1918.92
<i>f=0</i>	1644.52	1352.56	291.964	1936.49
<i>theta=0</i>	2451.95	2364.96	86.99	2538.94
<i>ffree</i>	1692.48	1330.12	362.363	2054.85

Tabla 4.8. Valores de la diversidad genética en base al modelo *f=0* obtenidos mediante Hickory para las poblaciones costeras.

<b>Parámetro</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>2.5%</b>	<b>97.5%</b>
theta-I, $\theta^{(I)}$	0.291	0.026	0.243	0.347
theta-II, $\theta^{(II)}$	0.058	0.007	0.046	0.072
theta-III, $\theta^{(III)}$	0.040	0.003	0.034	0.047
hs[Algarrobo]	0.235	0.005	0.225	0.244
hs[Torrox]	0.235	0.005	0.225	0.246
hs[Nerja0]	0.225	0.005	0.216	0.236
hs[Tetuán]	0.235	0.005	0.225	0.244
hs[Salobreña]	0.236	0.005	0.226	0.247
Hs	0.233	0.003	0.228	0.238
Ht	0.245	0.003	0.240	0.250
Gst-B	0.049	0.004	0.041	0.058

Las tablas 4.8 y 4.10 muestran los valores de diversidad genética obtenidos como resultado de los análisis parciales de las poblaciones de la costa y del Segura.

Tabla 4.9. Parámetros estadísticos correspondientes a las poblaciones del Segura de los modelos en base a los que se analizan los datos mediante inferencia bayesiana con Hickory.

<b>Modelo</b>	<b>Dbar</b>	<b>Dhat</b>	<b>pD</b>	<b>DIC</b>
<i>Full</i>	1440.64	1233.78	206.866	1647.51
<i>f=0</i>	1442.14	1212.62	229.521	1671.66
<i>theta=0</i>	1885.79	1801.48	84.3044	1970.09
<i>ffree</i>	1468.48	1175.53	292.951	1761.43

Tabla 4.10. Valores de la diversidad genética bajo el modelo  $f=0$  obtenidos mediante Hickory para las poblaciones del Segura.

Parámetro	Media	SD	2.5%	97.5%
theta-I, $\theta^{(I)}$	0.286	0.028	0.235	0.345
theta-II, $\theta^{(II)}$	0.040	0.006	0.030	0.053
theta-III, $\theta^{(III)}$	0.029	0.004	0.023	0.036
hs[Clarás]	0.224	0.007	0.211	0.238
hs[El Gallego]	0.218	0.004	0.209	0.226
hs[Socovos]	0.203	0.006	0.191	0.215
hs[Mundo]	0.235	0.006	0.223	0.246
hs[Calasparra]	0.217	0.005	0.208	0.227
Hs	0.219	0.003	0.213	0.226
Ht	0.227	0.003	0.221	0.234
Gst-B	0.033	0.004	0.025	0.043

El número de migrantes, estimado a partir de  $G_{st}$ , fue de aproximadamente para las poblaciones de la costa y de 7 para las del Segura.

Como podemos observar en las tablas 4.8 y 4.10, el valor de theta II es menor en las poblaciones del Segura que en las de la costa.

#### 4.2.1.3. Análisis de la estructura genética de las poblaciones

Para conocer en mayor profundidad la estructura genética de las poblaciones analizadas, hemos empleado el software Structure v2.3.1 (Falush *et al.*, 2007).

Dado que el análisis con Hickory había revelado la existencia de diferenciación entre poblaciones, quisimos averiguar primero, con Structure, el número de grupos poblacionales (K) que mejor explicaba la variación genética observada analizada. Para ello, investigamos valores de K desde 2 hasta 10, es decir, entre el mínimo número de grupos que podrían existir (2) y el máximo que coincide con el número de poblaciones reales.

El modelo utilizado en nuestros análisis ha sido el *admixture model* o modelo de mezcla con un valor de *burn-in* de 50000 (cuanto debe correr la simulación antes de comenzar a tomar datos, para reducir al mínimo el efecto del comienzo de la configuración de la carrera del programa) y de repeticiones de las Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) tras el *burn-in* de 100000. Con estos parámetros hemos realizado tres análisis diferentes: i) uno con las todas las poblaciones, ii) otro con las cinco poblaciones costeras y, ii) otro con las cinco poblaciones del Segura.

### ❖ Análisis de todas las poblaciones

En el anexo 4.7 se resumen los datos correspondientes a los valores de  $L(K)$  asignados a cada valor de  $K$ ; hemos realizado diez réplicas para cada valor de  $K$  asignado.

Para conocer el valor de  $K$  que mejor se ajusta a nuestros datos hemos seguido el método descrito en Evanno *et al.* (2005). Partimos de las 10 réplicas para cada valor de  $K$  asignado calculando la diferencia entre dos valores de  $L(K)$  consecutivos, diferencia que corresponde a la tasa de cambio de la función de probabilidad con respecto a  $K$  y que vamos a anotar como  $L'(K)$ , siendo  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  (ver anexo 4.8); para este paso ha sido necesario obtener previamente valores de  $L(K)$  para  $K=1$  y  $K=11$  (anexo 4.7).

Posteriormente, calculamos la diferencia, en valor absoluto, entre dos valores consecutivos de  $L'(K)$  como  $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$ , que corresponde a la tasa de cambio de segundo orden de  $L(K)$  con respecto a  $K$  (ver anexo 4.9).

Finalmente, estimamos  $\Delta K$  como la media de los diez valores absolutos de las réplicas de  $L''(K)$  dividido por la desviación estándar de  $L(K)$ , es decir:  $\Delta K = m(|L''(K)|) / s[L(K)]$  (ver anexo 4.10).

El valor de  $K$  al que mejor se ajustan nuestros datos corresponde al valor modal de la distribución que, como muestra la figura 4.3, correspondería a un valor de  $K$  igual a 2.

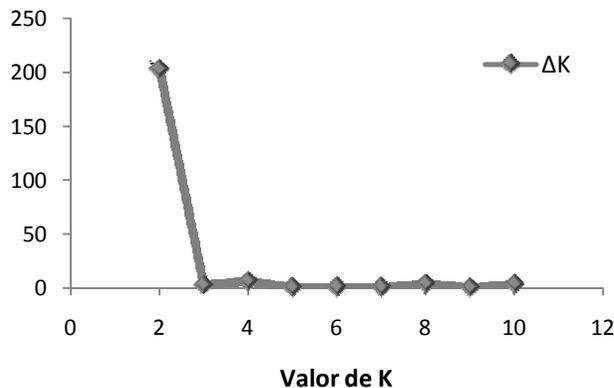


Figura 4.3. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

El software Structure proporciona, además, información sobre la proporción de los individuos de cada población real muestreada (en este caso, diez poblaciones)

que quedaría encuadrado dentro de cada uno de los dos grupos identificados por su similitud genética ( $K=2$ ). Como se observa en la tabla 4.11, la mayoría de los individuos muestreados en las localidades costeras quedaron encuadrados en el grupo 1, mientras que la mayoría de los individuos procedentes de las localidades del Segura fueron asignados al grupo 2, indicando que las poblaciones que componen ambos grupos están genéticamente más relacionadas entre sí que con las del otro grupo de poblaciones, evidenciando así una diferenciación genética muy clara entre las poblaciones de ambas zonas geográficas.

Tabla 4.11. Proporción de miembros de cada población predefinida incluida en cada uno de los dos grupos ( $K=2$ ).

Población	Nº individuos	Grupo 1	Grupo 2
Algarrobo	29	<b>0.930</b>	0.070
Torrox	27	<b>0.975</b>	0.025
Nerja0	30	<b>0.980</b>	0.020
Tetuán	30	<b>0.965</b>	0.035
Salobreña	23	<b>0.932</b>	0.068
Claras	7	0.055	<b>0.945</b>
El Gallego	50	0.093	<b>0.907</b>
Socovos	15	0.017	<b>0.983</b>
Mundo	15	0.042	<b>0.958</b>
Calasparra	30	0.059	<b>0.941</b>

La ascendencia de cada individuo respecto a cada uno de los dos grupos se muestra en los anexos 4.11 y 4.12, y estos datos aparecen representados gráficamente, a continuación, en la figura 4.4.

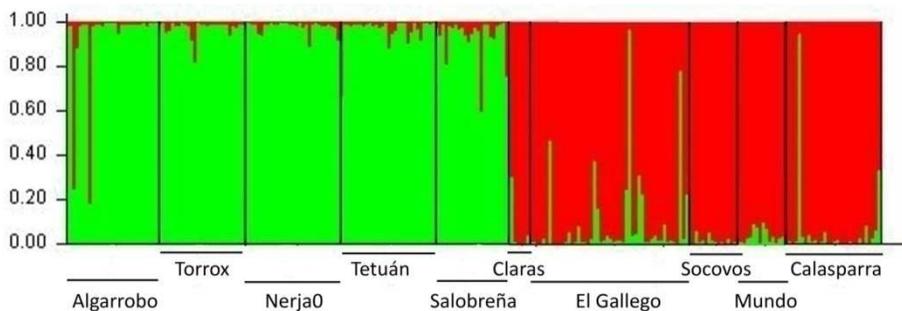


Figura 4.4. Representación de la ascendencia de cada individuo a cada uno de los dos grupos. Cada una de las barras verticales representa a uno de los 256 individuos analizados. El color verde representa a las poblaciones costeras mientras que el rojo representa a las del Segura. La longitud de las barras verticales es proporcional a la de los valores inferidos de ascendencia de los individuos a cada uno de los dos grupos.

### ❖ Análisis de las poblaciones costeras

Siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente, obtuvimos los valores resumidos en el anexo 4.13 para  $L(K)$  en función de los valores de  $K$  entre 2 y 5, con sus réplicas correspondientes. Posteriormente calculamos los valores de  $L'(K)$  y  $L''(K)$  (ver anexos 4.14 y 4.15), así como  $\Delta K$  (anexo 4.16). En este caso, el valor de  $K$  que más se ajusta a nuestros datos es 4 (figura 4.5).

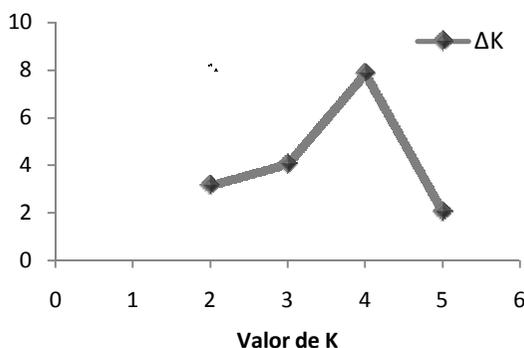


Figura 4.5. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

La tabla 4.12 muestra la proporción de miembros de cada una de las cinco poblaciones predefinidas en los cuatro grupos establecidos por Structure, y la figura 4.6 muestra la representación gráfica de estos cuatro grupos donde podemos distinguir un primer grupo (en color azul) representado mayoritariamente por los individuos de Algarrobo (que es la población más al oeste), el segundo grupo (en color rojo) mayoritariamente representado por los individuos de Salobreña (la población más oriental de las cinco, y más alejada geográficamente del resto), y un tercer y un cuarto grupo, donde aparecen mezclados individuos procedentes de las tres poblaciones más cercanas geográficamente, Torrox, Tetuán y Nerja0.

Tabla 4.12. Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los cuatro grupos ( $K=4$ ).

Población	Nº individuos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3	Grupo 4
Algarrobo	29	<b>0.703</b>	0.071	0.175	0.051
Torrox	27	0.290	0.393	0.291	0.025
Nerja0	30	0.503	0.035	0.434	0.029
Tetuán	30	0.343	0.131	0.499	0.026
Salobreña	23	0.030	0.012	0.017	<b>0.940</b>

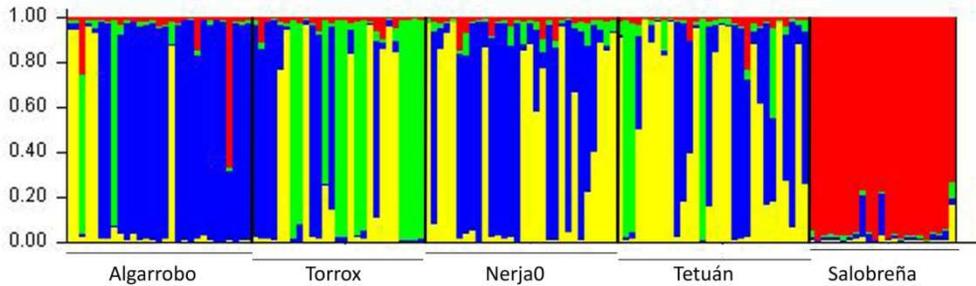


Figura 4.6. Representación de la ascendencia de cada individuo a cada uno de los cuatro grupos definidos en las poblaciones costeras.

Obsérvese los elevados valores de asignación de los individuos de Salobreña (0.939) al grupo 4, debido a que ésta es la población más distante geográficamente. Por otra parte, los individuos de Algarrobo muestran un grado de asignación elevado al grupo 1 (0.7), mientras que los procedentes de las otras tres poblaciones (situadas geográficamente entre las dos anteriores), muestran valores menores, más o menos similares con respecto a más de un grupo.

Los valores de asignación de cada uno de los individuos pertenecientes a estas cinco poblaciones costeras se resumen en el anexo 4.17.

#### ❖ Análisis de las poblaciones de la cuenca del río Segura

El análisis de los datos correspondientes a los marcadores ISSR obtenidos en los individuos pertenecientes a las poblaciones de la cuenca del río Segura, muestreadas en la provincia de Albacete, fue realizado mediante Structure estableciendo valores de K desde 2 a 5, además de los valores para K=1 y K=6 necesarios para evaluar el valor de K al que mejor se ajustan nuestros datos (anexo 4.18).

Los anexos 4.19 y 4.20 muestran los valores de  $L'(K)$  y  $L''(K)$ , respectivamente, y los resultados correspondientes a la estima de  $\Delta K$  pueden observarse en el anexo 4.21. El valor de K al que más se ajustan nuestros es 2 (figura 4.7).

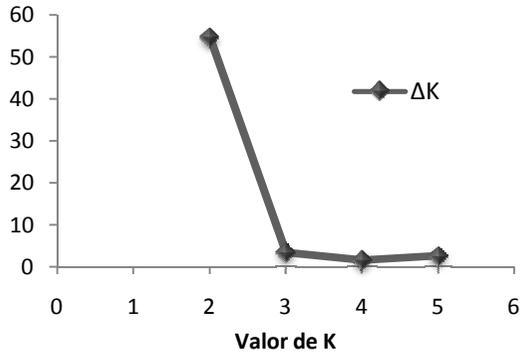


Figura 4.7. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

Los valores medios de asignación de los individuos procedentes de cada una de las cinco poblaciones del Segura a cada uno de los dos grupos establecidos por Structure aparecen en la tabla 4.13. Se observa que el grupo 1 viene definido por la mayoría de los individuos procedentes de Claras, Mundo y Calasparra, mientras que el grupo 2 engloba a la mayoría de los individuos de Socovos (figura 4.8). La población restantes (El Gallego) muestra valores intermedios de asignación a ambos grupos. El anexo 4.22 muestra los valores de la ascendencia de cada individuo perteneciente a estas cinco poblaciones con respecto a los dos grupos.

Tabla 4.13. Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los dos grupos ( $K=2$ ).

Población	Nº individuos	Grupo 1	Grupo 2
Claras	7	0.790	0.210
El Gallego	50	0.550	0.450
Socovos	15	0.348	0.652
Mundo	15	0.860	0.140
Calasparra	30	0.633	0.367

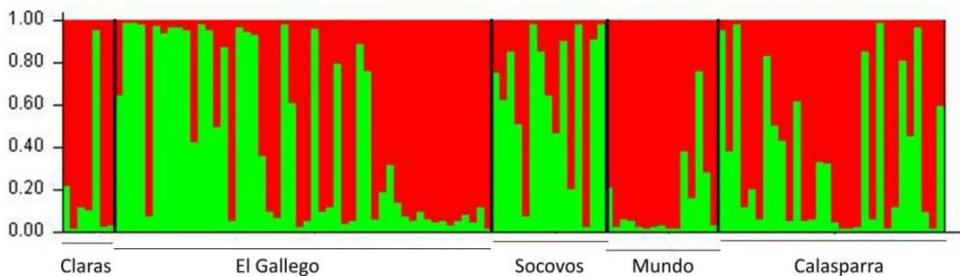


Figura 4.8. Representación de la ascendencia de cada individuo a cada uno de los dos grupos. El grupo 1 está representado en rojo, y el grupo 2 en verde.

En este grupo de poblaciones se observa que Structure proporciona peor definición geográfica que en el grupo de las poblaciones costeras, con valores intermedios de asignación a ambos grupos en tres poblaciones.

#### 4.2.1.4. Análisis del aislamiento por distancia

Para analizar la existencia de aislamiento por distancia hemos comparado, mediante el test de Mantel, la matriz del número de migrantes, Nm (anexo 4.23) con la matriz de distancias geográficas (anexo 4.24) entre las poblaciones muestreadas.

El cálculo del número de migrantes se ha hecho de forma indirecta a partir de las distancias genéticas (*Pairwise-Fst*, anexo 4.23) entre las diferentes poblaciones analizadas, siguiendo el modelo de islas infinitas de Wright (1951), donde la relación entre las distancias genéticas y el número de migrantes, para organismos diploides, es  $Nm \approx 0.25 (1-Gst)/Gst$ . La matriz de distancias genéticas ha sido calculada con el software AFLP-surv (Vekemans *et al.*, 2002) a partir de los datos de presencia/ausencia de los marcadores ISSRs analizados. En el caso de las poblaciones del Segura, las distancias geográficas entre las poblaciones han sido calculadas siguiendo el curso de los ríos que las conectan (también se hizo con las distancias en línea recta y los resultados fueron similares).

Hemos realizado este análisis a tres escalas diferentes: i) incluyendo todas las poblaciones muestreadas, ii) incluyendo sólo las poblaciones costeras (provincias de Granada y Málaga), y iii) incluyendo sólo las poblaciones del Segura (provincias de Albacete y Murcia). El programa utilizado ha sido Zt-win (Bonnet & Van der Peer, 2002) con 100.000 repeticiones aleatorias. Los resultados pueden observarse en la tabla 4.14.

Tabla 4.14. Resultados del Test de Mantel.

	<b>R</b>	<b>p</b>
Todas las poblaciones	-0.681	0.005
Poblaciones costeras	-0.894	0.017
Poblaciones del Segura	0.025	0.275

R = coeficiente de correlación de Pearson.

p = valor de probabilidad asociado.

Los resultados de la tabla 4.14 indican que existe aislamiento por distancia tanto en el conjunto de las diez poblaciones analizadas como en las poblaciones de la costa de Málaga y Granada. Por el contrario, no se observa aislamiento por distancia en las poblaciones que pertenecen a la cuenca del río Segura.

Otro modo de comprobar el aislamiento por distancia es examinando la relación existente entre el flujo génico entre pares de poblaciones ( $Nm$ ) y la distancia geográfica que las separa (Slatkin, 1993), aplicando una regresión de  $\log Nm$  frente a  $\log K$  (siendo  $K$  la distancia geográfica). En la figura 4.9 podemos observar los valores de esta regresión para el total de las diez poblaciones analizadas y en la figura 4.10, los correspondientes a las poblaciones de la costa; ambas muestran aislamiento por distancia, mientras que no se observa en las poblaciones del Segura, representadas en la figura 4.11.

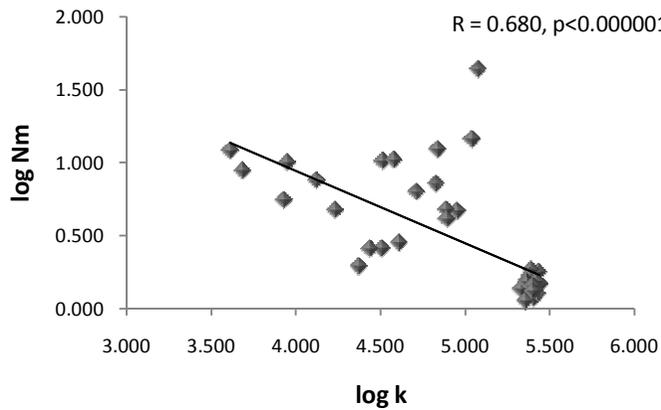


Figura 4.9. Regresión entre el logaritmo del número de migrantes entre cada par de poblaciones frente al logaritmo de la distancia geográfica en las diez poblaciones analizadas. Podemos observar correlación negativa y, por tanto, aislamiento por distancia.

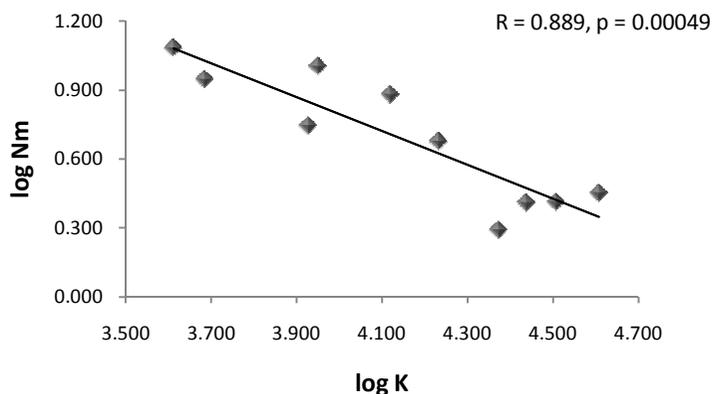


Figura 4.10. Regresión entre el logaritmo del número de migrantes entre cada par de poblaciones frente al logaritmo de la distancia geográfica en las poblaciones costeras. Aquí también podemos observar correlación negativa y, por tanto, aislamiento por distancia.

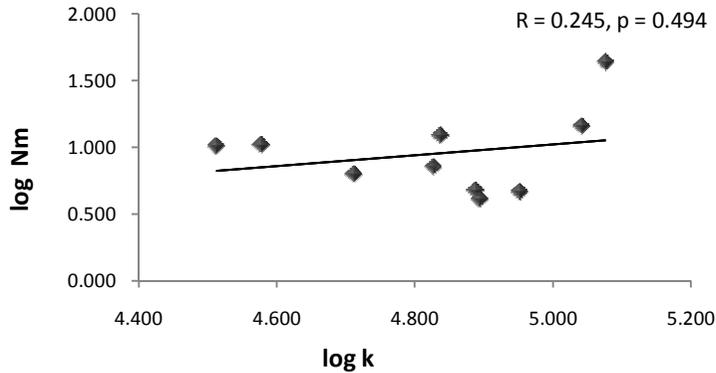


Figura 4.11. Regresión entre el logaritmo del número de migrantes entre cada par de poblaciones frente al logaritmo de la distancia geográfica en las poblaciones del Segura. En este caso no existe correlación negativa ni, por tanto, aislamiento por distancia.

Como ya hemos comentado anteriormente, uno de los problemas a los que nos enfrentamos cuando trabajamos con marcadores dominantes es que no podemos distinguir entre homocigotos dominantes y heterocigotos. Esto nos impide calcular la frecuencia de un alelo dominante directamente a partir de un gel (como podemos hacer a partir de marcadores codominantes), de modo que tenemos que asumir equilibrio Hardy-Weinberg y, por consiguiente, calcular la frecuencia de los diferentes alelos a partir de la información de bandas ausentes (homocigotos recesivos). Pero la ausencia de una banda no siempre es sinónimo de un genotipo homocigoto recesivo, sino que puede derivar de factores tales como el *allelic dropout* o la existencia de alelos nulos.

El método de Dice (1945), entre otros, no calcula frecuencias alélicas y, por tanto, no asume equilibrio Hardy-Weinberg, empleando únicamente las bandas presentes para obtener un coeficiente de similitud entre individuos por comparación del número de bandas compartidas entre los mismos. El programa FAMD v1.25 (Schlüter & Harris, 2006) nos ofrece la posibilidad de calcular tanto el coeficiente de similitud como el de disimilitud. Con este programa hemos obtenido una matriz de disimilitud de un tamaño de 256x256 (puesto que el número total de individuos analizados para el total de las 10 poblaciones ha sido éste) a partir de la cual hemos obtenido otra matriz de 10x10 donde hemos calculado el promedio de los valores de disimilitud por poblaciones junto con la desviación y el error estándar (anexo 4.25).

A su vez, también hemos comparado, mediante un test de Mantel, la matriz de disimilitudes poblacionales de Dice con la matriz de distancias geográficas (anexo

4.24) a las tres escalas citadas anteriormente; los resultados se muestran en la tabla 4.15:

Tabla 4.15. Resultados del Test de Mantel.

	R	p
Todas las poblaciones	0.708	0.00003
Poblaciones costeras	0.731	0.025
Poblaciones del Segura	0.334	0.192

R = coeficiente de correlación de Pearson.

p = valor de probabilidad asociado.

Tanto los resultados del test donde hemos empleado la matriz del número de migrantes como el del test donde hemos utilizado los valores de disimilitud de Dice sugieren la existencia de aislamiento por distancia cuando se incluyen todas las poblaciones y cuando se analizan las poblaciones costeras por separado. Sin embargo, en las poblaciones del Segura no parece existir aislamiento por distancia. Los análisis de regresión (figuras 4.9-4.11) sugieren los mismos resultados.

Estos resultados son congruentes con la menor diferenciación poblacional observada en las poblaciones del Segura, manifestada por sus menores valores de  $\theta^{(H)}$  (compare las tablas 4.8 y 4.10).

#### 4.2.1.5. Análisis molecular de la varianza (AMOVA)

Con objeto de profundizar aún más en la estructura poblacional de *E. plorans* hemos realizado un análisis molecular de la varianza (AMOVA). En este análisis se comparan dos a dos todos los fenotipos para obtener una matriz de distancia entre ellos, calculando esta distancia como el número de bandas no compartidas por ambos fenotipos. Con esta matriz se realiza un análisis de la varianza de las distancias existentes entre los individuos de una misma población, entre los individuos de diferentes poblaciones pertenecientes a un mismo grupo y entre los individuos de diferentes poblaciones pertenecientes a grupos distintos. Este análisis lo hemos llevado a cabo con el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). El número de permutaciones realizadas ha sido de 10.000 y el porcentaje de ausencia de datos máximo establecido ha sido del 20%.

Hemos realizado dos AMOVAS: i) en primer lugar, para el total de las diez poblaciones analizadas, donde hemos calculado la proporción de variabilidad total atribuible a la variación entre poblaciones y a la variación entre los individuos pertenecientes a la misma población y, ii) en segundo lugar, considerando dos grupos diferentes de poblaciones, uno el constituido por las poblaciones que forman

parte de la cuenca del río Segura y otro por las poblaciones de la costa malagueña y granadina, calculando así la proporción de variabilidad que puede atribuirse a ambos grupos (tabla 4.16).

Tabla 4.16. Resultados del análisis molecular de la varianza.

Fuente de variación	g.l.*	MSD**	Componentes de la varianza	% de variación***	p
1 región: las diez poblaciones analizadas					
Entre poblaciones	9 (P-1)	558.585	2.08081	17.34	<10 <sup>-4</sup>
Dentro de poblaciones	246 (N-P)	2440.357	9.92015	82.66	<10 <sup>-4</sup>
2 regiones: región del Segura y costa de Málaga y Granada					
Entre regiones	1(G-1)	289.522	1.96348	15.27	<0.0085
Entre poblaciones dentro de regiones	8(P-G)	269.063	0.97470	7.58	<10 <sup>-4</sup>
Dentro de poblaciones	246(N-P)	2444.357	9.92015	77.15	<10 <sup>-4</sup>

\*Grados de libertad: N, número de individuos; P, número de poblaciones; G, número de grupos.

\*\*Media de las desviaciones al cuadrado (MSD).

\*\*\*F-estadísticos asociados:

- Un grupo establecido (las diez poblaciones):
  - ✓  $\phi_{ST}$ : 0.173.
- Dos grupos establecidos (región del río Segura y región costera):
  - ✓  $\phi_{SC}$  (proporción de la variación entre poblaciones dentro de regiones): 0.0758.
  - ✓  $\phi_{ST}$  (proporción de la variación dentro de población): 0.7715.
  - ✓  $\phi_{CT}$  (proporción de la variación entre regiones): 0.15270.

Como podemos observar en la tabla 4.16, el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las poblaciones, con un 82.66% cuando establecemos un único grupo formado por el total de poblaciones estudiadas y del 77.15% cuando establecemos dos grupos. Es destacable, en este último caso, que la variación entre grupos es del 15.27%, el doble que la existente entre poblaciones dentro de grupos (7.58%). Todos los valores son estadísticamente significativos.

#### 4.2.1.6. Relaciones filogenéticas inferidas a partir de una matriz de distancias genéticas

Con la matriz de distancias genéticas *Pairwise-Fst* que estimamos mediante el programa AFLP-surv (anexo 4.22) a partir de los datos de marcadores ISSR, hemos inferido un árbol filogenético bajo el método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) implementado en el programa Neighbor que forma parte del paquete Phylip

v3.69, ampliamente utilizado en inferencia filogenética. En la figura 4.12 podemos observar el árbol inferido, que agrupa a las poblaciones de la costa por un lado y a las poblaciones del Segura pertenecientes a las provincias de Albacete y Murcia por otro. Se observa una mayor agrupación de las poblaciones del Segura, y gran diferenciación entre Salobreña y las otras poblaciones costeras.

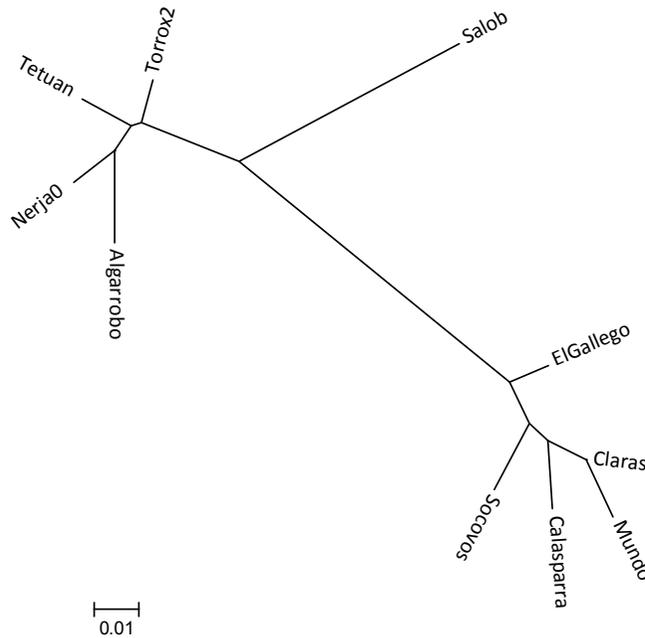


Figura 4.12. Árbol filogenético inferido bajo el método de Neighbor-Joining a partir de una matriz de distancias genéticas *Pairwise-Fst*.

## 4.2.2. Análisis del fenómeno *Allelic Dropout*

### 4.2.2.1. Cuantificación en adultos

El propósito de este estudio es conocer la posibilidad de que el fenómeno del *Allelic Dropout* esté siendo responsable de la aparición de falsos homocigotos recesivos en el genotipado para los marcadores ISSRs de los individuos. Para ello, hemos calculado el porcentaje de *dropout* tanto para el conjunto de alelos amplificados a partir de un mismo cebador como para cada uno de los alelos por separado.

En el primer caso, los valores de *dropout* obtenidos (tabla 4.17) son menores en el control 1 (donde las réplicas contienen la misma máster mix y se

amplifican al mismo tiempo) que en el control 2 (donde no contienen la misma máster mix y se amplifican en días diferentes). En rojo aparecen los alelos que presentan un alto valor de *dropout*, considerando valores aceptables aquellos que están por debajo del 30% (Miller *et al.*, 2002).

Tabla 4.17. Valores de *Dropout* (%) obtenidos en adultos.

Cebadores	Control 1				Control 2			
	Réplicas*	Alelos**	Discordancia	<i>Dropout</i>	Réplicas*	Alelos**	Discordancia	<i>Dropout</i>
ISSR6	9	153	0	0	6	102	1	0.98
ISSR7	8	160	0	0	14	280	30	10.714
ISSR14	8	88	2	2.273	9	99	5	5.051
ISSR26	7	147	7	4.762	7	147	24	16.327
ISSR39	5	90	0	0	7	126	7	5.556
ISSR43	6	66	1	1.515	11	121	18	14.876

\*Número de muestras replicadas.

\*\* Número total de alelos amplificados.

Los valores de *dropout* para cada uno de los alelos por separado, como puede observarse en las tablas 4.18-4.20, también son mayores en el control 2.

Tabla 4.18. Valores de *Dropout* (%) para cada uno de los alelos en los dos controles realizados (\*control 1; \*\*control 2)

Alelo	Tamaño(pb)	<i>Dropout</i> *	<i>Dropout</i> **	Alelo	Tamaño (pb)	<i>Dropout</i> *	<i>Dropout</i> **
6-250	250	0	0	7-250	250	0	0
6-330	330	0	0	7-320	320	0	21.43
6-350	350	0	0	7-350	350	0	0
6-380	380	0	0	7-380	380	0	21.43
6-450	450	0	16.67	7-430	430	0	7.14
6-500	500	0	0	7-480	480	0	0
6-550	550	0	0	7-550	550	0	7.14
6-630	630	0	0	7-600	600	0	21.43
6-750	750	0	0	7-650	650	0	0
6-800	800	0	0	7-700	700	0	28.57
6-900	900	0	0	7-800	800	0	21.43
6-1000	1000	0	0	7-900	900	0	7.14
6-1100	1100	0	0	7-1000	1000	0	14.29
6-1200	1200	0	0	7-1100	1100	0	28.57
6-1300	1300	0	0	7-1150	1150	0	7.14
6-1400	1400	0	0	7-1400	1400	0	21.43
6-1600	1600	0	0	7-1500	1500	0	0
				7-1600	1600	0	7.14
				7-1800	1800	0	0
				7->2000	>2000	0	0

Tabla 4.19. Valores de *Dropout* (%) para cada uno de los alelos en los dos controles realizados (\*control 1; \*\*control 2)

Alelo	Tamaño (pb)	<i>Dropout</i> *	<i>Dropout</i> **	Alelo	Tamaño (pb)	<i>Dropout</i> *	<i>Dropout</i> **
14-300	300	0	11.11	26-300	300	0	14.29
14-400	400	0	0	26-340	340	0	0
14-500	500	12.5	0	26-380	380	14.29	28.57
14-600	600	0	0	26-430	430	0	0
14-750	750	0	11.11	26-480	480	0	14.29
14-800	800	0	0	26-500	500	<b>42.86</b>	<b>42.86</b>
14-850	850	0	11.11	26-550	550	0	14.29
14-1250	1250	0	11.11	26-600	600	28.57	14.29
14-1400	1400	12.5	0	26-650	650	0	<b>42.86</b>
14-1450	1450	0	0	26-700	700	0	28.57
14-1800	1800	0	11.11	26-750	750	0	42.86
				26-800	800	14.29	14.29
				26-900	900	0	28.57
				26-1000	1000	0	<b>42.86</b>
				26-1100	1100	0	0
				26-1200	1200	0	0
				26-1300	1300	0	0
				26-1600	1600	0	0
				26-1800	1800	0	0
				26-2000	2000	0	0
				26>2000	26>2000	0	14.29

Tabla 4.20. Valores de *Dropout* (%) para cada uno de los alelos en los dos controles realizados (\*control 1; \*\*control 2).

Alelo	Tamaño (pb)	<i>Dropout</i> *	<i>Dropout</i> **	Alelo	Tamaño (pb)	<i>Dropout</i> *	<i>Dropout</i> **
39-180	180	0	0	43-250	250	0	18.18
39-200	200	0	0	43-280	280	0	18.18
39-220	220	0	28.57	43-320	320	0	9.09
39-250	250	0	<b>42.86</b>	43-380	380	0	9.09
39-280	280	0	0	43-400	400	0	27.27
39-320	320	0	0	43-490	490	0	0
39-390	390	0	0	43-540	540	0	<b>54.55</b>
39-410	410	0	0	43-600	600	0	9.09
39-450	450	0	0	43-650	650	0	18.18
39-500	500	0	0	43-780	780	0	0
39-550	550	0	0	43-800	800	16.67	0
39-600	600	0	0				
39-650	650	0	0				
39-700	700	0	0				
800	800	0	14.29				
39-880	880	0	14.29				
39-1000	1000	0	0				
39-1100	1100	0	0				

#### 4.2.2.2. Análisis de herencia de los marcadores ISSR

Los cruzamientos seleccionados para este análisis han sido aquellos en que ambos parentales diferían en el genotipo para los alelos ISSR y los cebadores empleados (ISSR6, ISSR7 e ISSR14), los que han amplificado las bandas más claras y nítidas (tabla 4.21) y carecen de *dropout* o muestran valores muy bajos.

Tabla 4.21. Resumen de los cruces y cebadores empleados.

Cruce	Población	Año	Cebador utilizado		
			ISSR6	ISSR7	ISSR14
♀19 x ♂27	Algarrobo	2004	x	x	x
♀24 x ♂32	"	"		x	
♀4 x ♂19	Algarrobo	2005	x	x	x
♀12 x ♂3	"	"		x	x
♀13 x ♂20	"	"			x
♀16 x ♂14	"	"			x
♀29 x ♂3	"	"		x	
♀5 x ♂7	Nerja1	2004		x	x
♀2 x ♂4	Nerja0	2005			x
♀3 x ♂3	"	"		x	

La tabla 4.22 resume todos los posibles cruzamientos que podrían producirse, en cuanto a genotipos se refiere, y la proporción de progenie portadora de banda (1).

Tabla 4.22. Genotipos de todos los posibles cruzamientos y proporción esperada de hijos portadores para cada uno de los mismos.

Genotipo				
Parental		Parental		Proporción esperada de hijos portadores (1)
♀	♂	♀	♂	
AA	AA	1	1	1
AA	Aa	1	1	1
AA	aa	1	0	1
Aa	AA	1	1	1
Aa	Aa	1	1	3/4
Aa	aa	1	0	1/2
aa	AA	0	1	1
aa	Aa	0	1	1/2
aa	aa	0	0	0

En resumen, la tabla 4.22 indica que cuando los dos progenitores presentan banda (cruce 1x1), puede ocurrir que toda la progenie muestre banda, en cuyo caso

podemos deducir que al menos uno de los progenitores es homocigótico para presencia de banda. Pero también puede darse el caso de que los dos progenitores con banda sean heterocigotos y, en este caso, esperaríamos un 75% de progenie con banda. Por otra parte, cuando uno de los progenitores tiene banda para un marcador, y el otro no (cruces 1x0 y 0x1), esperaríamos un 50% de progenie con banda si uno de los progenitores es heterocigoto, o toda la descendencia con banda, si ambos progenitores son homocigotos.

Teniendo esto en cuenta, en los cruzamientos donde toda la progenie era del mismo tipo no hemos realizado test estadístico alguno, mientras que sí lo hemos hecho en aquellos donde había progenie con banda y sin banda. En cada caso, la hipótesis nula y las proporciones esperadas en la progenie depende de los fenotipos de los progenitores.

En el caso de marcadores que estuvieran ligados al sexo, la proporción de descendientes que presentarían el marcador queda resumida en la tabla 4.23. Como podemos observar en las tablas 4.22 y 4.23, la proporción esperada de hijos portadores, cuando no tenemos en cuenta el sexo de los individuos, es la misma para marcadores autosómicos que para marcadores ligados al sexo.

Tabla 4.23. Proporción de fenotipos esperados en caso de marcadores ISSR ligados al sexo.

Progenitores				Progenie con el marcador		Total
Hembra	Macho	Hembra	Macho	♀	♂	
X <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	X <sup>+</sup>	1	1	1	1	1
X <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	X	1	0	1	1	1
X <sup>+</sup> X	X <sup>+</sup>	1	1	1	1/2	3/4
X <sup>+</sup> X	X	1	0	1/2	1/2	1/2
XX	X <sup>+</sup>	0	1	1	0	1/2
XX	X	0	0	0	0	0

El genotipo de cada uno de los parentales implicados en los cruzamientos analizados, así como los valores observados y esperados de la frecuencia de descendientes que portan o no un determinado alelo queda recogido en la tabla 4.24. En la última columna se muestran los valores de Chi-cuadrado y su valor de probabilidad asociado para cada uno de los alelos y cruces realizados. Los valores que aparecen en negrita indican que existe distorsión en la segregación para ese marcador, es decir, las frecuencias observadas se desvían significativamente de las esperadas (según las leyes de herencia mendeliana). Tras aplicar el test de Bonferroni, sólo cinco de ellas (marcadas en rojo) siguen siendo estadísticamente significativas.

Es importante resaltar en que los cinco casos en que el test de Bonferroni ha sido significativo, la distorsión de las proporciones esperadas en cuanto a la presencia o ausencia de banda en la progenie ha sido hacia un exceso de bandas ausentes.

Tabla 4.24. Frecuencias observadas y esperadas para cada uno de los marcadores analizados en las progenies de los cruzamientos realizados.

Alelo	Cruce	ISSRs											X <sup>2</sup> (p)		
		Parentales		Observadas					Progenie					Esperadas	
		♀	♂	0	1	Total	Ratio	0	1	Proporción	0	1		Proporción	
6-350	♀4 x ♂19	1	1	4	24	28	0.857	7	21	(1:3)	7	21	(1:3)	1.714 (0.190)	
	♀4 x ♂19	1	1	6	22	28	0.786	7	21	(1:3)	7	21	(1:3)	0.190 (0.663)	
	♀4 x ♂19	1	0	21	7	28	0.250	14	14	(1:1)	14	14	(1:1)	<b>7 (0.008)</b>	
7-350	♀4 x ♂19	1	0	16	12	28	0.429	14	14	(1:1)	14	14	(1:1)	0.571 (0.450)	
	♀19 x ♂27	1	0	8	10	18	0.556	9	9	(1:1)	9	9	(1:1)	0.222 (0.637)	
	♀24 x ♂32	1	1	1	14	15	0.933	3.75	11.25	(1:3)	3.75	11.25	(1:3)	2.689 (0.101)	
7-430	♀4 x ♂19	1	1	0	28	28	1								
	♀12 x ♂3	1	1	2	12	14	0.857	3.5	10.5	"	3.5	10.5	"	0.857 (0.3555)	
	♀29 x ♂3	1	1	4	6	10	0.6	2.5	7.5	"	2.5	7.5	"	1.2 (0.273)	
7-480	♀3 x ♂3	1	1	0	20	20	1								
	♀5 x ♂7	1	1	0	16	16	1								
	♀4 x ♂19	0	1	11	17	28	0.607	14	14	(1:1)	14	14	(1:1)	1.286 (0.257)	
7-600	♀12 x ♂3	1	0	9	5	14	0.357	7	7	"	7	7	"	1.143 (0.285)	
	♀19 x ♂27	0	1	8	10	18	0.556	9	9	(1:1)	9	9	(1:1)	0.222 (0.637)	
	♀24 x ♂32	1	1	4	11	15	0.733	3.75	11.25	(1:3)	3.75	11.25	(1:3)	0.022 (0.881)	
7-700	♀4 x ♂19	1	1	10	18	28	0.643	7	21	"	7	21	"	1.714 (0.190)	
	♀12 x ♂3	1	1	2	12	14	0.857	3.5	10.5	"	3.5	10.5	"	0.857 (0.355)	
	♀29 x ♂3	0	1	3	7	10	0.7	5	5	(1:1)	5	5	(1:1)	1.6 (0.206)	
7-700	♀3 x ♂3	0	1	8	12	20	0.6	10	10	"	10	10	"	0.8 (0.371)	
	♀5 x ♂7	0	1	13	3	16	0.188	8	8	"	8	8	"	<b>6.25 (0.012)</b>	
	♀4 x ♂19	1	1	5	23	28	0.821	7	21	(1:3)	7	21	(1:3)	0.762 (0.383)	
	♀12 x ♂3	1	0	8	6	14	0.429	7	7	(1:1)	7	7	(1:1)	0.286 (0.593)	

ISSRs												
Alelo	Cruce	Parentales		Observadas					Progenie			X <sup>2</sup> (p)
		♀	♂	0	1	Total	Ratio	0	1	Proporción		
<b>7-800</b>	♀19 x ♂27	1	1	2	16	18	0.889	4.5	13.5	(1:3)	1.852 (0.174)	
	♀24 x ♂32	1	1	0	15	15	1					
	♀4 x ♂19	1	0	0	28	28	1					
	♀12 x ♂3	1	0	0	14	14	1					
	♀29 x ♂3	1	0	0	10	10	1					
	♀3 x ♂3	1	1	1	19	20	0.95	5	15	(1:3)	<b>4.267 (0.039)</b>	
<b>7-1000</b>	♀5 x ♂7	1	1	0	16	16	1					
	♀19 x ♂27	0	1	16	2	18	0.111	9	9	(1:1)	<b>10.889 (0.001)</b>	
	♀24 x ♂32	0	1	6	9	15	0.6	7.5	7.5	"	0.6 (0.439)	
	♀4 x ♂19	1	1	18	10	28	0.357	7	21	(1:3)	<b>23.048 (1.580E-06)*</b>	
	♀12 x ♂3	1	0	8	6	14	0.429	7	7	(1:1)	0.286 (0.593)	
	♀3 x ♂3	1	1	6	14	20	0.7	5	15	(1:3)	0.267 (0.606)	
<b>7-1100</b>	♀5 x ♂7	0	1	11	5	16	0.313	8	8	(1:1)	2.25 (0.134)	
	♀19 x ♂27	1	1	15	3	18	0.167	4.5	13.5	(1:3)	<b>32.667 (1.09E-08)*</b>	
	♀24 x ♂32	1	0	6	9	15	0.6	7.5	7.5	(1:1)	0.6 (0.439)	
	♀4 x ♂19	1	1	15	13	28	0.464	7	21	(1:3)	<b>12.190 (0.000)*</b>	
	♀12 x ♂3	1	0	7	7	14	0.5	7	7	(1:1)	0 (1)	
	♀5 x ♂7	0	1	3	13	16	0.813	8	8	"	<b>6.25 (0.012)</b>	
<b>7-1400</b>	♀19 x ♂27	1	0	12	6	18	0.333	9	9	(1:1)	2 (0.157)	
	♀24 x ♂32	0	1	11	4	15	0.267	7.5	7.5	"	<b>3.267 (0.071)</b>	
	♀4 x ♂19	0	1	23	5	28	0.179	14	14	"	<b>11.571 (0.001)</b>	
	♀12 x ♂3	1	0	12	2	14	0.143	7	7	"	<b>7.143 (0.008)</b>	
	♀29 x ♂3	1	0	6	4	10	0.4	5	5	"	0.4 (0.527)	
	♀3 x ♂3	1	1	11	9	20	0.45	5	15	(1:3)	<b>9.6 (0.002)</b>	



Alelo		ISSRs												
		Parentales		Progenie										
				Observadas					Esperadas					
♀	♂	0	1	Total	Ratio	0	1	Proporción	$\chi^2$ (p)					
<b>14-800</b>	♀19 x ♂27	1	1	1	14	15	0.933	3.75	11.25	(1:3)	2.689 (0.101)			
	♀4 x ♂19	1	0	12	12	24	0.5	12	12	(1:1)	0 (1)			
	♀12 x ♂3	1	1	4	8	12	0.667	3	9	(1:3)	0.444 (0.505)			
	♀13 x ♂20	1	0	12	16	28	0.571	14	14	(1:1)	0.571 (0.450)			
	♀16 x ♂14	1	1	4	13	17	0.765	4.25	12.75	(1:3)	0.020 (0.889)			
	♀2 x ♂4	1	0	4	17	21	0.810	10.5	10.5	(1:1)	<b>8.048 (0.005)</b>			
	♀5 x ♂7	1	0	11	6	17	0.353	8.5	8.5	"	1.471 (0.225)			
<b>14-850</b>	♀19 x ♂27	1	1	6	9	15	0.6	3.75	11.25	(1:3)	1.8 (0.180)			
	♀4 x ♂19	0	1	10	14	24	0.583	12	12	(1:1)	0.667 (0.441)			
	♀13 x ♂20	0	1	20	8	28	0.286	14	14	"	<b>5.143 (0.023)</b>			
	♀16 x ♂14	0	1	11	6	17	0.353	8.5	8.5	"	1.471 (0.225)			
	♀19 x ♂27	1	1	0	15	15	1							
<b>14-1250</b>	♀4 x ♂19	1	1	2	22	24	0.917	6	18	(1:1)	3.556 (0.059)			
	♀12 x ♂3	1	0	1	11	12	0.917	6	6	"	<b>8.333 (0.004)</b>			
	♀13 x ♂20	1	1	5	23	28	0.821	7	21	(1:3)	0.762 (0.383)			
	♀16 x ♂14	0	1	9	8	17	0.471	8.5	8.5	(1:1)	0.059 (0.808)			
	♀2 x ♂4	1	1	3	18	21	0.857	5.25	15.75	(1:3)	1.286 (0.257)			
	♀5 x ♂7	0	1	1	16	17	0.941	8.5	8.5	(1:1)	<b>13.235 (0)*</b>			
	♀19 x ♂27	1	1	3	12	15	0.8	3.75	11.25	(1:3)	0.2 (0.655)			
<b>14-1400</b>	♀4 x ♂19	1	1	4	20	24	0.833	6	18	"	0.889 (0.346)			
	♀12 x ♂3	1	0	5	7	12	0.583	6	6	(1:1)	0.333 (0.564)			
	♀13 x ♂20	1	1	6	22	28	0.786	7	21	(1:3)	0.190 (0.663)			
	♀16 x ♂14	0	1	9	8	17	0.471	8.5	8.5	(1:1)	0.059 (0.808)			
	♀2 x ♂4	1	1	1	20	21	0.952	5.25	15.75	(1:3)	<b>4.587 (0.032)</b>			
	♀5 x ♂7	0	1	3	14	17	0.824	8.5	8.5	(1:1)	<b>7.118 (0.008)</b>			

		ISSRs											
Alelo	Cruce	Parentales		Observadas					Progenie				X <sup>2</sup> (p)
		♀	♂	0	1	Total	Ratio	0	1	Proporción			
14-1450	♀12 x ♂13	1	0	5	7	12	0.583	6	6	(1:1)	0.333 (0.564)		
	♀13 x ♂20	0	1	19	9	28	0.321	14	14	"	3.571 (0.059)		
	♀16 x ♂14	0	1	15	2	17	0.118	8.5	8.5	"	<b>9.941 (0.002)</b>		
14-1800	♀19 x ♂27	1	0	6	9	15	0.6	7.5	7.5	(1:1)	0.6 (0.439)		
	♀4 x ♂19	1	1	12	12	24	0.5	6	18	(1:3)	<b>8 (0.005)</b>		
	♀2 x ♂4	1	1	1	20	21	0.952	5.25	15.75	(1:3)	<b>4.587 (0.032)</b>		
	♀5 x ♂7	0	1	3	14	17	0.824	8.5	8.5	(1:1)	<b>7.118 (0.008)</b>		

\*Valores presencia de Bs en estas poblaciones de la cabecera del río Segura.

### 4.2.2.3. Análisis con Hickory y Structure eliminando los marcadores con mayor dropout

Para comprobar la fiabilidad de los resultados que hemos obtenido empleando el total de 97 marcadores ISSRs, teniendo en cuenta que 10 de ellos presentaban un alto porcentaje de *dropout* (tablas 4.19, 4.20 y 4.24, alelos marcados en rojo) hemos vuelto a analizar todos los datos con los programas Hickory y Structure, eliminando estos marcadores con mayor *dropout* para ver si los resultados varían con respecto a los obtenidos con el total de marcadores.

#### ❖ Análisis con Hickory:

##### ➤ Para el total de poblaciones:

Si comparamos los valores de la tabla 4.25 con los valores de la tabla 4.6, donde se analizaron los 97 marcadores originales, podemos observar que los resultados prácticamente no difieren con los obtenidos una vez eliminados los marcadores con mayor *dropout*.

Tabla 4.25. Valores de la diversidad genética en base al modelo  $f=0$  obtenidos mediante Hickory para el total de poblaciones habiendo eliminado los marcadores con mayor *dropout*.

Parámetro	Media	SD	2.5%	97.5%
theta-I, $\theta^{(I)}$	0.306	0.024	0.262	0.356
theta-II, $\theta^{(II)}$	0.109	0.008	0.095	0.126
theta-III, $\theta^{(III)}$	0.080	0.004	0.072	0.087
hs[Algarrobo]	0.221	0.005	0.211	0.232
hs[Torrox]	0.226	0.006	0.215	0.237
hs[Nerja0]	0.217	0.005	0.206	0.227
hs[Tetuán]	0.223	0.005	0.213	0.233
hs[Salobreña]	0.224	0.005	0.214	0.235
hs[Claros]	0.219	0.009	0.202	0.236
hs[El Gallego]	0.206	0.004	0.197	0.214
hs[Socovos]	0.189	0.007	0.176	0.203
hs[Mundo]	0.230	0.007	0.216	0.244
hs[Calasparra]	0.200	0.005	0.190	0.211
Hs	0.216	0.002	0.211	0.220
Ht	0.241	0.002	0.236	0.245
Gst-B	0.104	0.005	0.094	0.115

➤ **Para las poblaciones costeras:**

Igualmente, comparando la tabla 4.26 con la tabla 4.8, observamos que los valores no cambian sustancialmente una vez eliminados los marcadores con mayor *dropout*.

Tabla 4.26. Valores de la diversidad genética en base al modelo  $f=0$  obtenidos mediante Hickory para las poblaciones costeras habiendo eliminado los marcadores con mayor *dropout*.

Parámetro	Media	SD	2.5%	97.5%
theta-I, $\theta^{(I)}$	0.301	0.028	0.251	0.359
theta-II, $\theta^{(II)}$	0.062	0.007	0.049	0.078
theta-III, $\theta^{(III)}$	0.042	0.003	0.036	0.049
hs[Algarrobo]	0.230	0.005	0.220	0.240
hs[Torrox]	0.235	0.006	0.223	0.245
hs[Nerja0]	0.227	0.005	0.216	0.237
hs[Tetuán]	0.233	0.005	0.223	0.243
hs[Salobreña]	0.236	0.006	0.225	0.247
Hs	0.232	0.003	0.227	0.238
Ht	0.245	0.003	0.240	0.250
Gst-B	0.053	0.005	0.044	0.062

➤ **Para las poblaciones del Segura:**

De la misma manera que en los dos casos anteriores, los valores obtenidos con Hickory empleando el total de 97 marcadores o los 87 marcadores (habiendo eliminado los que presentaban mayor *dropout*) son muy similares, cuando comparamos las tablas 4.10 y 4.27.

Tabla 4.27. Valores de la diversidad genética en base al modelo  $f=0$  obtenidos mediante Hickory para las poblaciones del Segura habiendo eliminado los marcadores con mayor *dropout*.

Parámetro	Media	SD	2.5%	97.5%
theta-I, $\theta^{(I)}$	0.293	0.030	0.238	0.356
theta-II, $\theta^{(II)}$	0.041	0.007	0.029	0.055
theta-III, $\theta^{(III)}$	0.029	0.004	0.022	0.037
theta-Y	0.264	0.032	0.207	0.330
rho	0.896	0.022	0.847	0.933
hs[Claras]	0.220	0.007	0.206	0.235
hs[Gallegos]	0.215	0.004	0.207	0.223
hs[Socovos]	0.201	0.006	0.188	0.214
hs[Mundo]	0.233	0.007	0.220	0.246
hs[Calasparra]	0.211	0.005	0.201	0.221
Hs	0.216	0.003	0.209	0.223
Ht	0.223	0.004	0.217	0.231
Gst-B	0.034	0.005	0.025	0.044

### ❖ Análisis con Structure:

#### ➤ Para el total de poblaciones:

Siguiendo las indicaciones de cómo calcular el valor de K que mejor se ajusta a nuestros datos (descritas en el apartado: 4.2.1.3. “Análisis de la estructura genética de las poblaciones”), observamos que, comparando las figuras 4.3 y 4.13, una vez eliminados los diez marcadores que más *dropout* presentan, obtenemos el mismo valor de K obtenido con los 97 marcadores originales (K=2). A su vez, la proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los dos grupos se mantiene (tabla 4.11 vs 4.28).

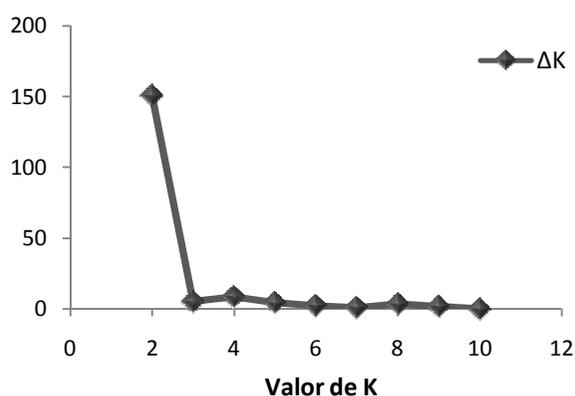


Figura 4.13. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

Tabla 4.28. Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los dos grupos (K=2)

Población	Nº Individuos	Grupo 1	Grupo 2
Algarrobo	29	<b>0.928</b>	0.072
Torrox	27	<b>0.979</b>	0.021
Nerja0	30	<b>0.964</b>	0.036
Tetuán	30	<b>0.961</b>	0.039
Salobreña	23	<b>0.917</b>	0.083
Claras	7	0.062	<b>0.938</b>
El Gallego	50	0.116	<b>0.884</b>
Socovos	15	0.046	<b>0.954</b>
Mundo	15	0.015	<b>0.985</b>
Calasparra	30	0.06	<b>0.94</b>

➤ **Para las poblaciones costeras:**

Del mismo modo que en el apartado anterior, observamos, comparando las figuras 4.5 y 4.14, y las tablas 4.12 y 4.29, que tanto el valor de la K que mejor se ajusta a nuestros datos para las poblaciones costeras, como la proporción de miembros de cada población predefinida a cada uno de los cuatro grupos, analizando los datos con 97 y con 87 marcadores, se mantiene.

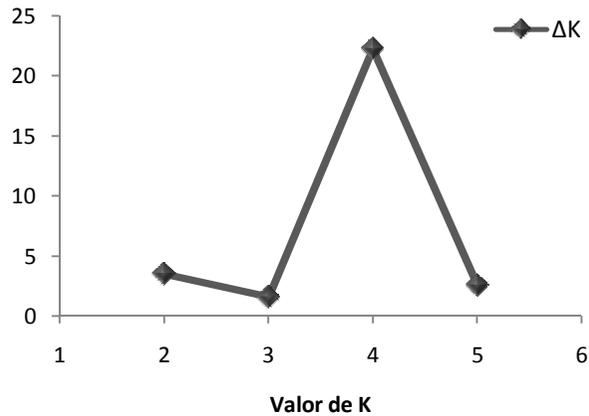


Figura 4.14. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

Tabla 4.29 Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los cuatro grupos (K=4)

Población	Nº Individuos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Algarrobo	29	<b>0.713</b>	0.07	0.176	0.041
Torrox	27	0.231	0.39	0.355	0.024
Nerja0	30	0.539	0.043	0.395	0.024
Tetuán	30	0.36	0.139	0.476	0.025
Salobreña	23	0.032	0.011	0.015	<b>0.941</b>

➤ **Para las poblaciones del Segura:**

Los resultados obtenidos para las poblaciones del Segura del valor de K que mejor se ajusta a los datos también es el mismo (K=2) tanto con el total de los 97 marcadores como habiendo eliminado los marcadores que mayor *dropout* presentan (ver figuras 4.7 y

4.15 y tablas 4.13 y 4.30), al igual que se mantiene la proporción de individuos de cada población predefinida a cada uno de los dos grupos.

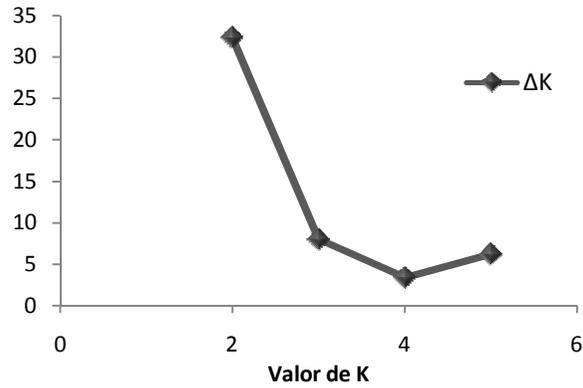


Figura 4.15. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

Tabla 4.30. Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los dos grupos (K=2)

Población	Nº Individuos	Grupo 1	Grupo 2
Claras	7	0.777	0.223
El Gallego	50	0.532	0.468
Socovos	15	0.357	0.643
Mundo	15	0.837	0.163
Calasparra	30	0.614	0.386

### 4.3. DISCUSIÓN

#### 4.3.1. Evaluación de los marcadores ISSR para estudios genéticos en los genomas de saltamontes

El saltamontes *Eyprepocnemis plorans* tiene un genoma gigante (más de  $10^{10}$  pb), con una presencia destacable de secuencias repetidas, como los microsatélites que aparecen dispersos por todos los cromosomas (López-León *et al.*, en preparación). Esto, junto a la ausencia de información sobre la secuencia de su genoma, convierte a los ISSRs en el marcador molecular de elección para los estudios de diversidad genética en esta especie, ya que el uso de estos marcadores no requiere información previa de la secuencias que se van a analizar.

La obtención de 97 loci diferentes con solo 6 cabadores distintos da idea de la abundancia y variación de los ISSRs presentes en el genoma de *E. plorans*, como se ha observado también en otras especies como *Bombyx mori* (Pradeep *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 1999).

Sin embargo, los ISSRs, al ser un marcador dominante, presentan la desventaja de que la presencia de una banda o marcador refleja el fenotipo dominante sin posibilidad de distinción entre los genotipos homocigoto y heterocigoto para ese locus. Además, cuando trabajamos con técnicas de genotipado de individuos que implican el uso de la PCR, en este caso ISSR-PCR, pueden cometerse errores debidos a tres fenómenos: los falsos alelos, la contaminación de la muestra y el denominado *allelic dropout*. Los dos primeros son fácilmente evitables y detectables estableciendo un control riguroso de las condiciones de PCR, que incluye realizar controles negativos. Sin embargo, en el *allelic dropout* se produce un fallo estocástico de la amplificación de uno de los dos alelos que porta cada individuo para un determinado locus (Navidi *et al.*, 1992; Taberlet *et al.*, 1996), que pasa desapercibido en la rutina de laboratorio, lo que ha llevado a considerarlo como el fenómeno que con más frecuencia conduce a un genotipado erróneo de los individuos haciendo que tenga especial relevancia en los estudios relacionados con la genética de la conservación y cuando se dispone de pequeñas muestras de tejido para el aislamiento de las muestras de DNA (Gerloff *et al.*, 1995; Gagneaux *et al.*, 1997; Goosens *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha descrito este fenómeno para el caso de ADN de alta calidad (Jeffery *et al.*, 2001; Soulsbury *et al.*, 2007). El *allelic dropout* puede hacernos cometer errores en el genotipado de un individuo, por ejemplo, si la banda de un heterocigoto no se amplifica y consideramos a ese individuo para ese locus como homocigoto recesivo. Pero además, y puesto que estos marcadores se heredan según las leyes de Mendel (Tsumura *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1999; Fang & Rose, 1997), este fenómeno también implicaría una distorsión en las proporciones mendelianas de la herencia de

algunos marcadores (McMeniman & Barker, 2006). Todo esto hace que la importancia de los errores de genotipado esté siendo cada vez más ampliamente reconocida (Hoffman & Amos 2005; Tester *et al.*, 2006; Johnson & Haydon, 2007; Soulsbury *et al.*, 2007).

Nuestro análisis de la repetibilidad de las bandas obtenidas para los marcadores ISSR en *E. plorans*, ha mostrado que hay bajos niveles de *dropout* para la totalidad de cebadores analizados. Para su análisis hemos considerado dos estrategias (control de repetibilidad) para las réplicas realizadas, con el fin de estimar la importancia relativa de algunos factores implicados en el *dropout*. En un primer tipo de control, las réplicas contenían la misma master mix y se amplificaban simultáneamente, mientras que el segundo tipo de control, las réplicas no contenían la misma máster mix y se amplificaban en días diferentes. Los resultados han demostrado que los valores de *dropout* aumentan cuando las réplicas se realizan con una master mix distinta y las amplificaciones no se realizan simultáneamente. Esto pone de manifiesto la importancia de las pequeñas variaciones que puedan ocurrir en el pipeteo durante la preparación de la reacción de PCR, así como una posible influencia del termociclador en la consistencia de la amplificación cuando se genera un número de marcadores en la misma reacción. Todos estos factores se han sugerido por muchos autores como posibles responsables del *allelic dropout* pero se ha estudiado escasamente el impacto de cada uno. Soulsbury *et al.* (2007) diseñaron experimentos para detectar la fuente de error haciendo diluciones del DNA antes de la PCR, estableciendo distintas temperaturas de *annealing* del cebador o distintos métodos de purificación de los productos de PCR que analizaban, concluyendo que el *allelic dropout* está relacionado fundamentalmente con la disminución en la cantidad de DNA utilizada en las amplificaciones, llegando a observar altos niveles del mismo.

Considerando el conjunto de alelos amplificados con cada cebador se encuentran valores bajos de *dropout*, con una tasa máxima para el cebador ISSR26 del 4.76%, considerando el control de tipo 1, y del 16.32% para las réplicas del control tipo 2. Si consideramos cada alelo por separado, también observamos siempre valores mayores de *dropout* en los controles de réplicas de tipo 2, pudiendo alcanzar ocasionalmente valores altos de hasta un 54.5%, aunque en general son bajos. Así, en los controles de réplicas de tipo 1 el 90.7% de los marcadores carecían de *dropout*, en un 5% de ellos había una tasa cercana al 15% y solo encontramos un 2% de marcadores con valores mayores del 28%.

Aunque inicialmente se asumía que la incidencia del *dropout* era un proceso aleatorio en relación al tipo de locus considerado, actualmente disponemos en la bibliografía de estudios que demuestran que los valores de *dropout* varían entre loci

(Jeffery *et al.*, 2001; Buchan *et al.*, 2005; Soulsbury, 2007) y entre individuos (Gagneux *et al.*, 1997). En nuestro estudio hemos observado una considerable variabilidad para el *allelic dropout* dependiendo del cebador empleado, con cebadores como el ISSR6 con un porcentaje de *dropout* casi nulo y otros, como el ISSR26, con *dropout* para uno de sus loci de 42.86% en el control de tipo 1. Esto indica que las características de secuencia de los loci amplificados, que pueden afectar a la dinámica de "annealing" propia de cada cebador, juegan un papel a destacar en este fenómeno. Por otra parte, nuestros resultados apoyan la idea de que puede existir variabilidad interlocus en el *allelic dropout*, ya que para todos los cebadores utilizados hay variación para los porcentajes de *dropout* encontrados en los distintos loci amplificados. Sin embargo, no parece haber relación entre el tamaño de fragmento de los marcadores y el nivel de *dropout* que muestran, a diferencia de otras observaciones que sugieren que cuanto mayor sea la longitud del alelo, con mayor frecuencia sufre *dropout* (Gerloff *et al.*, 1995; Gossens *et al.*, 1998).

Los análisis de *allelic dropout* son fundamentales y necesarios para cualquiera de los estudios de genotipado que se realizan dentro de contextos tan variados como la demografía, la identificación forense, los estudios de paternidad, de asignación poblacional y las estimas de la estructura poblacional y, aunque recientemente se han ido incrementando los estudios encaminados a la detección y minimización del *allelic dropout*, sus causas son aún bastante desconocidas y suponen un campo de estudio interesante para futuras investigaciones.

Por otra parte, los análisis de herencia que hemos realizado para algunos de estos marcadores han demostrado que los ISSRs muestran una herencia mendeliana, ya que de los 101 análisis de herencia realizados, en función del marcador y cruce considerados, solo en cinco de ellos se mantiene una desviación estadísticamente significativa con respecto a la hipótesis nula de herencia mendeliana, después de aplicar el test de Bonferroni. Esto supone un 95.04% de marcadores que muestran segregaciones alélicas que se ajustan a las esperadas según la herencia mendeliana.

La mayoría de estudios realizados para establecer el modo de transmisión de los marcadores ISSRs también sugieren una herencia mendeliana para estos marcadores, a diferencia de otros marcadores como los RAPDs, donde es mucho más frecuente encontrar distorsiones de las segregaciones (Bucci and Menozzi, 1990; Tulsiera *et al.*, 1992). Así, por ejemplo, Tsumura *et al.* (1996), concluyeron que de 77 marcadores ISSRs, utilizados en Douglas-fir (*Pseudotsuga menzies*) y sugi, (*Cryptomeria japonica*), para el estudio del modo de herencia, el 96% seguía un modo mendeliano de herencia. El conocimiento del modo de herencia de estos marcadores es necesario para su utilización en estudios de genética de poblaciones.

Los marcadores utilizados para este análisis de herencia de los ISSRs en *E. plorans* han sido los generados por los cebadores (ISSR6, 7 y 14) que producían las bandas más fácilmente identificables por su nitidez y que tienen bajos o nulos valores de *allelic dropout*. Sin embargo, las distorsiones de las proporciones mendelianas encontradas en estos cinco análisis de herencia se han producido por un incremento del fenotipo “ausencia de banda” en la descendencia, por lo que no podemos descartar que el *allelic dropout* subyazca en alguna, sino en todas, las desviaciones de la herencia mendeliana observadas. En el piojo humano, *Pediculus humanus*, Mc Meniman & Backer (2006) encontraron distorsiones en la tasa de transmisión por vía masculina de los alelos de tres microsatélites autosómicos (mientras que la transmisión a través de las hembras sí cumplía las leyes de Mendel), no pudiendo explicarlas por *allelic dropout*, ya que los individuos descendientes eran heterocigotos, lo que apuntaba a una eliminación de cromosomas de origen paterno. Esta posibilidad no se contempla en *E. plorans* ya que ha sido profusamente estudiado citogenéticamente no observándose este fenómeno.

Finalmente, aunque los valores de *dropout* observados han sido mayoritariamente bajos o nulos, algunos alcanzaban niveles ciertamente elevados, por lo que hemos evaluado el posible efecto de este fenómeno sobre los resultados obtenidos en los análisis de la variación genética y de la estructura poblacional realizados con Hickory y Structure para los 97 marcadores ISSRs identificados. Para ello hemos repetido estos análisis, eliminando los 10 marcadores que mostraron estar más afectados por este fenómeno. El resultado fue que los valores de diversidad genética obtenidos mediante Hickory, para los 87 marcadores restantes, tanto para el total de las poblaciones como para las poblaciones costeras y las del Segura, por separado, son, en todos los casos, prácticamente idénticos a los obtenidos en el análisis inicial con los 97 marcadores.

De la misma forma, cuando determinamos la estructura genética poblacional con el software Structure, el valor de K que mejor se ajusta a nuestros datos se mantiene en 2 para el total de las poblaciones, en 4 para las poblaciones costeras y el 2 para las poblaciones de la cuenca del río Segura. Por lo tanto, el fenómeno de *dropout* no parece tener impacto sobre el escenario de diversidad genética y estructura poblacional proporcionado por los análisis de variabilidad realizados sobre el total de marcadores. Probablemente, el alto número de marcadores utilizados esté tamponando el efecto desvirtuador que teóricamente puede tener el fallo aleatorio en la amplificación de algunos alelos, lo que confirma los resultados obtenidos y revela a los ISSRs como un marcador molecular muy válido para los estudios poblacionales en nuestra especie de estudio, *Eyprepocnemis plorans*.

### 4.3.2. Genética de poblaciones en *E. plorans*

El uso de marcadores ISSR nos ha permitido cuantificar el grado de variabilidad genética y determinar la existencia de estructuración genética en diez poblaciones naturales de *E. plorans* analizadas en dos regiones separadas del sur (cinco poblaciones costeras de las provincias de Granada y Málaga) y sureste (cinco poblaciones de la cabecera de la cuenca del río Segura, en las provincias de Albacete y Murcia) de la Península Ibérica. Asimismo, hemos analizado el nivel de diferenciación poblacional y las relaciones filogenéticas entre estas poblaciones, y hemos realizado una estimación del número de migrantes por generación y del grado de aislamiento por distancia.

#### 4.3.2.1. Variabilidad genética

Como suele observarse en otros organismos (Hundsdoerfer & Wink, 2005; Pradeep *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2008) el grado de polimorfismo que presentan los marcadores ISSR en *E. plorans*, en las poblaciones analizadas, es muy elevado, puesto que el porcentaje observado de loci polimórficos era del 100% cuando consideramos todas las poblaciones en su conjunto, del 97% si sólo tenemos en cuenta las poblaciones de la costa y del 96% en el caso de las poblaciones del interior. Si comparamos los valores que presentan cada una de las poblaciones por separado (desde 59% en Socovos hasta 85% en El Gallego), el porcentaje de loci polimórficos era ligeramente más elevado en las poblaciones costeras ( $77.6 \pm 3.05$ ) que en las del Segura ( $71,20 \pm 11.39$ ), pero la diferencia no es significativa ( $t = 1.21$ ,  $df = 8$ ,  $P = 0.26$ ). De manera similar, altos niveles de polimorfismo fueron observados para los ISSR en la polilla *Plutella xylostella* (Roux *et al.* 2007).

La diversidad genética observada en las poblaciones, medida por la heterocigosidad esperada en caso de panmixia ( $h_s$ ) varían entre 0.192 en Socovos y 0.233 en Mundo, valores similares a los descritos para otros insectos estudiados mediante marcadores ISSR como, por ejemplo, *Antheraea mylitta* (Kar *et al.*, 2005) y *Plutella xylostella* ( $G_{st} = 0.238$ ) (Roux *et al.*, 2007). Sin embargo, los valores de  $h_s$  observados en *E. plorans* son algo inferiores a los descritos para RAPDs en el saltamontes suramericano *Sinipta dalmani* (0.274-0.326) (Sessarini & Remis, 2008) y en el mosquito *Anopheles darlingi* (0,27-0,32) (Pinedo-Cancino *et al.*, 2006). Menores valores que todos estos (0,09–0,14) se encontraron al analizar marcadores ISSR en el himenóptero *Gonatocerus ashmeadi* (De León & Jones, 2005).

Cuando comparamos  $H_s$  (es decir, la media de las  $h_s$  de todas las poblaciones analizadas) con  $H_t$  (la diversidad genética total del conjunto de poblaciones analizadas) observamos que  $H_s$  es menor que  $H_t$  en los tres análisis

realizados (para el conjunto de las diez poblaciones, para las localizadas en la costa y para las del interior). Esto sugiere la existencia de un déficit de heterocigotos, que podría explicarse por endogamia, subdivisión poblacional o por el propio efecto de *allelic dropout* que, como vimos, hace descender el porcentaje de heterocigotos. Dado el sistema poliginándrico de apareamiento de *E. plorans* (Pardo *et al.*, 1995), y los elevados tamaños de población que suele mostrar esta especie, no parece plausible que los apareamientos consanguíneos sean responsables del déficit de heterocigotos. Lamentablemente, con marcadores dominantes como los ISSRs no es posible estimar  $F_{is}$ , que hubiera dado información valiosa sobre si el apareamiento es panmítico en cada población. Como hemos visto, el *allelic dropout* tiene cierta incidencia en los resultados de los ISSR, por lo que puede haber contribuido a este déficit. Pero pensamos que el factor más importante es la existencia de subdivisión poblacional ya que, como veremos en el próximo apartado, nuestros resultados pusieron de manifiesto la existencia de una clara estructuración poblacional.

Sólo encontramos dos alelos privados, uno en la población de Algarrobo (alelo 39-1000, anexo 4.5) y otro en El Gallego (alelo 6-1600, anexo 4.1). Aun así, el análisis mediante Structure ha detectado estructuración poblacional significativa, como veremos a continuación.

#### 4.3.2.2. Estructura poblacional

El valor de  $\theta^{(II)}$  (análogo a  $G_{st}$  de Nei) en el conjunto de las 10 poblaciones (0,108) fue muy similar al de  $G_{st-B}$ , y ambos son significativamente mayores que cero. Esto sugiere la existencia de subdivisión poblacional. Cuando el análisis se realiza, por separado, en las dos regiones (costa y cabecera del río Segura), los resultados también indicaron subdivisión significativa, pero ésta era algo mayor en las poblaciones de la costa ( $\theta^{(II)}=0,058$ ) que en el Segura ( $\theta^{(II)}=0,040$ ). Al comparar los tres análisis se observa que la diferenciación poblacional es aproximadamente el doble cuando se incluyen las 10 poblaciones que cuando se analizan las cinco de cada región por separado, lo que sugiere que la mayor parte de la diferenciación tiene lugar entre las dos regiones (Segura y costa de Granada y Málaga). Esto quedó confirmado por los resultados de los AMOVAs realizados. Cuando este análisis se realizó al conjunto de las diez poblaciones, el 17.34% de la variación genética mostrada por los marcadores ISSRs se observa entre poblaciones ( $\phi_{ST}=0.1734$ ). Pero cuando se realizó distinguiendo las dos regiones mencionadas, el AMOVA detectó mayor variación (aproximadamente el doble) entre regiones ( $\phi_{CT}=0.1527$ ) que entre poblaciones dentro de regiones ( $\phi_{SC}=0.0758$ ). De hecho, el árbol construido con los  $F_{st}$  entre pares de poblaciones delimitó claramente las dos regiones (ver figura 4.12).

La existencia de estructuración poblacional fue reforzada por los resultados del análisis mediante el programa Structure, el cual, sin asignación geográfica previa de los individuos a poblaciones, estableció la existencia de dos regiones bien diferenciadas ( $K=2$ ), una correspondiente a la costa y la otra al río Segura, con niveles muy elevados de asignación geográfica correcta (ver en la tabla 4.11 cómo más del 90% de los individuos analizados fueron asignados a su zona geográfica de procedencia).

Cuando en el análisis se introdujeron sólo los individuos procedentes de la región costera, Structure delimitó cuatro grupos, pero sólo uno de ellos, al que fueron asignados el 94% de los individuos de Salobreña (Granada), quedó nítidamente delimitado, mientras que los otros tres mostraron asignaciones muy mezcladas de los individuos procedentes de las cuatro poblaciones malagueñas, con excepción de la asignación del 70% de los individuos de Algarrobo al grupo 3. Esto es lógico dada la mayor separación geográfica, hacia el este, de Salobreña, y de Algarrobo hacia el oeste.

Finalmente, cuando el análisis se realizó con los individuos procedentes del Segura, Structure distinguió dos zonas genéticas ( $K=2$ ) no muy bien delimitadas, ya que una de ellas incluía mayoría de individuos procedentes de Claras, Mundo y Calasparra, tres de las poblaciones más alejadas entre sí, y la otra incluía el 65% de los individuos de Socovos, quedando los individuos de El Gallego repartidos casi por igual entre las dos zonas. No existe, por tanto, una relación evidente entre esta subdivisión y la localización geográfica de estas poblaciones, si bien es cierto que Socovos pertenece a la cuenca más pequeña (conectado al pantano de El Cenajo a través del arroyo de Benízar), por lo que es concebible que esta población muestre diferenciación con respecto a las demás. Pensamos que el movimiento natural de esta especie es a lo largo de los ríos, arroyos y otros cauces de agua, alrededor de los cuales se instauran cultivos diversos. Esperábamos, por tanto, una mayor estructuración genética en las poblaciones de la cuenca del río Segura, pero ésta ha quedado pobremente definida con el programa Structure. Esto podría haber sido influido por el menor tamaño de muestra de las poblaciones de Claras (7 individuos), Mundo y Socovos (15 individuos). En contraste, en todas las poblaciones costeras se muestrearon 22 o más individuos por población.

#### **4.3.2.3. Flujo génico y aislamiento por distancia**

Según el modelo de islas infinitas (Wright, 1969), cuando se alcanza un equilibrio en el grado de diferenciación poblacional, es decir, cuando  $F_{st}$  se mantiene constante a lo largo de las generaciones, la fuerza relativa entre el flujo génico y la deriva genética puede medirse por el parámetro  $Nm$  que, a su vez, puede estimarse a partir de  $F_{st}$ . Muchos autores consideran que  $Nm$  refleja el número de migrantes

por generación, pero Mallet (2001) ha criticado duramente esta extensión del uso de  $Nm$  por considerar que este parámetro no tiene dimensiones, y sólo sirve para medir la fuerza relativa del flujo génico y la deriva genética. Así, cuando  $Nm$  es mucho mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación entre poblaciones. Algunos autores afirman que cuando  $Nm > 4$  el conjunto de poblaciones se comportan como una única población panmíctica (Fontdevila & Moya, 1999). En cambio, si  $Nm$  es mucho menor que 1, la deriva genética producirá la diferenciación entre poblaciones. Por otra parte, Takahata (1983) y Crow & Aoki (1984) demostraron que el tiempo que tarda una población en alcanzar el equilibrio flujo génico-deriva es aproximadamente el mayor de los valores  $N$  y  $1/m$ .

El valor de  $Nm=2$  obtenido a partir de  $Gst$  para el conjunto de las diez poblaciones de *E. plorans* analizadas en este trabajo, y los de  $Nm=4$  para las poblaciones de la costa y  $Nm=6$  para las del Segura, indican una tasa sustancial de flujo génico entre las poblaciones de esta especie de saltamontes, especialmente dentro de cada una de las dos regiones analizadas, la costera y el Segura. Estos valores promedio podrían estar afectados al alza por el pequeño tamaño de muestra de la población de Claras ( $N=7$ ), que mostró valores muy pequeños de  $Fst$  con respecto a las demás poblaciones del Segura (0.0057-0.0238, ver Anexo 4.23), ya que es bien sabido que tanto  $Fst$  como  $Gst$  son altamente dependientes del tamaño de muestra y de la frecuencia alélica (Waples, 1998). De hecho, los valores de estos parámetros por debajo de 0.02 conducen a estimas de  $Nm$  que pueden verse muy afectadas por ruido de muestreo (Palumbi, 2003). En cualquier caso, Waples (1998) señaló que debido a la dificultad de medir con precisión valores muy pequeños de  $Fst$ , es difícil cuantificar  $Nm$  en especies con elevada capacidad de dispersión. No obstante, como señala Palumbi (2003), cuando los datos genéticos demuestran marcado aislamiento por distancia, las estimas de la diferenciación genética pueden considerarse más robustas y se puede concluir, con mayor confianza, que ésta se debe a características biológicas de las poblaciones.

Además, es posible que los valores de  $Nm$  se hayan visto afectados, al alza, por la liberación de 50 machos de *E. plorans* procedentes de Salobreña, realizada por nuestro grupo en 1994 ya que, como mostramos en el capítulo 5 (“Invasión Experimental del cromosomas  $B_2$  en El Gallego”), en 2006 pudimos detectar en El Gallego la presencia de algunos individuos con fenotipo para los marcadores ISSR típico de Salobreña. Esto produjo una disminución en la diferenciación entre poblaciones, y por tanto en  $Fst$ , que se tradujo en valores incrementados de  $Nm$ . La magnitud de este efecto es difícil de evaluar. De hecho, como se deduce del Anexo 4.23, el promedio de los  $Nm$  entre El Gallego y las otras poblaciones (4.3) era similar al observado para Socovos (4.5) y Calasparra (4.4), y netamente inferior a los de

Claras (9.8) y Mundo (7.4). Pero estas dos últimas poblaciones son precisamente las que fueron muestreadas con menor intensidad, por lo que estos valores, como dijimos anteriormente, pudieron haber sido afectados por ruido de muestreo. Un cálculo similar para las poblaciones costeras pone de manifiesto que la población de Salobreña es la que se encuentra más aislada del resto de las poblaciones, pues muestra un  $N_m$  promedio de 1.9, mientras que este parámetro era 3 en Algarrobo, 3.9 en Torrox, 4.2 en Nerja0 y 4.1 en Tetuan.

Los valores de  $N_m$ , mencionados anteriormente, fueron estimados asumiendo el modelo de las islas infinitas de Wright (1969), con igual tasa de migración ( $m$ ) entre cada dos islas. Aunque este modelo parece algo irreal, en comparación con el modelo de las piedras de paso, Slatkin & Barton (1989) demostraron que las estimas de  $N_m$  mediante el modelo de islas infinitas son del orden correcto de magnitud, pero dependerán de la distancia geográfica que separa a las poblaciones analizadas. De hecho, las estimas de  $N_m$  son especialmente robustas cuando se observa aislamiento por distancia entre las poblaciones.

El aislamiento por distancia, analizado mediante el test de Mantel a partir de los valores de  $F_{st}$  entre cada dos poblaciones de *E. plorans*, y la distancia geográfica que las separa, reveló la existencia de aislamiento por distancia significativo en el conjunto de las 10 poblaciones, y también entre las 5 poblaciones costeras, pero no entre las 5 poblaciones del río Segura. Obtuvimos el mismo resultado a partir de los valores de  $N_m$  entre pares de poblaciones, calculados a partir de los  $F_{st}$  (ver figuras 4.10-4.12), aunque este resultado era de esperar porque, al fin y al cabo, la variable dependiente es la misma en los dos casos.

No obstante, una objeción que podría ponerse a este resultado es que está basada en  $F_{st}$ , que se obtiene a partir de las frecuencias alélicas, y éstas son calculadas, en el caso de marcadores dominantes como los ISSRs, asumiendo la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg (que puede no darse). Así, la frecuencia del alelo recesivo (ausencia de banda) se calcula como la raíz cuadrada de la frecuencia relativa de individuos sin banda. Pero la ausencia de banda puede deberse a un número de factores como, por ejemplo, la pérdida del sitio para anclaje del cebador debido a una mutación, inserciones o deleciones en el fragmento entre los cebadores (cambiando su tamaño), la existencia de alelos nulos o el *allelic dropout* mencionado anteriormente. Es por ello que los métodos basados exclusivamente en la presencia de bandas compartidas, descartando las ausencias de banda, como son el de Dice/Sorensen y el de Nei/Li, que son equivalentes, son más robustos frente a los mencionados problemas.

La confirmación de la existencia de aislamiento por distancia significativo en el conjunto de las 10 poblaciones y en las 5 de la costa, al utilizar el índice de Dice en vez de  $F_{st}$ , constituye un excelente soporte para los resultados obtenidos a partir de  $F_{st}$ , y sugiere que los valores de este último parámetro, y el aislamiento por distancia estimado a partir de él, son realmente robustos y reflejan propiedades demográficas e históricas de las poblaciones analizadas.

En el único saltamontes donde se han analizado valores de  $F_{st}$  y aislamiento por distancia entre poblaciones naturales, ha sido *Sinipta dalmani*, una especie suramericana donde el análisis de marcadores RAPDs ha revelado valores de  $F_{st}$  entre 0.058 y 0.23 (media=0.122) (Sessarini & Remis, 2008), es decir, un poco más elevados que para los ISSR en *E. plorans*, donde los valores de  $F_{st}$  entre pares de poblaciones variaban entre 0.0057 y 0.18 (media=0.102) (ver Anexo 4.23). Pero mientras que en *E. plorans* había aislamiento por distancia significativo a la escala de las 10 poblaciones analizadas, y también a la menor escala de las 5 poblaciones costeras, en *S. dalmani* no había aislamiento por distancia entre las ocho poblaciones argentinas analizadas, por lo que Sessarini & Remis (2008) sugirieron que la divergencia entre poblaciones no fue gradual.

En grillos del género *Stenopelmatus*, otro ortóptero, Vandergast *et al.* (2009) demostraron la existencia de aislamiento por distancia tanto para marcadores ISSR como para ADN mitocondrial.

Otros organismos, como se ha descrito en los murciélagos migratorios que nacen en un mismo lugar, pueden ser muestreados en invierno en lugares separados por cientos de kilómetros, observándose muy poca diferenciación genética entre ellos (Petit *et al.*, 2001). Similarmente baja diferenciación genética se ha descrito entre poblaciones del mosquito de la malaria *Anopheles darlingi* ( $F_{st}=0,017$ ) (Pinedo-Cancino *et al.*, 2006), y entre poblaciones del insecto *Bactericera cockerelli* ( $G_{st}=0.0082-0.0142$ ) (Liu *et al.*, 2006). En cambio, en el himenóptero *Gonatocerus ashmeadi* se ha encontrado elevada diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}=0,376$ ) y, en consecuencia, un flujo génico muy restringido ( $N_m=0.83$ ) para marcadores ISSR (de León & Jones, 2005). En los gusanos de seda se han descrito diferentes situaciones pues, mientras que en *Samia cynthia ricini* se encontró elevada diferenciación ( $G_{st}=0,66$ ) y muy bajo flujo génico ( $N_m=0.26$ ) entre poblaciones de India (Vijayan *et al.*, 2006), en *Antheraea mylitta* había menor diferenciación genética ( $G_{st}=0,25$ ) y mayor flujo génico ( $N_m=1.5$ ) (Kar *et al.*, 2005). Grados de diferenciación aún mayores ( $G_{st}=0.776$ ) se han descrito en el cestodo *Ligula intestinalis* (Bouزيد *et al.*, 2008).

¿Qué significan estas estimas de  $N_m$  en *E. plorans*? En la población de El Gallego, realizamos una estima del tamaño poblacional, mediante marcaje y recaptura (ver capítulo 5, "Invasión experimental del cromosoma  $B_2$  en El Gallego") por cual  $N=1439$ . Con ello, podemos realizar una estima de  $m$  a partir de  $N_m$ . Si tomamos este número como promedio de las poblaciones analizadas, el valor de  $N_m=6$  observado en las poblaciones del Segura implicaría una tasa de migración ( $m$ ) de 0.0042.

Según Slatkin (1994), para que una estima del promedio de  $N_m$ , a partir de  $F_{st}$ , sea útil, debería ser relativamente insensible a otras fuerzas que no sean el flujo génico o la deriva genética, especialmente a la tasa de mutación y a la intensidad de la selección. En el caso de los ISSRs, hay que señalar que es de esperar que sean selectivamente neutros, pero su tasa de mutación es elevada. Se espera que la mutación incremente  $F_{st}$  y produzca estimas rebajadas del flujo génico. Pero Takahata (1983) y Crow & Aoki (1984) demostraron que, en el modelo de islas infinitas y para un locus con una tasa de mutación  $\mu$  hacia alelos que no se hallaban previamente en la población,  $F_{st}$  en el equilibrio es aproximadamente independiente de la tasa de mutación mientras ésta sea mucho menor que la tasa de migración. En *E. plorans*, la tasa de migración estimada ( $m=0.0042$ , ver párrafo anterior) sugiere que sólo los alelos con tasas de mutación cercanas (o mayores) a 0.0042 afectarían al cálculo de  $N_m$  a partir de  $F_{st}$ . Las estimas que se han realizado de las tasas de mutación de los SSRs, en seres humanos (Weber & Wong, 1993), indican tasas de mutación cuatro veces mayores para los tetranucleótidos (0.0021) que para los dinucleótidos (0.00056). Aunque son tasas muy elevadas, en ningún caso superan el valor estimado de la tasa de migración (0.0042). Si tenemos en cuenta, además, que cuatro de los seis SSRs utilizados en nuestro estudio eran dinucleótidos y los otros dos eran trinucleótidos, es de esperar que, en nuestro caso, las tasas promedio de mutación sean cercanas a 0.00056, un valor que es 7.5 veces menor que la tasa de migración. Por tanto, creemos que nuestros resultados no han sido muy afectados por la elevada tasa de mutación de los marcadores utilizados.

Por otra parte, Slatkin & Barton (1989) demostraron que  $F_{st}$ , en un modelo de islas infinitas, tampoco es muy sensible a la selección que favorezca a uno o dos alelos en cada población, excepto en el caso de que haya adaptación local, es decir, que la selección favorezca a alelos diferentes en lugares geográficos diferentes. Esto produciría un incremento en  $F_{st}$  y, por tanto, una disminución aparente de las estimas de  $N_m$ .

La menor diferenciación genética entre poblaciones observada en las poblaciones del Segura, así como la inexistencia de aislamiento por distancia, contrasta aun más con la existencia de aislamiento por distancia y mayor

diferenciación entre las poblaciones de las costas de Granada y Málaga, si tenemos en cuenta que las distancias promedio entre poblaciones son cuatro veces mayores entre las poblaciones del Segura ( $73.14 \pm 8,93$ ) que las existentes entre las poblaciones costeras ( $18.01 \pm 3,93$ ) ( $t = 5,65$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0.000023$ ), y que en ambas zonas las poblaciones estaban asociadas a cultivos agrícolas. En el áfido *Schlechtendalia chinensis*, se han observado mayores valores de diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{st} = 0.239$ ) que en *E. plorans*, pero en el primero no se ha observado aislamiento por distancia, un hecho que Ren *et al.* (2008) atribuyeron a la deriva genética o bien a la pequeña escala espacial entre las poblaciones analizadas. Este último factor no parece ser el responsable de la ausencia de aislamiento por distancia en *E. plorans* del Segura ya que, como acabamos de ver, la escala era mayor para estas poblaciones que para las poblaciones costeras, donde sí detectamos aislamiento por distancia significativo. Aunque no podemos descartar que la menor diferenciación entre las poblaciones del Segura pueda deberse, como hemos indicado anteriormente, a la existencia de mayor flujo génico en el Segura, no cabe duda de que esa menor diferenciación puede ser indicadora del origen reciente de estas poblaciones, tal como sería de esperar tras un proceso de colonización reciente en esa zona geográfica. La deriva genética pudo afectar inevitablemente a las colonizaciones recientes de esas poblaciones, si éstas se produjeron a través de pocos individuos. En el lepidóptero *Hyles tithymali* muestreado en diferentes islas canarias, se ha encontrado escasa diferenciación genética entre poblaciones, lo que condujo a Hundsdoerfer & Wink (2006) a proponer que las islas han sido colonizadas rápida y recientemente por este insecto.

#### 4.3.3. Distribución geográfica de los cromosomas B

La distribución geográfica de los cromosomas B es acorde con la estructura y la diferenciación genética que presentan las poblaciones de *E. plorans* analizadas. La figura 4.12 nos muestra un árbol construido a partir de las genéticas *Pairwise-Fst* donde las poblaciones que presentan el cromosoma  $B_1$  ancestral aparecen agrupadas (Mundo y Calasparra) al igual que las que no presentan cromosomas B de forma natural, Socovos y Claras (Cabrero *et al.*, 1997); la población de El Gallego es la más próxima de entre las del interior a las costeras, lógico puesto que allí fueron introducidos individuos procedentes de Salobreña (ver capítulo 5). Por otra parte, Salobreña, donde únicamente se encuentra la variante  $B_2$ , aparece algo más alejada del resto de poblaciones costeras, mientras que Torrox, Tetuán, Nerja0 y Algarrobo, que presentan tanto la variante  $B_2$  como la  $B_{24}$ , aparecen juntas.

Como ya indicábamos en el capítulo del ADN mitocondrial, en el último millón de años se han producido sucesivas glaciaciones, una cada aproximadamente 100.000 años, la última de las cuales tuvo lugar hace unos 20.000 años (Hewitt 1999,

2001). Aunque la Península Ibérica es considerada uno de los principales refugios para las especies europeas de zonas templadas (junto con las penínsulas Itálica y Balcánica) (Hewitt 1999, 2001), no cabe duda de que el descenso de temperaturas inherente a las glaciaciones tuvo que ejercer efectos en muchas especies en regiones no afectadas directamente por el hielo. Esto podría ocurrir, por ejemplo, a escala microgeográfica, asociado a los cambios de temperatura, y ello sería más aparente en relación con la altitud. Por ejemplo, en sapos tropicales de la Guayana se ha demostrado el efecto diversificador de las fluctuaciones climáticas del cuaternario (Noonan & Gaucher, 2005). El saltamontes *E. plorans* es una especie de origen africano que, en Europa, habita principalmente en lugares costeros a lo largo de toda la costa mediterránea. Sin embargo, esta especie es capaz de adentrarse hacia el interior a lo largo de las cuencas de los ríos mediterráneos y aprovechando las zonas agrícolas desarrolladas junto a éstos, llegando así a encontrarse en regiones de mayor altitud (incluso en localidades como Nerpio, en la provincia de Albacete, situada a 1000 metros de altitud; Camacho JPM, observación personal).

Hernández & Presa (1984) analizaron una población de *E. plorans* en la huerta de Murcia, situada en el sureste de la Península Ibérica a orillas del río Segura, aguas abajo de las poblaciones muestreadas por nosotros. Según estos autores, ésta es una especie con una sola generación al año, de julio a marzo, que se encuentra en todos los tipos de cultivos y casi todas las asociaciones vegetales muestreadas, en esa zona, con valores elevados de abundancia. Esto es debido a su carácter polífago, poco exigente en su dieta, a su elevado poder de dispersión y gregarización, recorriendo cortas distancias que le posibilitan el descubrimiento de nuevas condiciones bióticas apropiadas, y al aprovechamiento de casi cualquier tipo de cultivo agrícola. A esto habría que unir la elevada capacidad reproductora de esta especie, ya que las hembras de *E. plorans* pueden producir, a lo largo de su vida y tras una sola cópula, un promedio de 130 huevos y 119 embriones, aunque algunas pueden llegar a producir hasta 313 huevos (en ocho puestas) y 290 embriones, debido a su capacidad para almacenar el esperma (López-León *et al.*, 1994b). Esto facilita enormemente la colonización de nuevos territorios (por ejemplo nuevas zonas de cultivo) porque una sola hembra que lograra alcanzarlos podría fundar una nueva población de esta especie. Esto podría explicar cómo esta especie, eminentemente costera, ha llegado a localidades situadas a elevada altitud, tales como Calasparra (385m), Mundo (520m), El Gallego (600m), Claras (740m) y Socovos (800m). En un escenario de colonización se espera baja densidad de población, al principio. Pero incluso en esas condiciones la tasa reproductiva de hembras que sólo hayan conseguido una cópula es elevada. Teniendo en cuenta, además, que la productividad de huevos de las hembras incrementa significativamente con el número de cópulas (Pardo *et al.*, 1995), es de esperar que

pasadas las primeras generaciones tras una colonización, el incremento en el tamaño de población se espera que sea exponencial.

Con todos estos elementos, es lógico pensar que muchas de las poblaciones de *E. plorans* que observamos hoy día en zonas de elevada altitud, como son las de la cabecera del río Segura, han estado sujetas a extinción y recolonización recientes asociadas a los cambios climáticos inherentes a la última glaciación, y muy probablemente a cambios aun más recientes en el grado de explotación agrícola a orillas del río Segura. De haber existido *E. plorans* en la cabecera de este río, antes de la última glaciación, es muy probable que esas poblaciones no resistieran el descenso de temperatura asociado a la glaciación y desaparecieran. Incluso aunque esto no hubiera ocurrido, la presencia actual indica recolonización reciente desde las poblaciones situadas a menor altitud, aguas abajo en el río.

La recurrencia en las colonizaciones aguas arriba en el Segura, explicaría la ausencia de cromosomas B en las poblaciones situadas a 600m o más (Socovos en el arroyo de Benízar, El Gallego en el río Segura, Claras en el río Taibilla y Ayna en el río Mundo), y avala la hipótesis de Cabrero *et al.* (1997) que proponía que la ausencia de cromosomas B en estas poblaciones se debe a que las poblaciones actuales que carecen de Bs son reliquias de poblaciones anteriores al origen del B a las que no han llegado individuos con B procedentes de la costa. Sin embargo, los pequeños valores de *Fst* observados entre poblaciones con (Calasparra y Mundo) y sin (Claras y Socovos) cromosomas B sugiere que el B es de origen reciente (o al menos ha llegado recientemente a la Península Ibérica). Resultados recientes de nuestro grupo (Muñoz-Pajares *et al.*, en preparación) sugieren la posibilidad del origen reciente de los cromosomas B de *E. plorans*, ya que un marcador SCAR, específico del B, muestra una secuencia muy conservada entre cromosomas B procedentes de lugares tan alejados como Marruecos, la Península Ibérica, Grecia y Armenia.

La ausencia de aislamiento por distancia en las poblaciones de la cabecera de los ríos de la cuenca del Segura, observada para los ISSRs, y la elevada magnitud de flujo génico entre poblaciones que ello podría implicar, dificulta explicar por qué en las cabeceras de los ríos del Segura (Segura, Mundo, Taibilla, etc.) no se encuentran cromosomas B en *E. plorans*, ya que con elevado flujo génico ¿por qué no han llegado los cromosomas B a esas poblaciones? Perfectti *et al.* (2004b) analizaron el aislamiento por distancia para las diferencias entre poblaciones en frecuencia de Bs a lo largo del río Segura, y observaron aislamiento por distancia significativo en unos años pero no en otros, siendo especialmente aparente en la desembocadura del río. La mayor similitud entre poblaciones cercanas podía ser explicada por un alto nivel de flujo génico, recolonización, ascendencia común de las poblaciones o adaptación local, aunque estos autores señalaron la importancia de la

estructura metapoblacional en *E. plorans* y la importancia de las recolonizaciones en la dinámica de poblaciones de esta especie.

Los elevados valores de  $Nm$  entre las poblaciones de *E. plorans* se acercaron, en muchos casos, al límite por encima del cual las poblaciones se comportarían como una única población panmíctica ( $Nm=4$ ). Recientemente hemos descubierto un factor adicional que puede explicar, en parte, la elevada tasa de flujo génico observada. Así, hace dos años observamos la presencia de varios ejemplares de *E. plorans* en plantas de la especie *Thuja occidentalis* de un vivero de Granada (Camacho JPM, observación personal), y este mismo año hemos capturado ejemplares de esta especie en la vega de Granada, en un lugar muy próximo al mencionado vivero. Dado que en los 30 años que llevamos estudiando esta especie nunca la habíamos encontrado a menos de 30 Km de Granada (el lugar más cercano fue Melegí, en el valle de Lecrín), preguntamos en el vivero la procedencia de aquellas plantas, y nos dijeron que venían de Valencia, donde nos consta que *E. plorans* es muy abundante. Los propietarios de las tierras donde capturamos los especímenes nunca habían visto saltamontes como esos en sus tierras. Además, el análisis de los ejemplares capturados indica que llevan un cromosoma B de tamaño similar a  $B_1$ , el tipo de cromosoma B más abundante en la región de Valencia, y que es muy raro en la costa de Granada, lo que confirmaría su procedencia levantina. Estas observaciones apuntan al transporte de plantas cultivadas entre viveros y a los campos de cultivo como un vehículo importante para la migración de esta especie. Este mecanismo puede servir para la colonización de poblaciones nuevas, como Granada, y puede haber contribuido enormemente a la homogenización genética de muchas poblaciones de la Península Ibérica y Marruecos, dos zonas que, por su cercanía geográfica y alta relación histórica y comercial, han tenido un elevado grado de conexión, especialmente desde la ocupación árabe, entre los siglos VIII y XV (ver Gaubert *et al.*, 2009).

Estas migraciones pasivas a larga distancia pueden contribuir a explicar la paradoja de Slatkin, por la que, en algunos insectos voladores, se ha observado una inconsistencia entre las estimas directas del flujo génico, que parecen indicar bajos niveles de dispersión, y las estimaciones indirectas, a partir de  $F_{st}$ , que revelan la existencia de flujo génico elevado en el pasado reciente (Slatkin, 1987). Recientemente se ha demostrado que este fenómeno también se da en plantas del género *Ficus* facilitado por polinizaciones excepcionales a larga distancia (Yu *et al.*, 2010). En *E. plorans* no se han realizado estimaciones directas del flujo génico, por lo que no es posible saber si se trata de otro caso encuadrable dentro de la paradoja de Slatkin. Pero los elevados niveles de flujo génico obtenidos a partir de  $F_{st}$  sugieren una elevada capacidad de dispersión de esta especie, máxime teniendo en cuenta su asociación con los cultivos de una gran variedad de plantas diferentes (Arnaldos &

Presa, 1993) y la posibilidad de realizar migraciones a larga distancia transportados pasivamente en plantas comerciales. La elevada similitud genética entre poblaciones del escarabajo acuático *Macrolea mutica*, en el mar Báltico, se ha explicado mediante migraciones pasivas a través de plantas a la deriva y de aves migradoras (Mende *et al.*, 2010). En el hongo *Rosellinia necatrix*, patógeno de la chufa (*Cyperus esculentus*), se ha encontrado una gran homogeneidad genética, para marcadores ISSR, en la provincia de Valencia, que sugiere la introducción reciente del patógeno en la zona y su dispersión a través de tubérculos infectados usados como material de propagación, y por tubérculos arrastrados por el agua de riego (Armengol *et al.*, 2010)

Finalmente, no podemos dejar de comentar que, aunque la ausencia de cromosomas B en la cabecera del Segura es compatible con la recolonización reciente, río arriba, por individuos portadores de cromosomas B, y la existencia de un límite marcado por barreras geográficas en cada río, tal como apuntaron Cabrero *et al.* (1997), no podemos descartar que la ausencia de cromosomas B se deba a una baja tolerancia de estos elementos parasíticos en poblaciones de elevada altitud. Una razón para esta baja tolerancia podría tener relación con el efecto que se ha demostrado para algunos cromosomas B, en otras especies, alargando el ciclo celular (Evans *et al.*, 1972) y, por consiguiente, enlenteciendo el desarrollo y alargando el ciclo vital de los organismos (Nur, 1966; Hewitt & East, 1978; Harvey & Hewitt, 1979). Esto acortaría el período de tiempo útil para la reproducción de *E. plorans* y pondría en desventaja a los portadores de Bs en lugares de mayor altitud, donde el invierno comienza antes, y es más frío, que en las localidades costeras o de interior situadas a altitudes menores. De hecho, el fracaso de nuestro intento de introducción de cromosomas B en Vicorto (Albacete), donde liberamos 50 machos de Salobreña en 1994 y nunca volvimos a encontrar individuos con cromosomas B en varios muestreos posteriores, y la incapacidad de invasión del B introducido en El Gallego (ver capítulo 5), apuntarían en la dirección de una baja tolerancia de la presencia de Bs en estas poblaciones de la cabecera del río Segura.

## **5. Invasión experimental del cromosoma $B_2$ en El Gallego**

---





## 5.1. INTRODUCCIÓN

Los cromosomas B se comportan, en la mayoría de los casos, como parásitos genómicos que ejercen efectos deletéreos sobre los individuos portadores y se mantienen en las poblaciones gracias a que presentan tasas de transmisión superiores a la mendeliana (los llamados mecanismos de acumulación; en inglés “drive”) (Östergren, 1945; Jones & Rees, 1982; Beukeboom, 1994; Jones, 1995). Alternativamente, es concebible que los cromosomas B confieran algún beneficio en eficacia biológica a los individuos portadores, al menos cuando se encuentran en bajo número. En este caso los cromosomas B incrementarían en frecuencia rápidamente ayudados por la selección fenotípica que favorecería a los individuos portadores. Darlington (1958) y White (1973) propusieron el modelo heterótico para los cromosomas B que son beneficiosos en bajos números y perjudiciales en números elevados. La investigación de la naturaleza de un cromosoma B pasa, por tanto, por averiguar su tasa de transmisión, mediante cruzamientos controlados, y sus efectos sobre la eficacia biológica de los individuos portadores. Si un B muestra acumulación y efectos deletéreos, se ajusta claramente al modelo parasítico, pero si no muestra acumulación y posee algún efecto fenotípico beneficioso para los portadores, se ajusta mejor al modelo heterótico.

Una forma adicional de probar la naturaleza parasítica de los cromosomas B es mediante experimentos de invasión artificial, es decir, liberando individuos con B en una población donde las evidencias anteriores indicaron la ausencia de estos cromosomas. Las expectativas serían diferentes para un B heterótico y un B parasítico. El primero debería invadir rápidamente la población ayudado por la selección fenotípica a favor de los individuos portadores. Pero un B parasítico sólo podría invadir la población en el caso de que se expresara un mecanismo de acumulación, dado que los efectos deletéreos del B sobre los portadores incidirían negativamente sobre la frecuencia del B. El único experimento de invasión artificial de un cromosoma B, en una población natural sin Bs, fue realizado por Gosálvez y López-Fernández (1984) en el saltamontes *Arcyptera fusca*, y el resultado fue la desaparición del B introducido en pocas generaciones.

En el saltamontes *Eyreprepnemis plorans*, las investigaciones anteriores de nuestro grupo han demostrado que los cromosomas B de esta especie muestran mecanismos de acumulación cuando invaden las poblaciones, pero estos mecanismos son luego neutralizados por el incremento en frecuencia de variantes génicas de los cromosomas A que suprimen la acumulación del B (Camacho *et al.*, 1997; Zurita *et al.*, 1998), un proceso que puede ocurrir muy rápidamente (Perfectti *et al.*, 2004a). Por otra parte, el principal efecto deletéreo de los cromosomas B en *E. plorans* se ha detectado para la fertilidad de los huevos (Zurita *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1998).

Los cromosomas B están presentes en prácticamente la totalidad de las poblaciones costeras españolas de *E. plorans*, desde Tarragona hasta Huelva, incluyendo Mallorca y Menorca (Camacho *et al.*, 1980; Henriques-Gil *et al.*, 1984; Henriques-Gil y Arana, 1990; Riera *et al.*, 2004). Las únicas poblaciones sin cromosomas B se han encontrado en la cabecera de varios ríos pertenecientes a la cuenca del Segura (Cabrero *et al.*, 1997). En las poblaciones de este río, situadas aguas abajo de una frontera delimitada por la existencia de desfiladeros en los ríos, al atravesar zonas montañosas, que son lugares inhóspitos para esta especie, sin embargo, se encontraron cromosomas B de la variante B<sub>1</sub>, la más extendida en la Península Ibérica. Al coincidir la frontera de los cromosomas B con accidentes geográficos, Cabrero *et al.* (1997) propusieron que la ausencia de cromosomas B en la cabecera de los ríos de la cuenca del Segura se podía explicar mediante procesos históricos, no selectivos, es decir, que las poblaciones sin B eran anteriores al origen del B (en zonas costeras) y aun no habían sido invadidas por individuos portadores de cromosomas B.

Para contribuir a esclarecer el significado biológico de los cromosomas B de *E. plorans*, realizamos un experimento de introducción forzada, liberando individuos con B, procedentes de Salobreña (Granada), en la población de El Gallego (Albacete), donde estudios anteriores no habían detectado su presencia (Cabrero *et al.*, 1997). La variante de cromosoma B introducida no fue B<sub>1</sub>, típica de la región a la que pertenece la población de El Gallego, sino la variante B<sub>2</sub>, extendida por las provincias de Málaga y Granada.

## 5.2. RESULTADOS

### 5.2.1. Evolución de la frecuencia del cromosoma B<sub>2</sub> introducido en la población de El Gallego

En primer lugar, obtuvimos una estima de la frecuencia inicial de cromosomas B<sub>2</sub> en la población de El Gallego tras la liberación en 1994 de 50 machos procedentes de Salobreña, donde el B predominante es B<sub>2</sub>. El tamaño poblacional estimado en El Gallego, justo antes de la liberación, fue de 1439 individuos, y el análisis citogenético de una muestra capturada en 1993 indicó la ausencia de cromosomas B en esta localidad (Cabrero *et al.*, 1997). La media ponderada de las dos poblaciones mezcladas resultó en una frecuencia media inicial de Bs de 0.03, en el momento de la liberación (ver el apartado 2.2.7.2. “Liberación de machos procedentes de Salobreña y seguimiento de la frecuencia de los cromosomas B en El Gallego durante doce años”).

Durante los años 1996, 1999, 2000, 2002, 2006 y 2008 muestreamos la población para realizar un seguimiento de las posibles variaciones en frecuencia y morfología que pudiera haber sufrido el B introducido. La tabla 5.1 muestra la prevalencia de cromosomas B a lo largo de los distintos años de muestreo.

Tabla 5.1. Frecuencia de cromosomas B en El Gallego a lo largo del tiempo.

Año	Sexo	0B	1B	Total	Prevalencia de Bs
1996	Machos	46	4	50	0.08
1999	Machos	48	4	52	0.077
2000	Machos	49	0	49	0
"	Hembras	44	3	47	0.064
"	Ambos sexos	93	3	96	0.031
2002	Machos	99	2	101	0.02
"	Hembras	22	0	22	0
"	Ambos sexos	121	2	123	0.016
2006	Machos	65	0	65	0
"	Hembras	12	0	12	0
"	Ambos sexos	77	0	77	0
2008	Machos	79	1	80	0.0125
Total		464	14	478	0.029

En la figura 5.1 podemos apreciar cómo la prevalencia de cromosomas B aumentó los primeros años pero fue disminuyendo en los sucesivos muestreos.

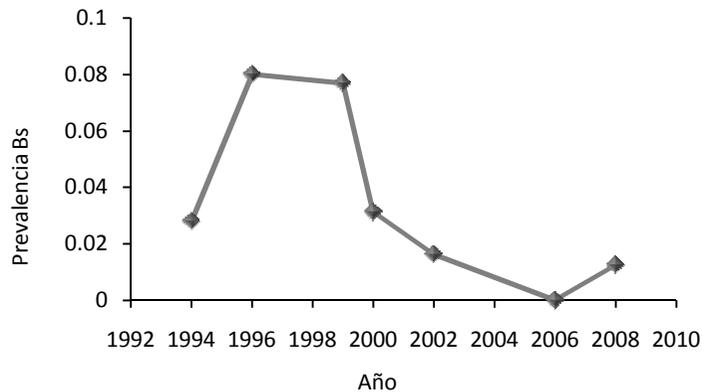


Figura 5.1. Evolución de la prevalencia de cromosomas B en El Gallego entre 1994 y 2008.

## 5.2.2. Análisis de la transmisión de los cromosomas B, mediante cruces controlados

### 5.2.2.1. Análisis *in vivo* de las hembras

Para investigar las posibilidades de invasión de los cromosomas B encontrados en El Gallego, tras la liberación de los machos de Salobreña, analizamos *in vivo* las hembras capturadas en el 2000 mediante la técnica de tinción con cromomicina de hemolinfa (Cabrero *et al.*, 2006). Tres de las hembras estudiadas presentaban cromosomas B y fueron cruzadas, por separado, con machos 0B de su misma población. Sólo obtuvimos puestas de dos de ellas (una de las hembras nos proporcionó una puesta y la otra tres; de estas tres últimas obtuvimos información sobre la tasa de transmisión del cromosoma B).

El análisis citogenético del número de cromosomas B presentes en los 69 embriones descendientes de las hembras 1B indica que existe una tendencia significativa a la eliminación del cromosoma B, siendo la tasa media de transmisión (0.239) muy inferior a la mendeliana, 0.5 (tabla 5.2).

Tabla 5.2. Análisis de la transmisión del cromosoma B

Nº puesta	Nº huevos	Nº embriones	Fertilidad	0B	1B	Total	K <sub>B</sub>	Z	P
1	12	10	0.833	8	1	9	0.111	-2.33	**
2	28	26*	0.929	5	5	10	0.500	0.00	NS
3	34	33	0.971	22	5	27	0.185	-3.27	**
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>69</b>	<b>0.932</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>46</b>	<b>0.239</b>	<b>-3.54</b>	<b>**</b>

\*Del total de 26 embriones, sólo pudimos estudiar 10.

### 5.2.2.2. Análisis del número de huevos, embriones y fertilidad de las puestas obtenidas a partir de los cruces controlados

Para comparar el número de huevos, de embriones y la fertilidad entre hembras portadoras y no portadoras de cromosomas B, realizamos también cruzamientos en los que tanto el macho como la hembra carecían de Bs. Sólo obtuvimos puestas de seis de estos cruces. La tabla 5.3 resume el número de huevos y embriones por puesta de los cruzamientos realizados.

Tabla 5.3. Número de huevos y de embriones de las puestas de las hembras cruzadas

Cariotipo de la hembra	Nº de Huevos	Nº de embriones
0B	34	30
0B	41	35
0B	66	54
0B	57	44
0B	42	40
0B	75	71
1B	24.3*	23
1B	33	31

\*Promedio de tres puestas de una misma hembra.

Como podemos observar, el número de huevos y de embriones tiende a ser mayor en las puestas de las hembras que carecen de Bs. Para comprobar si realmente existen diferencias significativas entre el número de huevos, el número de embriones y la fertilidad entre hembras con y sin cromosomas B, hemos realizado un test de Mann-Whitney cuyo resultado indica que las hembras portadoras de un cromosoma B producen menos huevos por puesta que las 0B (tabla 5.4). El número de embriones por puesta era también mucho menor en las hembras con B, pero la diferencia no llegó a ser significativa, dados los pequeños tamaños de muestra utilizados, especialmente de hembras con B. Finalmente, la fertilidad de los huevos era muy similar en ambos tipos de hembra.

Tabla 5.4. Test de Mann-Whitney aplicado al número de huevos y de embriones y a la fertilidad de las hembras cruzadas de El Gallego.

	Media		Z ajustada	P
	0B	1B		
Nº huevos	52.5	28.833	2	0.046
Nº embriones	45.667	27	1.667	0.096
<b>Fertilidad</b>	0.871	0.936	-0.667	0.505

### 5.2.3. Seguimiento de la introducción del cromosoma B<sub>2</sub> en El Gallego

Como parte del seguimiento del cromosoma B introducido desde Salobreña en El Gallego, hemos realizado análisis citogenéticos que nos han ayudado a comprobar si los cromosomas B observados en El Gallego son similares a los introducidos desde Salobreña (B<sub>2</sub>). Además, para averiguar si los individuos introducidos se cruzaron efectivamente con las hembras locales, hemos empleado datos moleculares analizando 97 marcadores ISSR en muestras de Salobreña, El Gallego y otras poblaciones cercanas.

### 5.2.3.1. Citogenética de los cromosomas B encontrados en El Gallego

Antes de la introducción forzada del cromosoma B<sub>2</sub> de Salobreña en la población de El Gallego, no detectamos la presencia de Bs en los 82 individuos analizados en 1993 en esta población (Cabrero *et al.*, 1997). No obstante, cabría la posibilidad de que hubiera previamente Bs en El Gallego a una frecuencia muy baja de 0.012 (1/82). Para identificar qué tipo de B está actualmente presente, tras la introducción de B<sub>2</sub>, analizamos su composición molecular, mediante una doble FISH, con sondas de ADN<sub>r</sub> y ADN<sub>sat</sub>, que componen mayoritariamente los Bs de *E. plorans*.

Los resultados indican que el cromosomas B que se encuentra actualmente en la población de El Gallego tiene una proporción de ADN<sub>r</sub> y ADN<sub>sat</sub> diferentes tanto al B<sub>1</sub>, existente en las poblaciones cercanas a El Gallego, como al B<sub>2</sub> introducido, teniendo mayor proporción de ADN<sub>r</sub> y menor de ADN<sub>sat</sub> que el B originalmente introducido (tabla 5.5, figura 5.2).

Tabla 5.5. Valores de las proporciones relativas de ADN ribosómico y de ADN satélite de los cromosomas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B de El Gallego con respecto al tamaño total de los mismos.

Tipo de B	Proporción ADN <sub>r</sub> /Total	Proporción ADN <sub>sat</sub> /Total
B <sub>1</sub>	0.6	0.4
"	0.61	0.39
Media	<b>0.60</b>	<b>0.40</b>
B <sub>2</sub>	0.29	0.71
"	0.32	0.68
"	0.3	0.7
"	0.33	0.67
"	0.3	0.7
"	0.3	0.7
Media	<b>0.31</b>	<b>0.69</b>
B de El Gallego	0.44	0.56
"	0.45	0.55
"	0.5	0.5
"	0.52	0.48
"	0.55	0.46
"	0.5	0.5
"	0.44	0.56
"	0.47	0.53
Media	<b>0.48</b>	<b>0.52</b>

También realizamos un análisis del tamaño relativo del B con respecto al cromosoma X en células en diplotene, donde ambos cromosomas se encuentran en un estado heteroploídico similar. Como muestra la tabla 5.6, el cromosoma B presente actualmente en El Gallego es bastante más grande (58% del tamaño del X)

que el cromosoma B<sub>2</sub> de Salobreña (36%), y también un poco mayor que el cromosoma B<sub>1</sub> típico de las poblaciones cercanas a El Gallego (51%).

Tabla 5.6. Valores de la proporción de tamaño de los cromosomas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B de El Gallego con respecto al X.

Tipo de B	Proporción de tamaño B/X	Valor Medio
B <sub>1</sub>	0.49	
"	0.53	<b>0.51</b>
B <sub>2</sub>	0.40	
"	0.34	
"	0.35	<b>0.36</b>
B de El Gallego	0.64	
"	0.55	
"	0.60	
"	0.54	
"	0.58	
"	0.55	
"	0.58	
"	0.64	
"	0.53	
"	0.70	
"	0.52	<b>0.58</b>

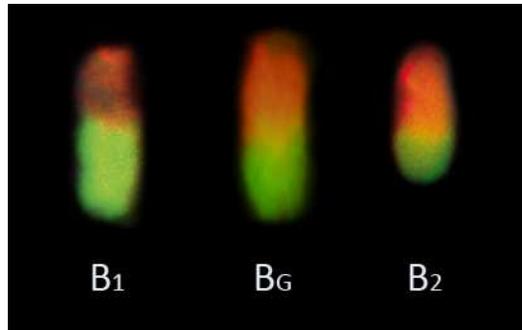


Figura 5.2. En esta imagen podemos observar el cromosoma B<sub>1</sub>, típico de las poblaciones de *E. plorans* cercanas a El Gallego y el B<sub>2</sub>, cromosoma que se introdujo en esta población procedente de Salobreña. Podemos observar que el cromosoma B que se encuentra actualmente en El Gallego muestra una mayor cantidad de ADN<sub>r</sub> (marcada en verde) y una menor cantidad de ADN<sub>sat</sub> (marcada en rojo) con respecto al B<sub>2</sub>, constituyendo una forma intermedia entre la variante B<sub>1</sub> presente en poblaciones cercanas a El Gallego y la variante B<sub>2</sub> inicialmente introducida.

### 5.2.3.2. Citogenética de los cromosomas del complemento estándar en El Gallego

Algunos marcadores citogenéticos de los cromosomas A sugieren que los machos liberados en El Gallego se aparearon con las hembras y transmitieron algunos bloques heterocromáticos típicos de Salobreña que están ausentes en El Gallego y otras poblaciones vecinas. Por ejemplo, el cromosoma S<sub>9</sub> tiene ADNsat de forma regular en los individuos de Salobreña, pero está ausente en las poblaciones cercanas a El Gallego (Cabrero *et al.*, 2003c), y también lo estaba en los machos mostrados en esta población en 1993, un año antes de la introducción. Sin embargo, dos individuos de la muestra de El Gallego de 1996 llevaban ADNsat (Figura 5.3), lo que sugiere que este marcador podría provenir de los machos de Salobreña.

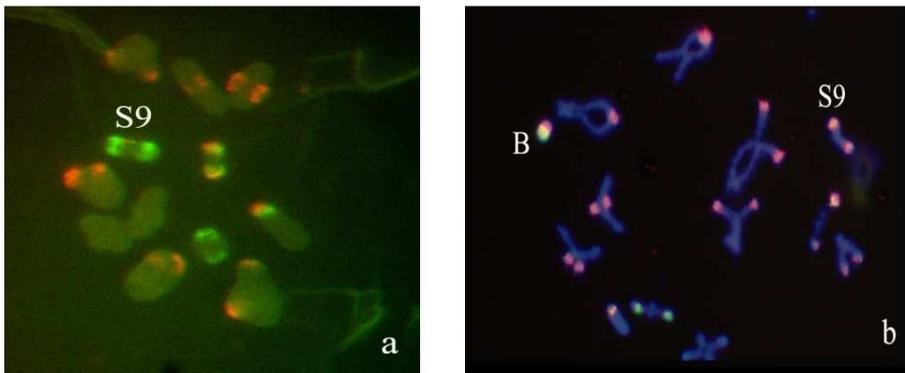


Figura 5.3. Meiocitos en metafase I procedentes de folículos testiculares de *Eyreprocnemis plorans*. a) En un macho capturado en 1993 se observa que el cromosoma S<sub>9</sub> carece de ADNsat (en rojo). b) En un macho capturado en 1996 (tras la introducción de individuos de Salobreña), se observa la presencia de ADNsat en el S<sub>9</sub>.

Además, en una de las puestas estudiadas mediante bandeo C (figura 5.4), encontramos un cromosoma B con una inversión paracéntrica que afectaba a su mitad distal, sugiriendo que el cromosoma B en El Gallego podría estar sufriendo cambios morfológicos.



Figura 5.4. Metafase mitótica procedente de un embrión de *Eyprepocnemis plorans*. En ella podemos apreciar la presencia de un cromosoma B resultado de una inversión paracentromérica (marcado con una flecha).

### 5.2.3.3. Análisis de marcadores ISSR de Salobreña y Albacete

Otro tipo de evidencia de que los machos liberados se cruzaron con las hembras de El Gallego, sería encontrar en esta población individuos que presentaran marcadores moleculares característicos de Salobreña. Para ello, hemos realizado un análisis de los marcadores ISSR presentes en cuatro poblaciones muestreadas en Albacete (El Gallego, Claras, Socovos y Mundo), en la población de Calasparra (Murcia) y en Salobreña (Granada).

Las poblaciones de Claras y Socovos carecen de cromosomas B de forma natural, mientras que, por el contrario, parte de los individuos de Mundo y Calasparra presentan el cromosoma B<sub>1</sub>. Los individuos capturados en Claras (7 machos) y en Socovos (10 machos y 5 hembras) son, por tanto 0B, pero los capturados en Mundo y Calasparra fueron cariotipados para detectar la presencia de B<sub>1</sub> (en la tabla 5.7 podemos observar los resultados obtenidos). Además, se muestran el número de individuos 0B y con B<sub>2</sub> analizados en Salobreña justo antes de la liberación de los machos procedentes de esta población en El Gallego.

Tabla 5.7. Caracterización cariotípica, para la presencia de cromosoma B, de los individuos capturados en las poblaciones de Mundo, Calasparra y Salobreña.

	0B	1B <sub>1</sub>	1iso B <sub>1</sub>	1B <sub>2</sub>	2B <sub>2</sub>	3B <sub>2</sub>	4B <sub>2</sub>	Total
<b>Calasparra</b>	42	1	1	0	0	0	0	44
<b>Mundo</b>	10	6	0	0	0	0	0	16
<b>Salobreña</b>	59	0	0	54	15	9	1	138

Una vez obtenidos los marcadores ISSR (ver los anexos 4.1-4.6, donde aparece la frecuencia de cada uno de los marcadores en estas poblaciones), el procedimiento que hemos seguido aquí es el mismo que el que utilizamos en el

apartado 4.2.1.3. “Análisis de la estructura genética de las poblaciones” del capítulo 4.

En primer lugar, determinamos el valor de K al que mejor se ajustan nuestros datos. Los anexos 5.1-5.3 muestran los valores de  $L(K)$ ,  $L'(K)$  y  $L''(K)$ , y el anexo 5.4 recoge la estima de  $\Delta K$ . El valor de K que más se ajusta a nuestros datos es 3, como puede observarse a continuación en la figura 5.5.

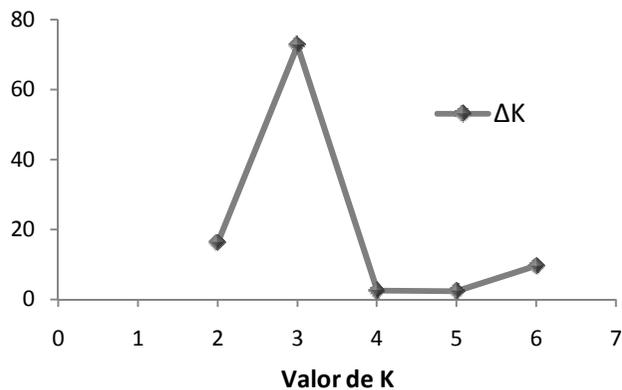


Figura 5.5. Representación de los valores de  $\Delta K$ .

En la figura 5.6 observamos la representación gráfica de la asignación de cada individuo a los tres grupos establecidos con Structure. El primer grupo está constituido por la población de Salobreña (en azul) y los dos restantes (en verde y rojo) por las poblaciones muestreadas en Albacete. Como podemos observar, la población de El Gallego presenta dos individuos que muestran ascendencia de Salobreña (véanse también los anexo 5.5-5.6).

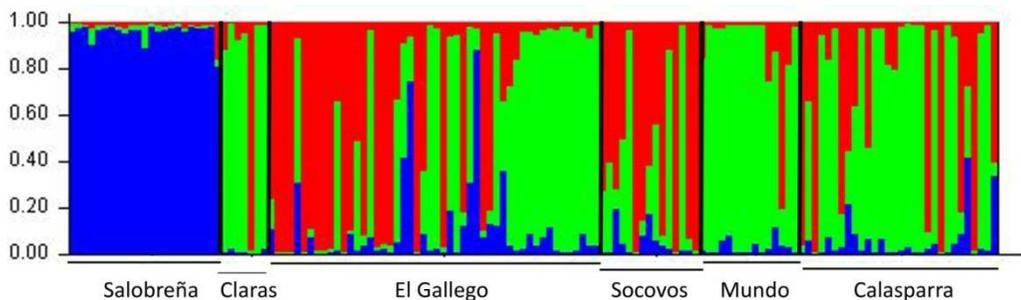


Figura 5.7. Representación de la ascendencia de cada individuo a uno de los tres grupos.

La tabla 5.8 resume los valores de la proporción de miembros de cada una de las seis poblaciones muestreadas a cada uno de los tres grupos establecidos con Structure, y los anexos 5.5 y 5.6 muestran la ascendencia de los individuos pertenecientes a estas seis poblaciones con respecto a cada uno de los tres grupos. Podemos observar que la población del interior con mayor ascendencia de Salobreña es El Gallego.

Tabla 5.8. Proporción de miembros de cada población predefinida en cada uno de los tres grupos ( $K=3$ ).

Población	Nº Individuos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Salobreña	23	<b>0.958</b>	0.024	0.019
Claras	7	0.013	0.804	0.182
El Gallego	50	<b>0.100</b>	0.457	0.443
Socovos	15	0.048	0.319	0.633
Mundo	15	0.032	0.856	0.111
Calasparra	30	0.063	0.600	0.337

### 5.3. DISCUSIÓN

El sistema de cromosomas B del saltamontes *Eyreprocnemis plorans* constituye un buen ejemplo de la coevolución entre los cromosomas A y B. Nuestros estudios anteriores han demostrado que los cromosomas B se comportan como parásitos genómicos cuando invaden una población, incrementando rápidamente su frecuencia. Pero estos cromosomas B son neutralizados posteriormente por la evolución de genes de resistencia en el genoma hospedador que llevan a la supresión de la acumulación de los Bs (López-León *et al.*, 1992a; Herrera *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 1997; Zurita *et al.*, 1998; Perfectti *et al.*, 2004a).

Según este modelo, cabría esperar que la frecuencia de Bs hubiera aumentado rápidamente en El Gallego tras la introducción de los Bs procedentes de la población de Salobreña, dado que no era de esperar que en el genoma de los individuos de El Gallego existieran genes de resistencia a la acumulación del B, ya que no había Bs en esta población antes de nuestro experimento (Cabrero *et al.*, 1997), y, si los hubiera habido, su frecuencia sería inferior al 1.2%.

Gosálvez y López-Fernández (1984) realizaron, en la especie *Arcyptera fusca*, un experimento similar al que nosotros hemos llevado a cabo en *E. plorans*. Seleccionaron una población carente de cromosomas B localizada en el Puerto de la Bonaigua (Valle de Arán, Lérida), y liberaron cincuenta machos jóvenes procedentes de otra población localizada en el Valle del Respumoso (situada a unos 130 km de

distancia), donde aproximadamente el 50% de sus individuos presentaban cromosomas B en una frecuencia que parecía no variar de generación en generación (López-Fernández y Gosálvez, 1981, 1983a; López-Fernández *et al.*, 1983b). Estos autores observaron que los machos con B liberados se cruzaron eficazmente con hembras procedentes de la población carente de Bs, puesto que una generación más tarde se capturaron individuos portadores de cromosomas B.

En nuestro caso también hemos podido confirmar que los machos introducidos se cruzaron eficazmente con las hembras autóctonas, puesto que en las generaciones posteriores a la introducción detectamos la presencia de cromosomas B en El Gallego. Además, hay dos evidencias que confirman que esos cromosomas B proceden de la introducción de los individuos de Salobreña: i) se ha observado la presencia de ADN repetitivo en tándem de 180 pb en el cromosoma S<sub>9</sub> de dos machos procedentes de El Gallego, capturados en 1996. Este marcador está ausente en el autosome S<sub>9</sub> de las poblaciones de Albacete, Murcia y el Cáucaso pero, sin embargo, presente en las poblaciones costeras andaluzas como, por ejemplo, Salobreña (Cabrerero *et al.*, 2003), y ii) el análisis de marcadores ISSR, mediante el software Structure v2.3.1 (Falush *et al.*, 2007), que indica la existencia de dos individuos en la población de El Gallego que presentan ascendencia de Salobreña.

La frecuencia del cromosoma B en la población de El Gallego se incrementó tras su introducción, como era de esperar, pero posteriormente ha ido disminuyendo, alcanzando niveles similares a los iniciales. En el experimento de Gosálvez *et al.*, los cromosomas B introducidos fueron finalmente eliminados en generaciones posteriores. Puesto que los cromosomas B son parásitos de transmisión vertical, que dependen totalmente de los genes del genoma estándar para su transmisión, la llegada del cromosoma B<sub>2</sub> a la población de El Gallego ha ido acompañada de la introducción de genes del genoma estándar, tal como indican los resultados con Structure, posiblemente incluyendo los genes que suprimieron la acumulación del B en la población donante y que pueden haber impedido el incremento en frecuencia de los Bs en la población receptora. Pero esto sería de esperar en cualquier invasión y, sin embargo, otras han prosperado, como las descritas anteriormente en Torrox, donde se produjo la invasión por B<sub>24</sub> (Zurita *et al.*, 1998), o en Pollensa (Mallorca) donde B<sub>1</sub> incrementó en frecuencia muy rápidamente (Riera *et al.*, 2004). Hay que señalar, no obstante, que el comportamiento de los Bs durante su transmisión y, por tanto, su destino en las poblaciones, también depende del tipo de B, del genotipo hospedador e incluso de efectos maternos (Puertas *et al.*, 1990). Uno o varios de estos factores pudieron también contribuir al fallo en la invasión del B<sub>2</sub> en El Gallego.

Además, uno de los efectos conocidos de los cromosomas B sobre los individuos portadores es la reducción de la fertilidad sobre las hembras (Camacho,

1997; Muñoz *et al.*, 1998) y una mayor frecuencia de macro- y microespermátidas en los machos (Teruel *et al.*, 2009), lo que puede haber provocado, a su vez, el descenso en la frecuencia de cromosomas B observado en El Gallego. De hecho, en el análisis de fertilidad realizado a las hembras de El Gallego hemos constatado que la presencia del cromosoma B reduce significativamente el número de huevos por puesta en las hembras con 1B con respecto a las 0B, y esto redundaría en una menor producción de embriones por parte de las primeras, lo que puede estar dificultando la permanencia del B en esta población. No es descartable, por tanto, que los cromosomas B sean más perjudiciales en El Gallego que en Salobreña, donde no se observaban estos efectos (Camacho *et al.*, 1997). La situación geográfica de El Gallego podría favorecer el hecho de que en esta población los cromosomas B sean peor tolerados. Mientras que Salobreña está al nivel del mar, la población de El Gallego está situada a 600 m de altitud, con las consiguientes diferencias ambientales. Entre ellas, es posible que disponer de una ventana ambiental más corta para completar el ciclo biológico (dado que el invierno comienza antes y es más riguroso en El Gallego) sea un factor importante, ya que se ha demostrado que los cromosomas B enlentecen el desarrollo en especies como, por ejemplo, el cóccido *Pseudococcus obscurus* (Nur, 1966) y el saltamontes *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt and East, 1978; Harvey and Hewitt, 1979), lo que implicaría que los individuos con B necesitarían estaciones más largas y en El Gallego disponen de menor tiempo para completar su ciclo. De hecho, Cabrero *et al.* (1997) observaron una correlación negativa entre la frecuencia del cromosomas B y la altitud en diferentes poblaciones muestreadas a lo largo de un transecto de 200 km a orillas del río Segura y sus tres afluentes principales, Mundo, Benamor y Taibilla, en las provincias de Albacete y Murcia.

Otro factor que puede suponer una menor tolerancia a los cromosomas B es la acción del hombre a través de las fumigaciones, puesto que las zonas muestreadas del Segura sufren, a diferencia de las poblaciones de la costa (donde hay más abundancia de cromosomas B), fumigaciones aéreas no selectivas donde los individuos no pueden migrar a áreas colindantes a las fumigadas. A su vez, pueden darse procesos selectivos tales como el descenso en el apareamiento de los machos portadores de Bs (Martín *et al.*, 1996) o cambios epigenéticos en los cromosomas B que provoquen su neutralización inducidos por genes supresores de la acumulación. En este último caso, cabe la posibilidad de que estos cambios epigenéticos, que implicarían la neutralización de los cromosomas B, fueran irreversibles y, puesto que el cromosoma B<sub>2</sub> introducido ya estaba neutralizado en la población donante (Salobreña), no pueda volver a acumularse aunque haya cambiado su ambiente genético al ser introducido en El Gallego. Incluso, es posible que hubiéramos observado una dinámica diferente de B<sub>2</sub>, tras su introducción en El Gallego, si la introducción del B se hubiera realizado con hembras, dado que los programas epigenéticos de los genomas paternos y maternos son distintos durante el desarrollo

temprano del embrión (Haaf, 2001; Ferraro *et al.*, 2001). Por otra parte, las hembras de Salobreña con B<sub>2</sub> acumulan el B cuando se cruzan con machos de una población sin B (Herrera *et al.*, 1996), un hecho que se hubiera producido necesariamente de introducir hembras en lugar de machos.

Los datos obtenidos a partir de los cruzamientos realizados en el laboratorio y del seguimiento periódico de la frecuencia de los Bs en esta población revelan una tendencia significativa a la eliminación de estos cromosomas durante la transmisión por las hembras, lo que explicaría su dificultad para incrementar en frecuencia en la población.

Por otra parte, parece existir un paralelismo entre la cantidad de ADN satélite de los Bs y su capacidad de acumulación, ya que, en *E. plorans*, aquellos cromosomas B que presentan mayor cantidad de ADNsat muestran mayor capacidad de acumulación (Cabrero *et al.*, 1999). En El Gallego, hemos visto que el cromosoma B actual presenta una menor cantidad de ADNsat que el cromosoma B<sub>2</sub> originalmente introducido, lo que podría estar relacionado con su baja tasa de transmisión. De hecho, la heterocromatina y el ADN satélite están implicados en el comportamiento cromosómico relacionado con la cohesión de las cromátidas hermanas y la segregación cromosómica (Lica *et al.*, 1986; Vig, 1987; Karpen *et al.*, 1996) además de portar genes vitales (Dimitri *et al.*, 2009).

La causa del cambio morfológico que ha sufrido el cromosoma B en El Gallego podría estar relacionada con los elementos transponibles que los Bs de *E. plorans* contienen (Montiel *et al.*, en preparación). La naturaleza heterocromática de estos cromosomas hace que se conviertan en verdaderos paraísos para los elementos móviles por dos razones principalmente: i) estos elementos transponibles son bien tolerados en aquellas regiones con baja densidad de genes, como la heterocromatina, puesto que su inserción en los genes suele resultar deletérea y, ii) heterocromatina, de forma directa, tiende a ser diana de los elementos móviles, encontrándose, entre otras, evidencias de este hecho en la heterocromatina de *Drosophila melanogaster* (Dimitri *et al.*, 1997).

Sin embargo, hay evidencias de una escasa presencia de elementos transponibles en los cromosomas B de *E. plorans* (Montiel *et al.*, en preparación), por lo que una explicación alternativa sería la recombinación entre copias de otras secuencias repetidas que presentan los cromosomas B, tales como ADN satélite o ribosómico, que pueden generar deleciones, inversiones, translocaciones, etc. La formación de quiasmas en los Bs han sido observadas en algunas especies de animales y plantas (Bidau, 1987; Jones & Rees, 1967; Birchler *et al.*, 1990), habiendo descrito recientemente Basheva *et al.* (2010) la primera evidencia molecular de recombinación de Bs en mamíferos. Un posible origen para el B observado en El Gallego, con características intermedias entre el B<sub>2</sub> introducido y el B<sub>1</sub> típico de las

poblaciones de la cuenca del Segura, sería por recombinación entre estas dos variantes de B en algún individuo, lo que generaría un nuevo B con más ADN satélite que el B<sub>1</sub> y más ADNr que el B<sub>2</sub>. Sin embargo, esta posibilidad parece improbable debido a la baja frecuencia que hemos observado para el B de Gallego (0.029) y el B<sub>1</sub> (menor de 0.012), lo que supone una probabilidad de encontrar un individuo portador de ambos tipos de Bs de tan solo 0.00035. Todas estas posibles modificaciones estructurales del B en El Gallego pueden haberse inducido por la interacción entre el cromosoma B introducido y el genoma de la población receptora, produciéndose cambios cromosómicos, como la aparición de un cromosoma B invertido en las células de un embrión procedente de las hembras portadoras de cromosomas B. Así, Cuadrado *et al.* observaron en 2004, que la puesta en contacto de genomas de distinta procedencia puede crear inestabilidad genómica y por tanto, cambios cromosómicos.

Es notable que tras su introducción en El Gallego, el B<sub>2</sub> procedente de Salobreña ha sufrido cambios en las proporciones relativas de ADNsat y ADNr que le hacen más parecido a los Bs de las poblaciones cercanas a El Gallego (B<sub>1</sub>). Es posible que la morfología de los Bs esté condicionada por el sustrato genético proporcionado por los cromosomas A a los que parasita. Por el momento sólo tenemos indicios de esta posibilidad, pero esto constituye un aspecto interesante para futuras investigaciones.



## **6. Dinámica espacial y temporal de la sustitución entre variantes de cromosomas B**

---





## Causes of B chromosome variant substitution in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*

M. I. Manrique-Poyato<sup>1</sup>, A. J. Muñoz-Pajares<sup>1</sup>, V. Loreto<sup>1,2</sup>, M. D. López-León<sup>1</sup>,  
J. Cabrero<sup>1</sup> & J. P. M. Camacho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain;  
Tel: +34-958248925; Fax: +34-958244073; E-mail: [jpmcamac@ugr.es](mailto:jpmcamac@ugr.es); <sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Brazil

\*Correspondence

Received 6 June 2006. Received in revised form and accepted for publication by Adrian Sumner 30 June 2006

**Key words:** B-chromosome, drive, *E. plorans*, fitness, neutralized, parasitic, substitution

### Abstract

We have analysed B chromosome frequency for three consecutive years, B transmission rate at population and individual levels, clutch size, egg fertility and embryo–adult viability in a natural population of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* containing two different B chromosome variants, i.e. B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub>, the second being derived from the first and having replaced it in nearby populations. From 2002 to 2003 the relative frequency of both variants changed, although the differences did not reach significance. A mother–offspring analysis showed no significant effect of any of the two B variants on clutch size, egg fertility or embryo–adult viability, but B<sub>24</sub> was more efficiently transmitted than B<sub>2</sub> through males from the 2002 season, which explains the observed frequency change. Controlled crosses, at individual level, showed significant drive through some females for B<sub>24</sub> but not for B<sub>2</sub>, suggesting that this difference in transmission rate might also be important for the substitution process. The analysis of relative fitness for B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> carriers for all fitness components, as a whole, showed a significantly better performance of B<sub>24</sub>-carrying individuals, suggesting that the cumulative effect of these slight differences might contribute to the replacement of B<sub>2</sub> by B<sub>24</sub>.

### Introduction

Parasitism is one of the most widespread lifestyles at all levels, from genes to species. Among them, B chromosomes, also known as accessory or supernumerary, are extra chromosomes which, in most cases, behave as parasitic elements within eukaryote genomes (Östergren 1945; for recent reviews see Camacho 2004, 2005). B chromosome systems may

be at about stable frequencies in natural populations due to equilibrium between two main forces, *viz.* the increase in frequency derived from accumulation (drive) mechanisms and the decrease caused by their harmful effects on B carriers. But, as indicated by our studies in the B chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, such an equilibrium may be broken by B chromosome neutralization through selection for A chromosome gene

---

### Electronic Supplementary Material

Supplementary material is available for this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s10577-006-1081-2>.

variants suppressing B drive. This converts the system into a dynamic one in which B chromosomes pass through successive stages of parasitism and near-neutrality (Camacho *et al.* 1997). This non-equilibrium model includes the possibility that a neutralized B, which is condemned to extinction through stochastic loss plus selective loss of individuals with high number of Bs, mutates into a new B variant possessing drive which restores the parasitic status. Such a substitution of one B variant for another has been documented in the Torrox population (Zurita *et al.* 1998), but the timing of such a replacement is one of the most interesting open questions of B chromosome evolution. Recent research has shown that B drive suppression may take place in only a few generations, since B<sub>24</sub> in Torrox did show drive in 1992 (Zurita *et al.* 1998) but not in 1998 (Perfectti *et al.* 2004), suggesting that drive suppression might be caused by a single A gene of major effect (Perfectti *et al.* 2004). In Torrox the B<sub>2</sub> variant had been replaced by the B<sub>24</sub> variant in 1992, the first time we sampled this population (Zurita *et al.* 1998), but a sample from 1984 indicated the presence of both B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> in this population (Henriques-Gil & Arana 1990), with B<sub>2</sub> showing a very low frequency. The absence of B<sub>2</sub> in 1992 suggested that B variant replacement had already been completed, and the significant drive through females showed by B<sub>24</sub> in controlled crosses (Zurita *et al.* 1998) suggested that the replacement occurred because of the more efficient transmission rate for B<sub>24</sub>, since B<sub>2</sub> did not show drive in several Spanish populations close to Torrox (López-León *et al.* 1992). The fact that B<sub>24</sub> was harmful for egg fertility in Torrox, whereas B<sub>2</sub> was not in the other populations analysed, could add some uncertainty to the former conclusion, since it could imply a lower selective load for B<sub>2</sub> carriers in Torrox, but we could not analyse the effect of both B variants on this fitness component in the same population. In an attempt to uncover possible causes for B variant replacement, we analyse here B frequency evolution through three consecutive years, as well as several fitness components and B chromosome transmission rate, in a natural population of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* showing the presence of the two B chromosome variants (B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub>) at about similar frequency, indicating that it is at an intermediate status of the substitution process.

## Materials and methods

In 2002, 2003 and 2004 we collected adult males and females of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in Algarrobo (Málaga, Spain), a population located at only 14 km from Torrox. In 2002 we also collected gravid females which were carried to the laboratory to get one egg-pod from each female, which was incubated for 10 days to obtain embryo offspring. All individuals were fixed for cytological analysis as indicated in Camacho *et al.* (1997). All individuals were analysed by the C-banding technique (described in Camacho *et al.* 1991) to differentiate B chromosome variants. A mother-offspring analysis was performed to the 2002–2003 data, following the method described in Camacho *et al.* (1997), based on Christiansen & Frydenberg (1973). This allowed us to infer the average B transmission rate through both sexes and the differential effect of both B chromosome variants on three fitness components, *viz.* clutch size, egg fertility and embryo–adult viability. This procedure includes the following calculations: (1) the mean B frequency among the progeny of OB females indicates the net B transmission rate through males since all Bs in these females' progeny are of paternal origin. (2) the mean B frequency in the offspring of B-carrying females minus that in the offspring of OB females (*i.e.* that from paternal origin) allows calculation of the mean transmission rate through B-carrying females. A comparison between the frequency of karyotypes (OB, B<sub>2</sub>-carrying, B<sub>24</sub>-carrying and B<sub>2</sub>B<sub>24</sub>-carrying individuals) observed in the 2003 embryo sample and those expected from the 2002 adult sample (assuming random mating, Mendelian transmission and independent meiotic behaviour of both B variants) provided a means of testing significance of transmission efficiency of both B variants. (3) The number of eggs per pod is a measure of clutch size. (4) Egg fertility was calculated as the embryo/egg ratio for each egg-pod and female analysed. (5) Embryo–adult viability was inferred from an intra-generation comparison between B frequency in the 2003 embryo sample (yielded by the 2002 gravid females) and the 2003 adult field sample.

B frequency was measured by two parameters: the mean number of B chromosomes per individual (mean) and the proportion of individuals carrying

Table 1. Frequency of B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> chromosomes in adult specimens of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the Algarrobo population for three consecutive years. Prevalence = proportion of B carriers

Year	Sex	Adults with							Prevalence for			Mean for			
		0B	1B <sub>2</sub>	1B <sub>24</sub>	2B <sub>2</sub>	2B <sub>24</sub>	1B <sub>2</sub> + 1B <sub>24</sub>	1B <sub>2</sub> + 2B <sub>24</sub>	Total	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	Total	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	Total
2002	Male	40	12	5	0	1	9	0	67	0.31	0.22	0.4	0.31	0.24	0.55
	Female	24	6	8	1	0	1	1	41	0.22	0.24	0.41	0.24	0.27	0.51
	Total	64	18	13	1	1	10	1	108	0.28	0.23	0.41	0.29	0.25	0.54
2003	Male	28	5	5	0	2	3	0	43	0.19	0.23	0.35	0.19	0.28	0.47
	Female	16	4	11	0	0	3	0	34	0.21	0.41	0.53	0.21	0.41	0.62
	Total	44	9	16	0	2	6	0	77	0.19	0.31	0.43	0.20	0.34	0.53
2004	Male	25	8	9	0	2	1	0	45	0.2	0.27	0.44	0.2	0.31	0.51
	Female	16	3	6	0	2	2	0	29	0.17	0.34	0.45	0.17	0.41	0.59
	Total	41	11	15	0	4	3	0	74	0.19	0.30	0.45	0.19	0.35	0.54

Bs (prevalence). Given the low frequency of individuals with more than 1B, both parameters were very similar in most samples, for which reason we used prevalence for contingency tests in order to improve statistical power.

In 2004 we also sampled some female nymphs which were bred isolated from males to preserve virginity. Once adult, they were crossed to 0B males which had previously been vivisected to extract several testis follicles which were immediately analysed cytologically to detect B chromosome presence. Transmission rate ( $k_B$ ) of both B chromosome variants through females was deduced from these crosses. In one case, B transmission through a B-carrying male was also analysed.

Contingency tables for B frequency comparisons among years (to analyse temporal evolution) and

different life-cycle stages (to analyse reproductive and viability fitness components) were analysed by the *RXC* program, which employs the Metropolis algorithm to obtain an unbiased estimate of the exact *p*-value (Rousset & Raymond 1995). In all cases 20 batches of 2500 replicates were performed. Population B transmission efficiency was tested by the goodness-of-fit chi-square test. B effects on clutch size and egg fertility were analysed by two-way ANOVA, and transmission rate in controlled crosses was analysed by the *Z*-test described in López-León *et al.* (1992). *Z* was calculated as the quotient between (observed transmission rate minus 0.5) and the square root of the quotient between 0.25 and the number of embryo progeny analysed. *Z* values higher than 1.96 indicate significant drive if positive or drag if negative.

Table 2. Mother-offspring analysis to 40 gravid females lacking B chromosomes and 1233 embryo offspring obtained from them. Fert. = egg fertility = embryos/eggs

Female	Type	Number	Eggs	Embryos	Fert.	Embryo progeny						
						With					Mean number of	
						0B	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub> + B <sub>24</sub>	Total	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>
	0B	23	47.22	43.57	0.92	530	59	73	17	679	0.12	0.14
	1B <sub>2</sub>	7	37.00	33.43	0.91	92	95	8	10	205	0.56	0.08
	1B <sub>24</sub>	7	42.71	41.29	0.96	98	20	119	23	260	0.20	0.60
	2B <sub>2</sub>	1	42	42	1	5	10	9	6	30	0.83	0.70
	2B <sub>24</sub>	1	37	34	0.92	8	0	23	2	33	0.06	0.88
	1B <sub>2</sub> + 2B <sub>24</sub>	1		28		2	0	12	12	26	0.46	1.50

Table 3. Expected frequencies of progeny from the 2002 adult males and females, assuming random mating, absence of selection, Mendelian transmission rate and random meiotic behaviour of both B variants

Mothers	Freq.	Expected offspring			
		0B	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub> B <sub>24</sub>
0B	0.585	0.446	0.072	0.048	0.020
B-carrying	0.415	0.142	0.109	0.113	0.051
1B <sub>2</sub>	0.146	0.056	0.071	0.009	0.011
1B <sub>24</sub>	0.195	0.074	0.012	0.090	0.019
All	1.000	0.587	0.181	0.161	0.071

**Results**

*B chromosome frequency*

The total prevalence of B chromosomes, including the two observed variants, B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub>, was rather stable in the three years analysed, with about 40% of individuals carrying B chromosomes (Table 1). Although the relative frequency of the two B variants changed from 2002 to 2003, with B<sub>2</sub> decreasing in prevalence from 0.28 to 0.19 and B<sub>24</sub> increasing from 0.23 to 0.31, these changes, however, did not reach

statistical significance (contingency tests:  $P = 0.229 \pm 0.007$  for B<sub>2</sub> prevalence and  $P = 0.242 \pm 0.008$  for B<sub>24</sub> prevalence). B frequency was almost the same in 2003 and 2004.

*Transmission rate (k<sub>B</sub>) of B chromosomes at population level*

Table 2 shows a summary of the mother-offspring analysis performed with 23 gravid females lacking B chromosomes and 17 carrying them, collected in 2002 (for further details see Supplementary material). The average frequency of B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> chromosomes found in the offspring of the 0B females was 0.12 and 0.14, respectively (Table 2). This corresponds to the effective B transmission rate through males at population level. The mean frequency of B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> in adult males of the 2002 season was 0.31 and 0.24, respectively (see Table 1), which implies average transmission rates ( $k_B$ ) through males equal to  $0.12/0.31 = 0.39$  for B<sub>2</sub> and  $0.14/0.24 = 0.58$  for B<sub>24</sub>. This suggests a better performance of B<sub>24</sub>-carrying males than B<sub>2</sub>-carrying ones.

The average frequency of B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> found in the embryo progeny yielded by 1B<sub>2</sub> and 1B<sub>24</sub> females was 0.56 and 0.60, respectively. Subtracting, in each

Table 4. Goodness-of-fit chi-square test comparing the observed frequencies in embryos from 2003 (shown in Tables 2 and 3) to the expected from the adults observed in 2002 (shown in Table 4)

Mothers	Item	0B	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub> B <sub>24</sub>	Total
0B	Observed (o)	530	59	73	17	679
	Expected (e)	516.85	83.61	55.74	22.80	
	$((o - e)^2)/e$	0.33	7.24	5.35	1.48	14.40
	p					0.0024
+B	Observed (o)	205	125	171	53	554
	Expected (e)	189.15	145.19	151.51	68.16	
	$((o - e)^2)/e$	1.33	2.81	2.51	3.37	10.01
	p					0.0185
1B <sub>2</sub>	Observed (o)	92	95	8	10	205
	Expected (e)	78.02	99.82	11.86	15.30	
	$((o - e)^2)/e$	2.504	0.233	1.254	1.835	5.826
	p					0.1204
1B <sub>24</sub>	Observed (o)	98	20	119	23	260
	Expected (e)	98.96	16.01	120.30	24.74	
	$((o - e)^2)/e$	0.009	0.996	0.014	0.122	1.141
	p					0.7672
All	Observed (o)	735	184	244	70	1233
	Expected (e)	723.94	222.86	199.07	87.13	
	$((o - e)^2)/e$	0.17	6.77	10.14	3.37	20.46
	p					0.0001

Table 5. Analysis of B chromosome effects on viability from 10-day-old embryo to adult. Contingency tests were performed by the *RXC* program

	Presence of					Prevalence			B <sub>2</sub>			B <sub>24</sub>		
	0B	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub> + B <sub>24</sub>	Total	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	Total	-	+	Total	-	+	Total
Embryos 2003	741	184	244	70	1239	0.205	0.253	0.402	985	254	1239	925	314	1239
Adults 2003	44	9	18	6	77	0.195	0.312	0.429	62	15	77	53	24	77
Total	785	193	262	76	1316				1047	269	1316	978	338	1316
<i>p</i>					0.617						1.000			0.287
SE					0.014						0.000			0.008

case, the B frequency transmitted through males (0.12 and 0.14, respectively) we obtained the average transmission rate for each B variant through 1B females. This was 0.55 - 0.12 = 0.43 for B<sub>2</sub> and 0.60 - 0.14 = 0.46 for B<sub>24</sub>, i.e. close to the Mendelian rate (0.5).

To test for significance of these differences we calculated the expected frequencies of progeny belonging to four categories, i.e. 0B, B<sub>2</sub>, B<sub>24</sub> and B<sub>2</sub>B<sub>24</sub>, from the corresponding frequencies of adults observed in 2002 (with females being the mothers of the embryos analysed) assuming random mating, Mendelian transmission and random meiotic behaviour of B chromosomes (see summary in Table 3). Goodness-of-fit chi-square tests showed parallel significant excess of B<sub>24</sub>-carrying and deficiency of B<sub>2</sub>-carrying embryos in the total sample, the 0B-

mothers sample and the +B-mothers sample (Table 4). Since all B chromosomes in the embryo progeny of 0B mothers were necessarily inherited from the father, these results suggest some kind of advantage of B<sub>24</sub> over B<sub>2</sub> during male transmission.

*Clutch size, egg fertility and embryo–adult viability*

Table 2 shows that the average number of eggs per pod (clutch size) was 47.22 (*SE* = 2.44) in the 23 females lacking B chromosomes, 37.00 (*SE* = 0.79) in the seven females with 1B<sub>2</sub> and 42.71 (*SE* = 4.66) in the seven females carrying 1B<sub>24</sub>. A two-way ANOVA showed that the difference with respect to 0B females was close to significance for B<sub>2</sub> (*p* = 0.051) but not for B<sub>24</sub> (*p* = 0.34). No significant effect was either observed for egg fertility, which

Table 6. Controlled crosses performed with specimens collected in 2004. Average transmission rate for B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> through females (last row) was weighed because of the high differences in the number of embryo offspring analysed among crosses. The Z test was performed according to López-León *et al.* (1992), and indicates B chromosome drive when positive and drag when negative, indicating significant drive or drag when Z is higher than 1.96 in absolute value. Significant Z-tests are indicated in bold letters. Note the presence of two females showing significant drive for B<sub>24</sub>, the same as the weighed mean transmission for B<sub>24</sub>

Cross	Number of Bs in parent		Number of embryo offspring with						Female transmission						Male transmission		
	Female	Male	0B	1B <sub>2</sub>	1B <sub>2</sub> +		2B <sub>24</sub>	Total	B <sub>2</sub>			B <sub>24</sub>			B <sub>24</sub>		
					1B <sub>24</sub>	1B <sub>24</sub> +			Mean	<i>k<sub>B</sub></i>	Z	Mean	<i>k<sub>B</sub></i>	Z	Mean	<i>k<sub>B</sub></i>	Z
1	2B <sub>24</sub>	0	3	0	10	0	2	15	0	-	-	0.93	0.47	-0.26	-	-	-
2	1B <sub>24</sub>	0	1	0	11	0	0	12	0	-	-	0.92	<b>0.92</b>	<b>2.89</b>	-	-	-
3	1B <sub>24</sub>	0	9	0	6	0	0	15	0	-	-	0.40	0.40	-0.77	-	-	-
4	1B <sub>2</sub>	1B <sub>24</sub>	6	3	9	8	0	26	0.42	0.42	-0.78	0	-	-	0.65	0.65	1.53
5	1B <sub>24</sub>	0	5	0	29	0	0	34	0	-	-	0.85	<b>0.85</b>	<b>4.12</b>	-	-	-
6	1B <sub>24</sub>	0	22	0	20	0	0	42	0	-	-	0.48	0.48	-0.31	-	-	-
7	1B <sub>2</sub> + 1B <sub>24</sub>	0	1	4	2	1	0	8	0.63	0.63	0.71	0.38	0.38	-0.71	-	-	-
8	1B <sub>2</sub>	0	2	2	0	0	0	4	0.50	0.50	0.00	0	-	-	-	-	-
Total								156	0.47	0.47	-0.66	0.66	<b>0.60</b>	<b>2.58</b>	-	-	-

Table 7. Summary of relative fitness for B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> carriers, deduced from the mother–offspring analysis. A Wilcoxon matched pairs test showed significant tendency of B<sub>24</sub> carriers to show higher relative fitness than B<sub>2</sub> carriers for these traits ( $Z = 2.02$ ,  $P = 0.04$ )

Issue	Absolute fitness		Relative fitness	
	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>
Male transmission ( $k_B$ )	0.39	0.58	0.67	1
Female transmission ( $k_B$ )	0.43	0.46	0.93	1
Clutch size	37.00	42.71	0.87	1
Egg fertility	0.90	0.96	0.94	1
Embryo–adult viability	0.95	1.23	0.77	1

was 0.92 ( $SE = 0.02$ ) in 0B females, 0.91 ( $SE = 0.04$ ) in B<sub>2</sub> females and 0.96 ( $SE = 0.01$ ) in B<sub>24</sub> females (two-way ANOVA:  $P = 0.58$  for B<sub>2</sub> and  $P = 0.96$  for B<sub>24</sub>). A comparison of B frequency between the embryos obtained in the laboratory from the gravid females collected in 2002 (thus belonging to the 2003 generation) and the adults collected in 2003 showed no B effects on embryo–adult viability (Table 5).

#### Controlled crosses

To investigate B chromosome transmission at individual level we performed several controlled crosses with specimens collected in 2004. From them we obtained useful data from eight crosses (Table 6) leading to the following conclusions: (a) B<sub>2</sub> did not show significant drive or drag through the three females carrying them, and the weighed mean transmission rate (0.47) was only slightly higher than the value estimated at population level (0.43) and not significantly different from the Mendelian rate (0.5). (b) B<sub>24</sub> showed significant drive in two of the six females carrying it, and the weighed mean transmission rate (0.60) was also significantly higher than 0.5 and than the value estimated at population level (0.46). (c) The only male carrying 1B<sub>24</sub> showed a high transmission rate (0.65), but the Z-test did not show significance due to low number of progeny. This figure, however, is not very different from the value estimated at population level (0.58).

#### Discussion

The present results have permitted us to analyse the relative efficiency of two B chromosome variants in

some reproduction and viability fitness components. The relative frequency of B<sub>2</sub> and B<sub>24</sub> slightly changed (not significantly) between 2002 and 2003 but remained stable in 2004. It suggests that B frequency changes at this population are currently slight from generation to generation, as is characteristic of the near-neutral stage of the B chromosome life cycle (Camacho *et al.* 1997). Consistent with the 2002–2003 frequency change, the analysis of transmission at population level showed that B<sub>24</sub> was transmitted more efficiently than B<sub>2</sub> through males from the 2002 season. In addition, controlled crosses showed that B<sub>24</sub> still drives in some females, which also points to a better performance for B<sub>24</sub> than B<sub>2</sub> in female transmission. However, the mean transmission rate ( $k_B$ ) through B<sub>24</sub>-carrying females in controlled crosses (0.6), although still significantly higher than the Mendelian value, indicates that B<sub>24</sub> is in the process of neutralization. The observation that one-third of the crossed females carrying B<sub>24</sub> showed significant drive for it suggests, with the logical reservations of the small number of crosses performed, that this B in the Algarrobo population sampled in 2004 is at an intermediate situation between B<sub>24</sub> in Torrox analysed in 1992 (Zurita *et al.* 1998) and 1998 (Perfectti *et al.* 2004) where 61% and 19% of females, respectively, showed significant drive for this B chromosome. Consistently, the average transmission rate, deduced from controlled crosses, was also intermediate in Algarrobo (0.6) with respect to the values estimated in Torrox in 1992 (0.696) and 1998 (0.523).

A remarkable difference in Algarrobo is the absence of harmful effects of B<sub>24</sub> on egg fertility, the fitness component which had been shown to be the most sensitive to parasitic Bs in this species (Zurita *et al.* 1998, Muñoz *et al.* 1998). Whereas egg

fertility in Torrox decreased with increasing number of  $B_{24}$  chromosomes, even after drive neutralization in 1998 (Perfectti *et al.* 2004), in Algarrobo  $B_{24}$  does not significantly decrease egg fertility. A possible explanation is that the Torrox samples were taken in a cultivated area where insecticide treatment may be stronger than in Algarrobo, an abandoned field besides a road. Muñoz *et al.* (1998) showed that the  $B_2$  chromosome does not influence egg fertility in populations from the Granada province, but greatly decreases it in laboratory experiments performed in conditions of mating scarcity. Likewise, the Algarrobo population might be subjected to a less stressful environment than the Torrox one, although this is not consistent with the fact that B frequency was three times higher in Torrox, and this would not be expected under the parasitic theory predicting that Bs should be more frequent in less stressful environments.

Alternatively,  $B_{24}$  might have begun to be neutralized in Algarrobo even faster than in Torrox, and this would have prevented it from reaching comparable frequencies to those in Torrox.  $B_{24}$  seemed to originate from  $B_2$  in Torrox and, when the A genome responded suppressing the strong  $B_{24}$  drive, it had already reached extremely high frequency (about 1.5 Bs per individual) (Zurita *et al.* 1998). By 1998,  $B_{24}$  had been almost completely neutralized in Torrox. It is conceivable that when the  $B_{24}$  chromosome expanded from Torrox towards nearby populations (e.g. Algarrobo), the migrant individuals carried suppressor gene variants in the A genome in addition to  $B_{24}$ . It is thus likely that, when  $B_{24}$  invasion reached Algarrobo, it was accompanied by the entry of the A gene variants specifically suppressing its drive, thus impeding this B variant to increase very much in frequency (see mean  $B_{24}$  frequency in Table 1). Perfectti *et al.* (2004) argued that drive resistance for  $B_2$  in Torrox could serve as a pre-adaptation facilitating a rapid drive suppression of  $B_{24}$ . Thus the entry of the specific  $B_{24}$  drive suppressors in parallel to  $B_{24}$  invasion in Algarrobo (and perhaps other populations close to Torrox) could provide an even faster suppression acting from the mere invasion and thus preventing the invading B from reaching a high frequency.

We cannot rule out the possibility that some fitness effects differentially acting on  $B_2$  and  $B_{24}$  carriers can contribute to the substitution process, but we have found only slight differences for clutch size,

egg fertility and embryo–adult viability, none reaching statistical significance separately. However, it is remarkable that, for all components combined, including B transmission,  $B_{24}$  carriers showed a significantly better performance than  $B_2$  carriers (Table 7). The most obvious difference between  $B_2$  and  $B_{24}$  concerns transmission through males, which greatly contrasts with the conclusion of Zurita *et al.* (1998) that replacement of  $B_2$  by  $B_{24}$  was due to difference in transmission efficiency through females. The advantage of  $B_{24}$  over  $B_2$  during male transmission could be achieved through mechanisms such as meiotic drive, mating preference of  $B_{24}$ -carrying males, assorted mating, preferential fertilization or assorted fertilization. With the available data we cannot choose among these possibilities, but the most parsimonious hypothesis should yield both the excess of  $B_{24}$  and the deficiency of  $B_2$ . A transmission analysis of these B variants through males in controlled crosses would throw much light on this subject.

The absence of  $B_{24}$  effects on egg fertility in Algarrobo is in great contrast to the significant effect observed by Zurita *et al.* (1998) for this same B variant in Torrox. This is a sign of lower virulence for  $B_{24}$  in Algarrobo. Neutralization of B chromosomes in *E. plorans* has been suggested for the  $B_1$  and  $B_2$  variants (Camacho *et al.* 1997) and has directly been witnessed for  $B_{24}$  in the Torrox population, since B drive and harmful effects on host egg fertility were still present in 1992 (Zurita *et al.* 1998) but had vanished in 1998 (Perfectti *et al.* 2004). In Algarrobo it seems that  $B_{24}$  is evolving toward a lower virulence, and this could also contribute to the substitution process once  $B_{24}$  drive is close to suppression.

As remarked by Ebert & Mangin (1997), single-factor explanations for the evolution of virulence can lead to wrong predictions. Multiple infections and high parasite intensities frequently lead to increased levels of virulence, because within-host competition of parasite mutants favours higher host exploitation rates (for review see Frank 1996). It is thus intriguing why the two B chromosome variants in Algarrobo do not seem to behave this way, since effects on fitness were slight. The A genome could have evolved high tolerance to  $B_2$  since it presumably was present for a long time in this population. The low frequency of both B variants in this population, each one showing a prevalence of about 20–30%, implies a low inten-

sity of parasitism, with scarce individuals carrying both B variants, which might help to explain this departure from expectations.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BOS2003-06635) and Plan Andaluz de Investigación (CVI-165). We thank Jesús Navas Castillo, his sons César and Pablo, Dragan Chobanov, Mohamed Abdelaziz and María Teruel for their help in collecting grasshoppers. We also thank Elisabeth Montiel for her help in studying some material, and Francisco Perfectti and Armando Caballero for useful comments on the manuscript.

### References

- Camacho JPM (2004) *B chromosomes in the Eukaryote Genome*. Basel: Karger.
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory TR, ed. *The Evolution of the Genome*. San Diego: Elsevier, pp. 223–286.
- Camacho JPM, Cabrero J, Viseras E, López-León MD, Navas-Castillo J, Alché JD (1991) G banding in two species of grasshopper and its relationship to C, N and fluorescence band techniques. *Genome* **34**: 638–643.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC, Cabrero J (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am Nat* **149**: 1030–1050.
- Christiansen FB, Frydenberg O (1973) Selection component analysis of natural polymorphisms using population samples including mother-offspring combinations. *Theor Popul Biol* **4**: 425–445.
- Ebert D, Mangin KL (1997) The influence of host demography on the evolution of virulence of a microsporidian gut parasite. *Evolution* **51**: 1828–1837.
- Frank SA (1996) Models of parasite virulence. *Q Rev Biol* **71**: 37–78.
- Henriques-Gil N, Arana P (1990) Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution* **44**: 747–753.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM, Cano MI, Santos JL (1992) A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. *Evolution* **46**: 529–539.
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A, Camacho JPM (1998) Parallel effects of a B chromosome and a mite that decrease female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proc R Soc Lond B* **265**: 1903–1909.
- Östergren G (1945) Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot Notiser* **2**: 157–163.
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA et al. (2004) Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenet Genome Res* **106**: 338–343.
- Rousset F, Raymond M (1995) Testing heterozygotes excess and deficiency. *Genetics* **140**: 1413–1419.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* **52**: 274–277.

## 6.1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de cromosomas B son dinámicos, lo que implica que su frecuencia varía en las distintas poblaciones dependiendo de factores diferentes tales como la tolerancia del genoma hospedador, el estado evolutivo del cromosoma B o factores históricos (Camacho, 2005). La dinámica de cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* implica la aparición de nuevas variantes de Bs, debido a la alta mutabilidad de los mismos y a su dispensabilidad (López-León *et al.*, 1993; Bakkali *et al.*, 2004), pudiendo sustituir estas variantes a las ya existentes.

La sustitución de un tipo de cromosoma B por otro ha demostrado ser un fenómeno de gran interés en la evolución de los cromosomas B del saltamontes *Eyprepocnemis plorans*. De hecho, el proceso de sustitución entre variantes de Bs ha sido documentado en esta especie para la población malagueña de Torrox (Zurita *et al.*, 1998), donde la variante  $B_{24}$  sustituyó a  $B_2$ , de la que presumiblemente derivó. Ambas variantes estaban presentes en esta localidad en 1984 (Henriques-Gil & Arana, 1990), aunque  $B_2$  mostraba entonces una baja frecuencia, no encontrándose más tarde en 1992 (Zurita *et al.*, 1998), lo que implicaba que el reemplazamiento se había completado. Un análisis de cruzamientos controlados mostró que  $B_{24}$  se acumulaba significativamente a través de las hembras, lo que sugería que el reemplazamiento había tenido lugar gracias a una mayor eficiencia en la tasa de transmisión de  $B_{24}$  sobre  $B_2$ , puesto que  $B_2$  no mostraba acumulación (López-León *et al.*, 1992a). Posteriormente, se produjo la supresión de la acumulación de  $B_{24}$  en Torrox, ya que esta variante no la mostraba en 1998 (Perfectti *et al.*, 2004a).

Para profundizar en el conocimiento de la dinámica espacial y temporal con que se lleva a cabo este proceso de sustitución, hemos analizado, a lo largo de cinco años, la frecuencia de los tipos de cromosomas B presentes en cinco poblaciones próximas a Torrox, donde  $B_{24}$  alcanza la mayor frecuencia.

## 6.2. RESULTADOS

### 6.2.1. Dispersión de la variante B<sub>24</sub> en áreas colindantes a Torrox (Málaga)

Para conocer la dinámica espacial y temporal con la que se lleva a cabo el proceso de dispersión de la variante B<sub>24</sub>, desde su lugar de origen en Torrox (Málaga) hacia áreas colindantes, hemos realizado una serie de muestreos en esta población y en cuatro situadas hacia el este (Nerja0, Nerja1, Maro y Tetuán) y una hacia el oeste (Algarrobo), entre los años 2001 y 2006 (tabla 6.1).

Tabla 6.1. Relación de los individuos de cada sexo empleados para analizar la frecuencia de Bs.

Población	Año	Sexo	
		Machos	Hembras
Algarrobo	2001	21	-
	2002	43	65
	2003	43	34
	2004	46	29
	2005	34	27
	2006	33	-
Torrox	2004	61	-
	2006	44	-
Nerja0	2001	23	-
	2004	41	22
	2005	3	3
	2006	44	-
Nerja1	2001	12	-
	2004	37	17
	2006	47	-
Tetuán	2001	28	-
	2004	46	-
	2006	35	-
Maro	2001	27	-
	2004	19	-
	2006	16	-
<b>Total</b>		703	197

El análisis citogenético de estos individuos mostró la presencia de dos tipos de cromosomas B: B<sub>2</sub> y B<sub>24</sub>, más alguna variante de éstos aparecida esporádicamente. B<sub>24</sub> es un poco más grande que B<sub>2</sub> y tiene tres bandas C en vez de dos, y una región en el extremo distal sin bandas C de menor tamaño que en B<sub>2</sub> (figura 6.1). Para cada variante, hemos calculado la prevalencia de Bs, entendida como la proporción de individuos de una población que portan una variante concreta de B, como podemos observar en la tabla 6.2.

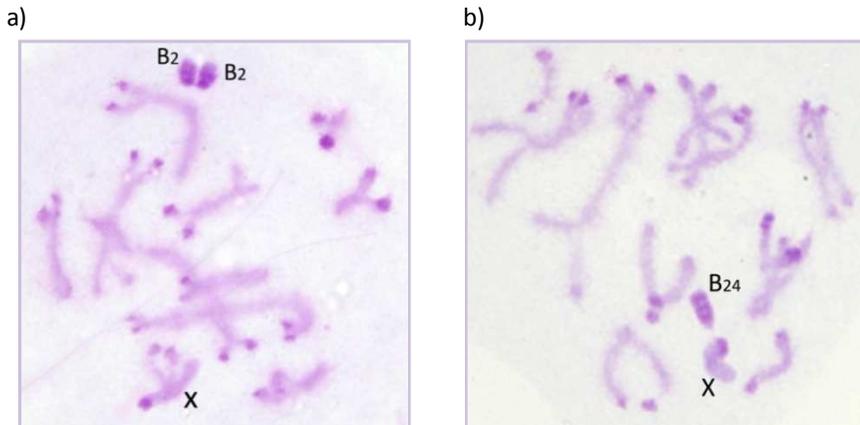


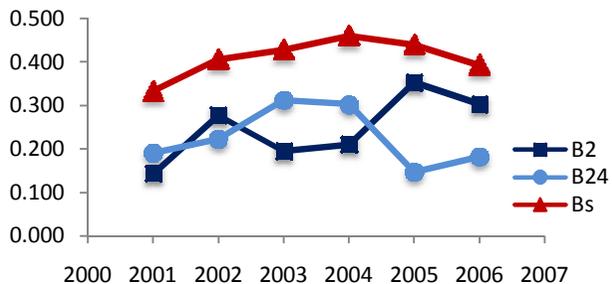
Figura 6.1. Espermatocitos primarios en fase de paquitene-diplotene sometidos a bandeado C, donde podemos observar las variantes B<sub>2</sub> (a) y B<sub>24</sub> (b).

Tabla 6.2. Datos de prevalencia de los distintos tipos de Bs presentes en las poblaciones muestreadas de las provincias de Málaga y Granada.

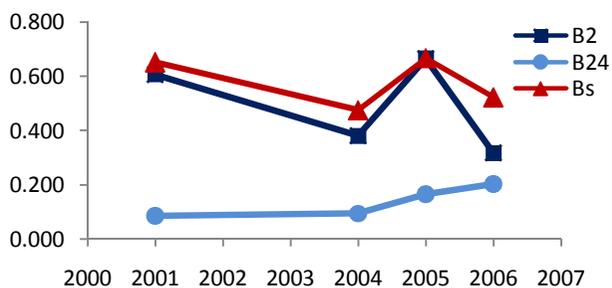
Población	Año	Prevalencia		
		Bs	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>
Algarrobo	2001	0.333	0.143	0.190
	2002	0.407	0.278	0.222
	2003	0.429	0.195	0.312
	2004	0.461	0.211	0.303
	2005	0.441	0.353	0.147
	2006	0.394	0.303	0.182
Torrox	2004	0.738	0.082	0.705
	2006	0.864	0.045	0.818
Nerja0	2001	0.652	0.609	0.087
	2004	0.476	0.381	0.095
	2005	0.667	0.667	0.167
	2006	0.523	0.318	0.205
Nerja1	2001	0.583	0.583	0.083
	2004	0.481	0.463	0.056
	2006	0.511	0.362	0.149
Tetuán	2001	0.464	0.464	0
	2004	0.543	0.522	0.043
	2006	0.629	0.629	0
Maro	2001	0.333	0.333	0
	2004	0.211	0.158	0.053
	2006	0.313	0.313	0

Para analizar posibles tendencias en la evolución de la prevalencia de Bs a lo largo de estos años, hemos representado gráficamente estos valores (figura 6.2).

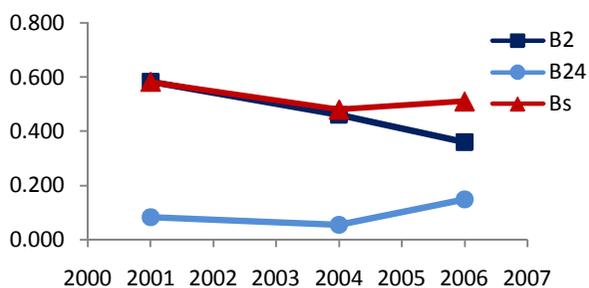
a) Algarrobo



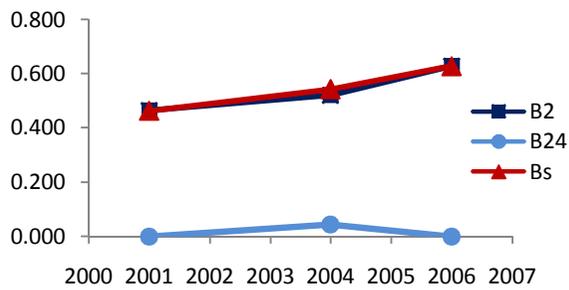
b) Nerja0



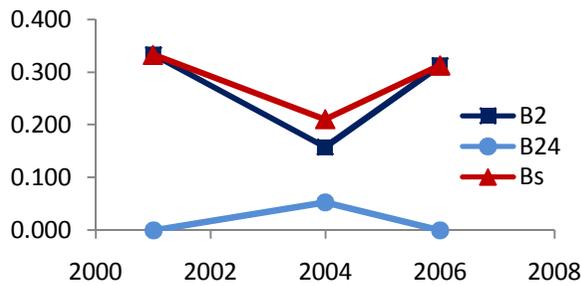
c) Nerja1



d) Tetuán



e) Maro



f) Torrox

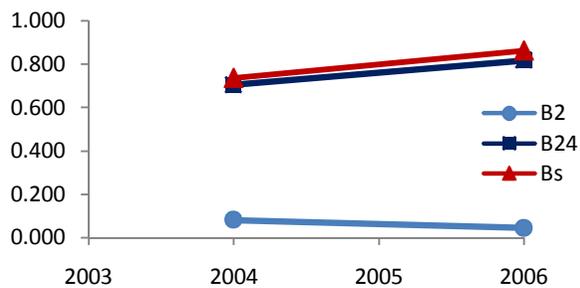


Figura 6.2. Análisis de la evolución de la prevalencia de los cromosomas B presentes en Algarrobo (a), Nerja0 (b), Nerja1 (c), Tetuán (d), Maro (e) y Torrox (f).

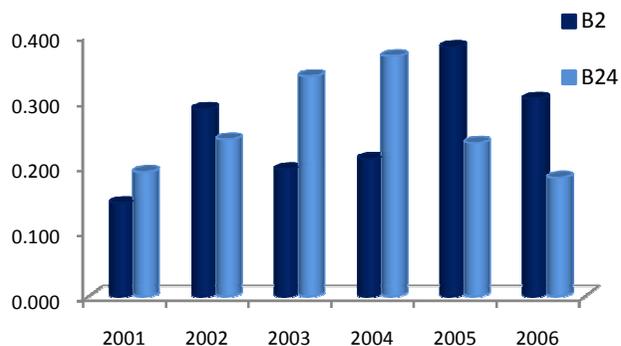
Análisis similares para la frecuencia media de Bs por individuo se muestran en la tabla 6.3 y la figura 6.3.

Tabla 6.3. Frecuencia media de los distintos tipos de Bs presentes en las poblaciones muestreadas de las provincias de Málaga y Granada.

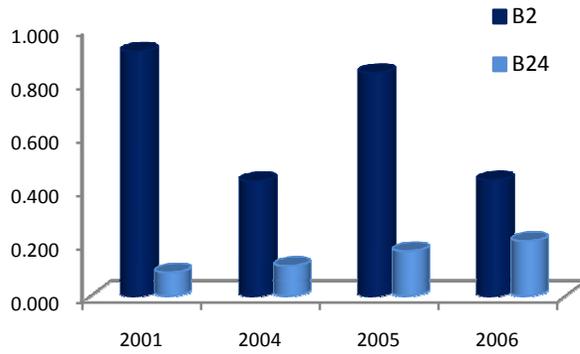
Población	Año	Frecuencia media		
		Bs	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>
Algarrobo	2001	0.333	0.143	0.190
	2002	0.528	0.287	0.241
	2003	0.532	0.195	0.338
	2004	0.579	0.211	0.368
	2005	0.618	0.382	0.235
	2006	0.485	0.303	0.182
Torrox	2004	1.230	0.115	1.115
	2006	1.386	0.045	1.341
Nerja0	2001	1.000	0.913	0.087
	2004	0.540	0.429	0.111
	2005	1.000	0.833	0.167
	2006	0.636	0.432	0.205
Nerja1	2001	0.750	0.667	0.083
	2004	0.574	0.519	0.056
	2006	0.617	0.447	0.170
Tetuán	2001	0.571	0.571	0
	2004	0.717	0.674	0.043
	2006	0.714	0.714	0
Maro	2001	0.333	0.333	0
	2004	0.211	0.158	0.053
	2006	0.438	0.438	0

La representación gráfica de los datos recogidos en la tabla 6.3 se muestra a continuación en la figura 6.3:

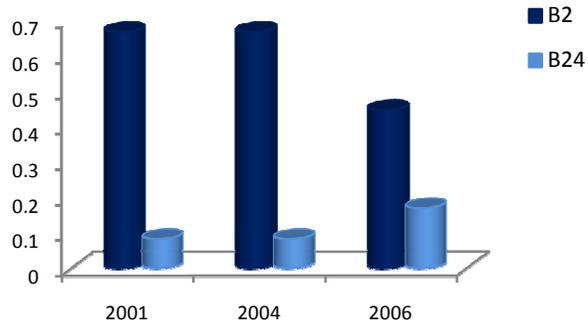
a) Algarrobo



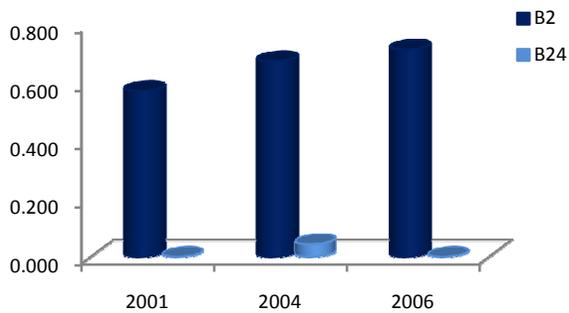
b) Nerja0



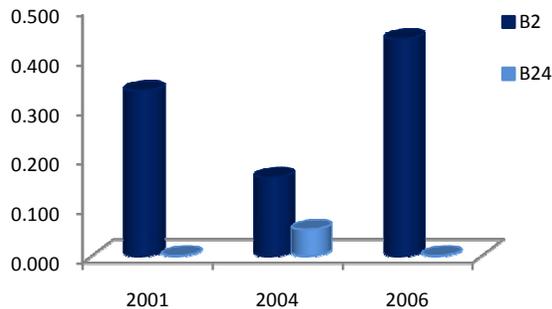
c) Nerja1



d) Tetuán



## e) Maro



## f) Torrox

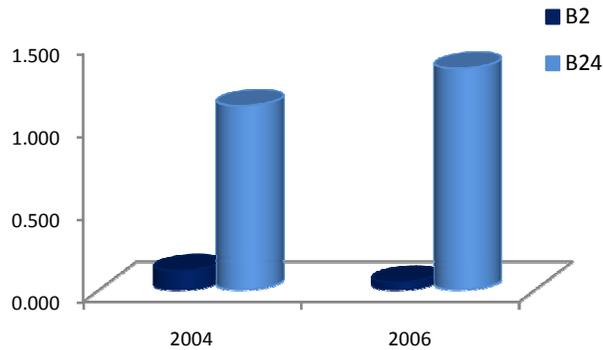


Figura 6.3. Nº medio de los distintos tipos de cromosomas B presentes en Algarrobo (a), Nerja0 (b), Nerja1 (c), Tetuán (d), Maro (e) y Torrox (f).

En las dos poblaciones de Nerja se observa una tendencia temporal al incremento en frecuencia de  $B_{24}$  (Figura 6.3b,c).

Si observamos la distribución espacial de la frecuencia de  $B_{24}$ , podemos apreciar que esta variante es más frecuente en las poblaciones adyacentes a Torrox, tanto por el este (Nerja0), como por el oeste (Algarrobo), sugiriendo que la expansión de  $B_{24}$  desde Torrox se está produciendo en ambas direcciones.

Además, a partir de los resultados mostrados anteriormente podemos observar cambios temporales estocásticos en la frecuencia de los diferentes tipos de B en la mayoría de las poblaciones, sin tendencia definida, con las excepciones de Nerja0 y Nerja1, donde  $B_{24}$  ha aumentado en frecuencia en los últimos años (figura 6.2b,c). Para conocer si esto responde a una tendencia general, hemos construido una matriz de distancias, en base a la diferencia de los valores de prevalencia entre

las distintas poblaciones analizadas (tabla 6.4), para las muestras de 2004 y de 2006 (que son los dos años para los que disponemos de muestras de las seis poblaciones).

Tabla 6.4. Matrices de distancias calculadas a partir de las diferencias poblacionales para la prevalencia de  $B_2$  y  $B_{24}$ . La parte superior de cada matriz corresponde a los datos de 2004 mientras que la inferior, en negrita, corresponde a 2006.

$B_2$	Algarrobo	Torrox	Nerja0	Nerja1	Tetuán	Maro
Algarrobo	0	0.129	0.170	0.252	0.311	0.053
Torrox	<b>0.258</b>	0	0.299	0.381	0.440	0.076
Nerja0	<b>0.015</b>	<b>0.273</b>	0	0.082	0.141	0.223
Nerja1	<b>0.059</b>	<b>0.317</b>	<b>0.044</b>	0	0.059	0.305
Tetuán	<b>0.326</b>	<b>0.584</b>	<b>0.311</b>	<b>0.267</b>	0	0.364
Maro	<b>0.010</b>	<b>0.268</b>	<b>0.005</b>	<b>0.049</b>	<b>0.316</b>	0

$B_{24}$	Algarrobo	Torrox	Nerja0	Nerja1	Tetuán	Maro
Algarrobo	0	0.402	0.208	0.247	0.260	0.250
Torrox	<b>0.636</b>	0	0.610	0.649	0.662	0.652
Nerja0	<b>0.023</b>	<b>0.613</b>	0	0.039	0.052	0.042
Nerja1	<b>0.033</b>	<b>0.669</b>	<b>0.056</b>	0	0.013	0.003
Tetuán	<b>0.182</b>	<b>0.818</b>	<b>0.205</b>	<b>0.149</b>	0	0.01
Maro	<b>0.182</b>	<b>0.818</b>	<b>0.205</b>	<b>0.149</b>	<b>0</b>	0

Cuando comparamos, mediante un test de Mantel, las matrices de diferencias en prevalencia entre el año 2004 y 2006 para cada uno de los dos tipos de Bs observamos que existe correlación significativa entre ellas ( $p < 0.05$ ) (ver tabla 6.5). Esto indica que las diferencias interpoblacionales en la prevalencia de las distintas variantes de Bs se mantuvieron durante el período 2004-2006.

Tabla 6.5. Resultados del test de Mantel para las diferencias en prevalencia entre 2004 y 2006 para  $B_2$  y  $B_{24}$ .

	$B_2$	$B_{24}$
<b>r</b>	0.49	0.892
<b>p</b>	0.0028	0.025

Para averiguar si existe aislamiento por distancia, hemos construido también una matriz de distancias geográficas entre las poblaciones (tabla 6.6). Cuando comparamos, mediante el test de Mantel, las matrices de diferencias en prevalencia de los Bs con la matriz de distancias geográficas (hemos utilizado la distancia geográfica como el logaritmo decimal de los metros que separan las

distintas poblaciones) tanto para 2004 como para 2006 en los dos tipos de Bs, los resultados indican que no hay correlación ( $p > 0.05$ ) (tabla 6.7), lo que sugiere que las diferencias interpoblacionales en prevalencia de Bs no siguen un patrón basado en distancias geográficas.

Tabla 6.6. Matriz de distancias geográficas. En la parte superior aparece la distancia medida en metros entre las distintas poblaciones analizadas mientras que en la parte inferior, en negrita, se muestran los valores del logaritmo decimal de las distancias en metros de la parte superior.

	Algarrobo	Torrox	Nerja0	Nerja1	Tetuán	Maro
Algarrobo	0	8452	13154	14713	17050	18525
Torrox	<b>3.927</b>	0	4836	6461	8893	10368
Nerja0	<b>4.119</b>	<b>3.684</b>	0	1559	4085	5560
Nerja1	<b>4.168</b>	<b>3.810</b>	<b>3.193</b>	0	2423	3897
Tetuán	<b>4.232</b>	<b>3.949</b>	<b>3.611</b>	<b>3.384</b>	0	1475
Maro	<b>4.268</b>	<b>4.016</b>	<b>3.745</b>	<b>3.591</b>	<b>3.169</b>	0

Tabla 6.7. Resultados del test de Mantel para las diferencias en prevalencia de cada tipo de B y la matriz de distancia geográfica, tanto en 2004 como en 2006.

	2004		2006	
	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>
r	-0.0058	-0.0689	0.467	0.243
p	0.517	0.517	0.171	0.178

## 6.2.2. Análisis de la transmisión de los cromosomas B

Con objeto de conocer la tasa de transmisión de los diferentes tipos de Bs presentes en las poblaciones más cercanas a Torrox, Algarrobo al oeste y Nerja0 y Nerja1 al este, realizamos una serie de cruzamientos controlados.

En 2004 realizamos cruzamientos con individuos pertenecientes a las poblaciones de Algarrobo (datos publicados en Manrique-Poyato *et al.*, 2006) y de Nerja1, mientras que en 2005 se implicaron en los cruces individuos de Algarrobo y de Nerja0.

En 2004 nos centramos en analizar la tasa de transmisión de los cromosomas B a través de la hembra (empleando hembras portadoras y machos carentes de Bs) mientras que en 2005 analizamos también la tasa de transmisión del B a través de los machos. En las tablas 6.8-6.10(II) podemos observar los resultados de estos cruzamientos.

Los resultados mostraron, en conjunto, transmisión de  $B_2$  a tasa mendeliana en ocho cruces a través de la hembra y cuatro cruces a través del macho observándose tasa de transmisión inferior a la mendeliana en un cruce a través del macho. Por otra parte,  $B_{24}$  mostró tasa mendeliana en cuatro cruces a través de la hembra y en dos cruces a través del macho, pero se observó acumulación significativa de este B a través de una hembra y eliminación significativa a través de un macho y una hembra. Estos resultados sugieren la existencia de variación en las poblaciones para la tasa de transmisión de los cromosomas B, especialmente para  $B_{24}$ . No obstante, el número de cruzamientos fue insuficiente para obtener resultados fiables sobre tendencias generales en las poblaciones.

Tabla 6.8. Análisis de la progenie de cinco cruzamientos implicando a hembras portadoras de cromosomas B en la población de Nerja1 en 2004.

Nerja1 2004	Progenitores		Embriones con						B <sub>2</sub>			B <sub>24</sub>		
	Macho	Hembra	Total	OB	1B <sub>2</sub>	2B <sub>2</sub>	1B <sub>24</sub>	2B <sub>24</sub>	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	Media*	Kb**	Z test	Media	Kb
h3 x m9	OB	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	31	11	5	8	1	6	0,355	0,355	-1.62	0,516	0,516	0,179
h5 x m7	OB	1B <sub>2</sub>	19	12	7				0,368	0,368	-1.15	-	-	-
h11 x m19	OB	2B <sub>2</sub>	18	4	10	4			1	0,5	0	-	-	-
h18 x m13	OB	1B <sub>2</sub>	14	7	7				0,5	0,5	0	-	-	-

\*Número medio de cromosomas B en la progenie.

\*\* Tasa de transmisión de los cromosomas B por la hembra.

Tabla 6.9. Análisis de la progenie de seis cruzamientos donde las hembras eran portadoras de cromosomas B y pertenecientes a la población de Algarrobo en 2005.

Algarrobo 2005	Progenitores		Embriones con										B <sub>2</sub>			B <sub>24</sub>		
	Macho	Hembra	Total	OB	1B <sub>2</sub>	1B <sub>24</sub>	2B <sub>24</sub>	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	1B <sub>24</sub> +2B <sub>2</sub>	1B <sub>24</sub> +2B <sub>24</sub>	Media	Kb	Z test	Media	Kb	Z test		
h4 x m19	OB	1B <sub>24</sub>	29	9	0	20					-	-	0,69	0,69	2.06			
h8 x m34	OB	1B <sub>2</sub> +2B <sub>24</sub>	11	1	1	4	1	3	1		0,455	0,455	0,298	1	0,5	0		
h12 x m13	OB	1B <sub>24</sub>	15	6		9					-	-	0,6	0,6	0,775			
h18 x m19	OB	1B <sub>2</sub> +2B <sub>24</sub>	8	1	4	2	1				0,625	0,625	0,706	0,875	0,44	0,338		
m14 x h16	OB	OB	23	12	11						0,478	0,478	0,212	-	-	-		
m18 x h10	OB	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	21	1	12	6	2				0,667	0,667	1,53	0,381	0,381	-1,09		
m20 x h13	OB	OB	32	22	10						0,313	0,313	-2.125	-	-	-		
m21 x h26	OB	1B <sub>24</sub>	24	18	6						-	-	0,250	0,250	-2.45			
m23 x h27	OB	1B <sub>24</sub>	35	15	20						-	-	0,571	0,571	0,835			

Tabla 6.10(I). Análisis de la progenie de tres machos y tres hembras de la población de Nerja0 (2005) portadores de cromosomas B e implicados en cruzamientos.

Nerja0 2005	Progenitores		Embriones con						
	Macho	Hembra	Total	OB	1B <sub>2</sub>	2B <sub>2</sub>	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	2B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	3B <sub>2</sub>
h1 x m5	OB	1B <sub>2</sub>	11	5	6	0	0	0	0
h2 x m4	2B <sub>2</sub>	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	21	0	7	7	2	3	2
h3 x m3	1B <sub>2</sub>	OB	20	10	10	0	0	0	0

Tabla 6.10(II). Frecuencia media de cromosomas B en la progenie de los cruzamientos realizados en Nerja0 en 2005 (tabla 10-I) y tasa de transmisión de los mismos por parte de los parentales.

Nerja0 2005	Macho	Hembra	Progenitores								
			Hembra			Macho					
			B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>24</sub>	B <sub>2</sub>			
h1 x m5	OB	1B <sub>2</sub>	Media	Kb	Z test	Media	Kb	Z test	Media	Kb	Z test
h2 x m4	2B <sub>2</sub>	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	0,545	0,545	0,298	--	--	--	--	--	--
h3 x m3	1B <sub>2</sub>	OB	1,667	0,556	0,513	0,238	0,238	-2,404	1,667	0,556	0,513
			--	--	--	--	--	--	0,5	0,5	0

### 6.3. DISCUSIÓN

El conocimiento del patrón de sustitución entre diferentes variantes de cromosomas B es importante para conocer la historia evolutiva de los sistemas de cromosomas B y su papel en los genomas.

La sustitución de la variante  $B_2$  por  $B_{24}$  en la población de Torrox (Málaga) descrita por Zurita *et al.*, (1998) es un ejemplo claro del fenómeno de sustitución entre variantes de cromosomas B. Este reemplazamiento tuvo lugar gracias a una mayor eficiencia en la tasa de transmisión de  $B_{24}$  sobre  $B_2$ , puesto que  $B_2$  no mostraba acumulación (López-León *et al.*, 1992). En 1984, una muestra procedente de Torrox presentaba tanto cromosomas  $B_2$  como  $B_{24}$  (Henriques-Gil & Arana, 1990), pero las muestras tomadas en 1992 y 1994 carecían de  $B_2$  y mostraban un incremento importante de la frecuencia del  $B_{24}$ , llegando a alcanzar, en la muestra de 1994, una frecuencia de 1.53, lo que supone la frecuencia media de cromosomas B más alta que se ha documentado para *E. plorans*. Estos datos indicaban que el reemplazamiento se había completado. Sin embargo, este nivel de acumulación fue suprimido en los años posteriores, de forma que en 1998 la variante  $B_{24}$  no mostraba acumulación, como describieron Perfectti *et al.* (2004a).

Más tarde, Manrique-Poyato *et al.* (2006) intentaron aclarar las causas y la dinámica del reemplazamiento de una variante de cromosoma B por otra en una población próxima a Torrox (Algarrobo), que mostraba la presencia tanto de  $B_2$  y  $B_{24}$  y que se encontraba en un estado intermedio en el proceso de sustitución de  $B_2$  por  $B_{24}$ , puesto que las hembras presentaban una tasa de transmisión de cromosomas  $B_{24}$  de 0.6, que era mayor que la tasa de transmisión mendeliana, pero menor que la que  $B_{24}$  presentaba en Torrox en 1992 (0.696) y ligeramente mayor que la observada en 1998 (0.523). En Algarrobo no han llegado a encontrarse las frecuencias extremas alcanzadas en Torrox (de 1.5 Bs por individuo), lo que sugiere que los individuos migrantes portadores de  $B_{24}$  quizás portaban también genes supresores de la acumulación de los cromosomas B, que impedirían que éstos alcanzaran altas frecuencias. Manrique-Poyato *et al.* (2006) analizaron también el efecto de ambas variantes de cromosomas B ( $B_2$  y  $B_{24}$ ) sobre componentes de la fitness de los individuos portadores, tales como el tamaño de puesta, la fertilidad de los huevos o la viabilidad desde embrión a adulto, y concluyeron que, aunque no había diferencias significativas en cuanto al efecto de  $B_2$  y  $B_{24}$  sobre estas componentes de la fitness, la combinación de todas ellas, junto con una mayor eficacia en la transmisión de  $B_{24}$  con respecto a  $B_2$  a través de los machos y su acumulación significativa en algunas hembras hacía que  $B_{24}$  mostrara una ventaja global sobre  $B_2$ , lo que ayudaría en el proceso de sustitución.

Nuestros resultados, en cinco poblaciones próximas a Torrox, muestran que existen cambios temporales en la frecuencia de  $B_2$  y  $B_{24}$  en la mayoría de las poblaciones, aunque sin tendencia definida, sugiriendo que se trata de cambios estocásticos y no de una sustitución de una variante por otra. Las dos poblaciones de Nerja, sin embargo, muestran una tendencia temporal al incremento en frecuencia de  $B_{24}$ , tendencia que no se observa en el conjunto de las poblaciones mediante el test de Mantel entre las diferencias temporales en frecuencia. Esto sugiere que los procesos de sustitución pueden ser diferentes en cada población, tanto por razones temporales, es decir, porque la invasión de  $B_{24}$  comenzó en momentos diferentes, como por razones locales, debido a condiciones ambientales que marcan diferencias en la dinámica poblacional de  $B_2$  y  $B_{24}$ . Por tanto, el estudio de los procesos de sustitución a nivel de cada población puede arrojar mejores resultados que los estudios globales incluyendo conjuntos de poblaciones.

Con las diferencias entre poblaciones para la prevalencia de  $B_2$  y  $B_{24}$  construimos una matriz de distancias para la muestra de 2004 y otra para la de 2006, y las comparamos con la matriz de distancias geográficas entre las poblaciones. El test de Mantel mostró correlación significativa entre las matrices de prevalencia para los dos años, indicando que las diferencias entre poblaciones para la prevalencia de Bs (tanto  $B_2$  como  $B_{24}$ ) se mantuvieron en los años analizados, no observándose, una vez más, tendencia hacia la sustitución de la variante  $B_2$  por la  $B_{24}$ . La evolución de  $B_{24}$ , en cuanto a su aumento o disminución en frecuencia, parece corresponderse con una paralela disminución o aumento, respectivamente, en la frecuencia de  $B_2$  (ver figura 6.2). Esto podría deberse, según el modelo parasítico de la evolución de los cromosomas B, a que los Bs en alto número son más deletéreos (Östergreen, 1945; Nur, 1966; Jones, 1985; Shaw & Hewitt, 1990), además de por posibles interacciones entre las dos variantes de parásitos genómicos que previenen su expansión, al establecerse un competencia entre los mismos por los recursos celulares que les posibilita adquirir ventaja y permanecer en el genoma. Otra posibilidad es que la presencia de genes supresores para el  $B_2$ , disminuya la posibilidad de éxito de  $B_{24}$  (Hurst *et al.*, 1996)

El análisis espacial de la frecuencia de  $B_{24}$  indica que esta variante es más frecuente en la población más cercana situada al este de Torrox (Nerja0) que en la más occidental (Algarrobo), sugiriendo que la expansión de  $B_{24}$  parece ser más fácil hacia el este. Esto es apoyado por la existencia de un mayor número de migrantes desde Torrox hacia Nerja0 que hacia Algarrobo (calculados a partir de las distancias genéticas, *Pairwise-Fst*, obtenidas con los marcadores ISSRs), lo que puede ser lógico si tenemos en cuenta que la distancia entre Torrox y Nerja0 es menor que la hay entre Torrox y Algarrobo. Sin embargo, la distancia geográfica no parece ser un factor determinante en la dinámica de expansión de  $B_{24}$ , ya que en las muestreos

realizados en Algarrobo y Nerja0 desde 2001 hasta 2004, la frecuencia de  $B_{24}$  aumentó progresivamente en ambas poblaciones, apareciendo en 2004 una prevalencia de  $B_{24}$  mayor en Algarrobo (0.303) que en Nerja0 (0.095), pero en los siguientes muestreos, realizados en años posteriores (2005 y 2006), la prevalencia de  $B_{24}$  en Algarrobo inició un descenso hasta alcanzar un valor de 0.182 en 2006, mientras que, por el contrario, siguió aumentando en Nerja0 hasta alcanzar un valor de 0.205 en ese mismo año. Este aumento en frecuencia de  $B_{24}$  en Nerja0, y su disminución en Algarrobo, no parece relacionarse con su capacidad de acumulación en estas poblaciones, ya que los análisis de herencia realizados, mediante cruces controlados, muestran una ausencia de acumulación de  $B_{24}$  en Nerja0 y su acumulación en Algarrobo, fundamentalmente a través de las hembras. Todo esto parece indicar que, aunque Algarrobo esté a una mayor distancia de Torrox, y muestre un menor número de migrantes hacia esa población que Nerja0, la variante  $B_{24}$  puede haberse expandido antes hacia la población de Algarrobo, perdiendo virulencia posteriormente. Sin embargo, en la población de Nerja0 parece que estamos asistiendo a los estadios iniciales de la invasión por  $B_{24}$ . De las observaciones realizadas también se desprende que otros factores distintos a los de su capacidad de sobretransmitirse pueden estar jugando un papel decisivo en su permanencia y expansión a otras poblaciones. Será muy interesante comprobar si, en muestreos futuros, la dinámica observada para  $B_{24}$  en Algarrobo se repite en la población de Nerja0 o, por el contrario, esta variante de B consigue invadir la población de Nerja0, desplazando incluso a  $B_2$ .

De acuerdo con esta idea, el test de Mantel no mostró correlación significativa entre las matrices de distancia en prevalencia de Bs y la matriz de distancia geográfica, sugiriendo que las diferencias interpopulacionales en prevalencia de Bs (tanto para  $B_2$  como para  $B_{24}$ ) son independientes de las distancias geográficas; sin embargo, el test de Mantel realizado en el capítulo 4 (tabla 4.14) donde comparábamos la matriz del número de migrantes (anexo 4.23) con la matriz de distancias geográficas (anexo 4.24), sí reveló la existencia de aislamiento por distancia en la región costera de Málaga y Granada. La diferencia entre estos dos test radica en que en el primer análisis (no significativo) sólo se han tenido en cuenta poblaciones de la costa de Málaga (Algarrobo, Torrox, Nerja0, Nerja1, Maro y Tetuán), mientras que en el segundo (que sí muestra aislamiento por distancia) se introdujo, además, la población granadina de Salobreña, la más alejada geográficamente.

Los factores ambientales también determinan la frecuencia de los cromosomas B, como ocurre en el pez *Astyanax scabripinnis*, donde Morilha Neó *et al.*, (2000) han observado una variación altitudinal para la frecuencia de un cromosoma B, aumentando su prevalencia en ambientes más favorables. De la

misma forma, en el maíz se ha descrito una clina altitudinal para la presencia de cromosomas B con significado adaptativo y donde los factores selectivos y no los demográficos definen dicha clina (Lia *et al.*, 2007). Desconocemos si alguna de las poblaciones analizadas constituye un ambiente más favorable para la supervivencia y fertilidad de los individuos con Bs, extremo éste que sería muy interesante aclarar en investigaciones futuras. Por otra parte, a un nivel celular los cromosomas B se encuentran en el ambiente nuclear y genético del genoma hospedador, que puede variar en las diferentes poblaciones, por lo que los distintos grados de tolerancia del genoma hospedador puede estar también modelando la dinámica de invasión y expansión de B<sub>24</sub> desde Torrox a las poblaciones limítrofes.



## **7. Análisis de la asociación de marcadores moleculares a los cromosomas B**

---





## 7.1. INTRODUCCIÓN

El carácter mayoritariamente heterocromático de los cromosomas B y su contenido, formado principalmente de ADN repetitivo, llevó a pensar que los cromosomas B eran elementos genéticamente inertes. Posteriormente se ha visto que esto no es así, pues algunos cromosomas B son portadores de genes. Además, el hecho de que estén aislados meióticamente de los cromosomas A y sean dispensables hace que estén sometidos a un proceso de degeneración y divergencia respecto al resto de cromosomas que posibilita la aparición de secuencias específicas en los mismos. Así, en los cromosomas B se han encontrado genes para ARN ribosómico *45s*, como ocurre en *Allium cernuum* (Friebe, 1989) y *Eyprepocnemis plorans* (López-León *et al.*, 1994a), ARN ribosómico *5s*, como es el caso de los Bs de *Plantago lagopus* (Dhar *et al.*, 2002) y de *E. plorans* (Cabrero *et al.*, 2003b), ADN telomérico como se ha descrito en los Bs de la rata de agua *Nectomys squamipes* (Silva & Yonenaga-Yassuda, 1998), genes para las histonas H3 y H4 localizados en los Bs de *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010a), genes de copia única como, por ejemplo, es el caso de los cromosomas B del hongo *Nectria haematococca* (Coleman *et al.*, 2009), o ADN repetido en tándem que en algunas especies es específico del cromosoma B, como describieron en *Brachycome dicromosomatica* John *et al.* (1991), en *Nasonia vitripennis* Nur *et al.* (1998) o más recientemente en el maíz (Cheng & Lin, 2003) (para obtener más detalles, consúltese el apartado 1.1).

Puesto que el ADN repetido en tándem es un componente mayoritario en los cromosomas B, el uso de cebadores cuya secuencia incluya repeticiones de nucleótidos amplificará fragmentos que contengan secuencias pertenecientes a los Bs, como ocurre con los cebadores que amplifican marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), pudiendo ser algunos de ellos específicos de los Bs. Como ejemplos de marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) obtenidos mediante cebadores que amplifican fragmentos ISSRs podemos citar el caso del SCAR ligado al gen *SFL* (*Seasonal Flowering Locus*) que controla la floración estacional en *Fragaria vesca* (Albani *et al.*, 2004), de los marcadores SCAR capaces de identificar diferentes especies de moscas necrófagas (He *et al.*, 2007), del SCAR de la cebada, ligado al gen *Ha2*, que confiere resistencia a un nematodo que la parasita llamado *Heterodera avenae* (Dayteg *et al.*, 2008) o del descrito muy recientemente para *Tilletia controversa* que permite diagnosticar la infección del trigo por este hongo (Gao *et al.*, 2010).

Estas secuencias específicas de los cromosomas B que se obtendrían mediante la amplificación de marcadores ISSR podrían ser transformados en marcadores SCAR de gran utilidad para detectar la presencia o ausencia de cromosomas B en los individuos. Otras de sus aplicaciones están relacionadas con su

uso en el mapeo genético (Huo *et al.*, 2009), la determinación del sexo (Oyama *et al.*, 2009) o la identificación de razas (Pasquali *et al.*, 2007) y especies (Yau *et al.*, 2002).

Son varios los estudios que han identificado marcadores asociados a los cromosomas B, como son los casos del maíz (Gourmet & Rayburn, 1996), el ratón *Apodemus flavicollis* (Tanic *et al.*, 2000) la abeja *Partamona helleri* (Tosta *et al.*, 2004) o el saltamontes *Eyrepocnemis plorans* (Muñoz-Pajares *et al.*, en preparación). En estos estudios, los cebadores empleados amplificaban RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) sin que se haya descrito hasta el momento asociaciones entre marcadores ISSRs y la presencia de cromosomas B en el cariotipo.

Nuestro objetivo es localizar secuencias específicas de los cromosomas B del saltamontes *Eyrepocnemis plorans* mediante el uso de marcadores ISSR.

## 7.2. RESULTADOS

Para detectar la posible asociación entre los marcadores ISSR y los cromosomas B, hemos realizado dos tipos de análisis, uno en individuos adultos y otro mediante cruzamientos controlados.

### 7.2.1. Análisis en adultos

Para saber si existe algún marcador ISSR asociado a los cromosomas B hemos analizado primero la existencia de asociación significativa entre la presencia/ausencia de cromosomas B y la presencia/ausencia de marcadores ISSR mediante test de contingencia con el software Statistica v7.1. Con todos aquellos marcadores que presentaban asociación significativa, hemos calculado luego el valor de *Odds Ratio* (OR) para saber si esa asociación era positiva o negativa, pues aquellos marcadores que muestren una asociación positiva en relación a la presencia de cromosomas B serán aquellos que con más probabilidad estén en los cromosomas B.

Hemos realizado este análisis a dos niveles: i) para el total de las poblaciones analizadas (10 en total), y ii) sólo con las poblaciones portadoras de cromosomas B.

#### ❖ Análisis de todas las poblaciones

La tabla 7.1 resume los marcadores que presentan asociación positiva entre individuos portadores de cromosomas B e individuos portadores de un determinado marcador ISSR.

Tabla 7.1. Relación de marcadores cuyo valor de OR indica una asociación positiva con la presencia de cromosomas B. Se considera que un valor de *odds-ratio* es significativo cuando el intervalo de confianza no pasa por cero. Si el intervalo está en el rango positivo, la asociación es positiva, y si está en el rango de valores negativos, la asociación es negativa.

Marcador	P de la Chi-cuadrado	Odds Ratio	Intervalo de Confianza (95%)
6-250	0	4.2632	2,32-7,73
6-500	0	7.8305	4,18-14,68
7-480	0.045	2.1288	1,01-4,50
7-800	0.00016	3.1791	1,72-5,89
7-1600	0	4.3939	2,53-7,63
14-850	0.034	1.7665	1,04-2,99
14-1250	0	8.3988	4,24-16,63
14-1400	0	7.0861	3,32-15,11
14-1450	0.00012	4.7671	2,16-10,49
26-380	0.001	2.4412	1,43-4,18
26-700	0.00003	3.1186	1,82-5,36
39-390	0.0078	2.2875	1,24-4,24
39-600	0	5.2968	2,82-9,96
39-700	0.0017	3.8008	1,59-9,11
39-1000	0.01004	3.0325	1,27-7,73
43-320	0.036	1.8889	1,04-3,44
43-400	0.024	1.9103	1,09-3,36
43-600	0	6.4383	3,61-11,49
43-800	0.0028	2.3631	1,32-3,88

Las tablas con las frecuencias observadas y las esperadas para cada uno de los 19 marcadores que aparecen en la tabla 7.1 se muestran en el anexo 7.1.

### ❖ Análisis de las poblaciones portadoras de cromosomas B

Para intentar evitar que la inclusión de poblaciones OB interfiriese diluyendo la intensidad de la asociación, repetimos los análisis eliminando las poblaciones OB. Los marcadores asociados positivamente con la presencia de Bs se muestran en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Relación de marcadores cuyo valor de OR indica una asociación positiva con la presencia de cromosomas B. Se considera que un valor de *odds-ratio* es significativo cuando el intervalo de confianza no pasa por cero. Si el intervalo está en el rango positivo, la asociación es positiva, y si está en el rango de valores negativos, la asociación es negativa.

Marcador	Chi-cuadrado de Pearson	Odds Ratio	Intervalo de Confianza (95%)
6-250	0.0019	2.8042	1,4471-5,434
6-500	0.00028	3.465	1,7412-6,8954
7-800	0.0094	2.4535	1,2346-4,8758
7-1600	0.02123	2.0212	1,1072-3,6896
14.1250	0.0004	3.7054	1,7496-7,8473
14-1450	0.0423	2.2904	1,0752-5,1672
26-700	0.0132	2.15	1,169-3,4592
39-600	0.01125	2.4123	1,2124-4,7995
39-700	0.00725	3.9724	1,3734-11,4897
43-320	0.04754	4.7727	2,4181-9,4202
43-600	0	4.6726	2,4684-8,8451

Las tablas con las frecuencias observadas y las esperadas para cada uno de los 11 marcadores que aparecen en la tabla 7.2 se muestran en el anexo 7.2.

#### 7.2.2. Análisis a través de cruzamientos controlados

Hemos analizado la descendencia de un total de nueve cruces (tabla 7.3) para ver la posible asociación entre los cromosomas B y los marcadores ISSR.

Tabla 7.3. Resumen del cariotipo de los parentales implicados en los cruzamientos (respecto a los cromosomas B) y marcadores ISSR que poseen (1: presencia de marcador, 0: ausencia de marcador).

Cruce	Población	Año	Parentales					Nº de descendientes analizados
			Cromosomas B		Marcadores ISSR			
			♀	♂	Marcador	♀	♂	
♀19 x ♂27	Algarrobo	2004	1B <sub>2</sub>	0B	7-430	1	0	18
					7-600	0	1	
					7-800	1	1	
					7-1000	0	1	
					7-1100	1	1	
					7-1400	1	0	
					14-500	1	0	15
					14-600	1	1	
					14-750	1	0	
					14-800	1	1	
					14-850	1	1	
					14-1250	1	1	
					14-1400	1	1	
					14-1800	1	0	
♀24 x ♂32	Algarrobo	2004	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	0B	7-430	1	1	15
					7-600	1	1	
					7-800	1	1	
					7-1000	0	1	
					7-1100	1	0	
					7-1400	0	1	
					7-1600	1	0	
♀4 x ♂19	Algarrobo	2005	1B <sub>24</sub>	0B	6-350	1	1	28
					6-500	1	1	
					6-1300	1	0	
					7-350	1	0	28
					7-430	1	1	
					7-480	0	1	
					7-600	1	1	
					7-700	1	1	
					7-800	1	0	
					7-1000	1	1	
					7-1400	0	1	
					14-400	1	1	28
					14-500	1	1	
					14-600	1	1	
					14-750	0	1	
					14-800	1	0	
					14-850	0	1	
14-1250	1	1						
14-1400	1	1						
14-1800	1	1						

Cruce	Población	Año	Parentales					Nº de descendientes analizados	
			Cromosomas B		Marcadores ISSR				
			♀	♂	Marcador	♀	♂		
♀12 x ♂3	Algarrobo	2005	1B <sub>24</sub>	0B	7-430	1	1	14	
					7-480	1	0		
					7-600	1	1		
					7-700	1	0		
					7-800	1	0		
					7-1000	1	0		
					7-1100	1	0		
					7-1400	1	0		
					7-1600	1	0		
					14-600	1	0		14
					14-750	1	0		
					14-800	1	1		
					14-1250	1	0		
					14-1400	1	0		
14-1450	1	0							
♀13 x ♂20	Algarrobo	2005	0B	1B <sub>2</sub>	14-600	1	1	28	
					14-750	1	1		
					14-800	1	0		
					14-850	0	1		
					14-1250	1	1		
					14-1400	1	1		
14-1450	0	1							
♀16 x ♂14	Algarrobo	2005	0B	1B <sub>2</sub>	14-600	1	1	17	
					14-750	0	1		
					14-800	1	1		
					14-850	0	1		
					14-1250	0	1		
					14-1400	0	1		
14-1450	0	1							
♀5 x ♂7	Nerja1	2004	1B <sub>2</sub>	0B	7-430	1	1	17	
					7-600	0	1		
					7-800	1	1		
					7-1000	0	1		
					7-1100	0	1		
					7-1400	0	1		
					7-1600	1	0		
					14-500	1	0	17	
					14-600	0	1		
					14-750	0	1		
					14-800	1	0		
					14-1250	0	1		
					14-1400	0	1		
					14-1800	0	1		

Cruce	Población	Año	Parentales					Nº de descendientes analizados
			Cromosomas B		Marcadores ISSR			
			♀	♂	Marcador	♀	♂	
♀2 x ♂4	Nerja0	2005	1B <sub>2</sub> +1B <sub>24</sub>	2B <sub>2</sub>	14-500	0	1	21
					14-600	1	1	
					14-750	1	1	
					14-800	1	0	
					14-1250	1	1	
					14-1400	1	1	
					14-1800	1	1	
♀3 x ♂3	Nerja0	2005	0B	1B <sub>2</sub>	7-430	1	1	20
					7-600	0	1	
					7-800	1	1	
					7-1000	1	1	
					7-1400	1	1	
					7-1600	1	1	

Tan solo el marcador 7-1400, en dos cruces diferentes, ♀5 x ♂7 (Nerja1 2004) y ♀3 x ♂3 (Nerja0, 2005), marcado en rojo en la tabla 7.2, mostró asociación positiva significativa. En la tabla 7.4 podemos observar los valores del test *de Odds Ratio* para este marcador en los dos cruces donde muestra asociación positiva con los cromosomas B.

Tabla 7.4. Relación de marcadores cuyo valor de OR indica una asociación positiva con la presencia de cromosomas B. Se considera que un valor de *odds-ratio* es significativo cuando el intervalo de confianza no pasa por cero. Si el intervalo está en el rango positivo, la asociación es positiva, y si está en el rango de valores negativos, la asociación es negativa.

Marcador	Cruce	Población	Año	Odds Ratio	Intervalo de Confianza (95%)
7-1400	♀5 x ♂7	Nerja1	2004	9.333	1.19 - 72.99
7-1400	♀3 x ♂3	Nerja0	2005	15.6032	2.257 - 107.87

En el anexo 7.3 podemos observar las frecuencias observadas y esperadas en la descendencia con respecto a la presencia/ausencia de cromosomas B y del marcador 7-1400.

### 7.3. DISCUSIÓN

En este estudio hemos amplificado 97 marcadores ISSR, de los cuales 12 parecen estar ligados al cromosoma B, puesto que muestran una asociación positiva significativa con la presencia de estos cromosomas. El hecho de que estas asociaciones no sean completas puede indicar que las dianas para los cebadores están en los Bs, pero también están representadas, en alguna medida, en el (los) cromosomas A, antecesores del B. Esto no descarta la posibilidad de que, efectivamente, se trate de secuencias específicas de los cromosomas B ya que el resto de la secuencia amplificada (descartando los cebadores) para cada uno de estos marcadores puede albergar diferencias presentes solo en los cromosomas B. Esta posibilidad será abordada en futuras investigaciones donde podríamos obtener tanto secuencias cuya localización esté retringida al propio B, como secuencias con una asociación preferente al B. Ambos tipos de secuencias serían de gran utilidad. La aparición de individuos con cromosoma B pero sin las bandas que muestran asociación preferente al B, puede deberse a una posible variación, dentro de un mismo tipo de B, para el número de copias de esta secuencia, de forma que si no se alcanza un umbral mínimo de repeticiones, la probabilidad de amplificación de dicha secuencia disminuye. De hecho, los cromosomas B de *E.plorans* muestran una alta mutabilidad (López-León *et al.*, 1993 Bakkali *et al.*, 2004), por lo que son posibles deleciones que explicaran este resultado. La observación de amplificación de este tipo de secuencias, con asociación preferente al B, en individuos OB, indica que están también presentes en los cromosomas A, lo que abre la posibilidad de investigar cuál o cuáles tipos cromosómicos contienen esa secuencia, mediante FISH y microdissección de cromosomas individuales.

El desarrollo de marcadores moleculares asociados a los cromosomas B de esta especie representa una enorme ventaja en la identificación de individuos portadores de cromosomas B puesto que, hasta ahora, hemos detectado la presencia de Bs mediante tinción con orceína de preparaciones cromosómicas de una muestra, obtenida en vivo, de folículos testiculares de machos o mediante frotis de hemolinfa, en las hembras (Cabrero *et al.*, 2006), lo que implica la manipulación de tejidos vitales para el individuo, pudiendo dar lugar a una menor supervivencia. Esta circunstancia dificulta la utilización de los individuos en experimentos que requieran su cultivo en el laboratorio durante un periodo de tiempo, como por ejemplo, para la realización de cruces controlados. La aproximación molecular para la caracterización de los individuos para la presencia de cromosomas B, obviaría este problema al poder utilizar tejidos, como las alas, que pueden ser diseccionadas sin riesgo para los individuos, y que permiten la extracción de DNA de gran calidad con el que conocer si los individuos tienen o no cromosomas B. Esto es esencial, por ejemplo, antes de iniciar un cruzamiento. Un marcador molecular del B permite también detectar la presencia de cromosomas B a partir de muestras secas enviadas

por colaboradores, desde otras poblaciones, o ayudar a conocer mejor el posible origen de los Bs por comparación de la secuencia de estos marcadores específicos del B con la secuencia presente en los cromosomas A. Además, con el uso de estos marcadores ahorraríamos tiempo en el proceso de detección de los cromosomas B en los individuos portadores.

Está demostrado que el uso de cebadores ISSR es útil en la búsqueda de marcadores específicos ligados a genes de interés (como hemos citado anteriormente en la cebada o en especies de moscas necrófagas). Además, hemos visto que la técnica de amplificación de RAPDs, similar a la de ISSRs, también puede conducir al desarrollo de marcadores específicos del B. Como comentábamos, la identificación de una secuencia con asociación preferencial al cromosoma B supone disponer de un marcador más para establecer los grados de divergencia entre la secuencia propia del B y la presente en los cromosomas A, mediante su amplificación en microdisseccionados de cada uno de los cromosomas A y del B y la posterior comparación de sus secuencias. Esperamos realizar próximamente esta investigación con los ADNs que ya tenemos microdisseccionados de cada uno de los cromosomas de *E. plorans*.



## 8. Conclusiones

---





1.- De los dos genes mitocondriales utilizados, *Nad5* ha resuelto mejor las relaciones filogenéticas entre *E. plorans* y las otras especies de Eyprepocnemidinae, al incluir en un clúster común a las dos subespecies analizadas, *E. plorans plorans* y *E. plorans meridionalis*, que son los únicos taxones que contienen el ADN satélite de 180 pb, específico de *E. plorans*. El gen *COI*, sin embargo, agrupaba a *E. plorans meridionalis* con *E. unicolor* y *Shirakiacris shirakii*, dos especies que carecen de este ADN satélite.

2.- Los niveles de divergencia observados para la secuencia de *Nad5* entre las poblaciones orientales, analizadas en Grecia y Armenia, y las occidentales, de la Península Ibérica y Marruecos, han permitido estimar entre 270.000 y un millón de años el tiempo que estas poblaciones llevan evolucionando separadamente.

3.- Las redes de haplotipos para *COI* y *Nad5* sugieren la existencia de un hipotético taxón ancestral, localizado probablemente en África Central, que evolucionó a *E. plorans meridionalis* hacia el sur y a *E. plorans plorans* hacia el norte, a través de dos rutas, una hacia oriente alcanzando Grecia y Armenia y otra hacia occidente, quizás por Marruecos y la Península Ibérica, aunque no se puede descartar el paso al Mediterráneo norte a través del estrecho de Sicilia.

4.- La especie *E. plorans* se diferenció de los otros Eyprepocnemidinos hace 3.29-4.14 millones de años, aproximadamente, y en este intervalo de tiempo se originó probablemente el ADN satélite de 180 pb exclusivo de esta especie.

5.- El cromosoma B de *E. plorans plorans*, exclusivo de esta subespecie, debe tener una antigüedad inferior a unos 3.29 millones de años, ya que debe ser inferior a la diferenciación de las subespecies de *E. plorans*.

6.- Nuestro análisis de la repetibilidad de las bandas obtenidas para los marcadores ISSR ha mostrado la existencia de bajos niveles de *allelic dropout*, que no afectan a los análisis de la estructura poblacional realizados.

7.- La mayoría de los marcadores ISSR analizados para su modo de transmisión mostraron segregaciones alélicas acordes con la herencia mendeliana, tal como se ha sugerido para otras especies.

8.- Los marcadores ISSR mostraron altos niveles de polimorfismo y una marcada subdivisión poblacional, especialmente entre las dos regiones analizadas incluyendo poblaciones de las costas de Granada y Málaga, y poblaciones de la cabecera de los ríos de la cuenca del Segura. El flujo génico, indicado por el parámetro Nm, era muy elevado, especialmente entre las poblaciones del Segura. Además, en el conjunto de las diez poblaciones, y en las de la costa, se observa aislamiento por distancia, pero no en las poblaciones del Segura. Estos hechos parecen indicar que las poblaciones del Segura han estado sujetas a extinciones y recolonizaciones en el pasado reciente.

9.- La frecuencia del cromosoma B introducido en la población de El Gallego aumentó durante los años '90 pero está disminuyendo desde el año 2000. La reducción significativa de la fecundidad de las hembras portadoras de cromosoma B

así como la tendencia a la eliminación del B durante su transmisión por las hembras y el impacto de factores ambientales, como los asociados a la altitud, podrían estar dificultando la permanencia del B en esta población.

10.- El análisis conjunto de varios componentes de la eficacia biológica ha revelado una ventaja de  $B_{24}$  sobre  $B_2$  en Algarrobo, que podría explicar su incremento en frecuencia en esta población.

11.- Tras originarse en Torrox, el cromosoma  $B_{24}$  se expandió inicialmente hacia poblaciones occidentales, como Algarrobo, y ha llegado más recientemente a poblaciones orientales como Nerja, la más cercana, donde la frecuencia parece estar aumentando, y Tetuán y Maro, más alejadas, donde la presencia de  $B_{24}$  es todavía esporádica.

12.- De los 97 marcadores ISSRs analizados, 12 han mostrado asociación significativa con la presencia de cromosomas B, aunque estos marcadores parecen estar presentes también en los cromosomas A, tal como sería de esperar para un cromosoma B de origen intraespecífico. La existencia de marcadores ISSRs compartidos por el B y los As puede resultar de gran utilidad para investigar el origen y diferenciación de los cromosomas B.

## 8 (II). Conclusions

---





1.- Out of the two mitochondrial genes employed, *Nad5* better resolved phylogenetic relationships among *E. plorans* and other Eyprepocnemidinae species, by including the two subspecies analyzed, *E. plorans plorans* and *E. plorans meridionalis*, in a common cluster, in consistency with the presence of the 180 bp satellite DNA specific to *E. plorans*. The *COI* gene, however, grouped *E. plorans meridionalis* with *E. unicolor* and *Shirakiacris shirakii*, two species lacking this satellite DNA.

2.- The observed levels of DNA sequence divergence for *Nad5* between the Eastern populations in Greece and Armenia, and Western populations in the Iberian Peninsula and Morocco, suggest a divergence time for these populations between 270,000 and one million years.

3.- The haplotype networks for *COI* and *Nad5* suggest the existence of a hypothetical ancestral taxon, probably located in Central Africa, which evolved into *E. plorans meridionalis* towards the south and into *E. plorans plorans* towards the north via two routes, one to the east reaching Greece and Armenia and another to the west by Morocco and the Iberian Peninsula or else through the Strait of Sicily.

4.- *Eyprepocnemis plorans* was phylogenetically differentiated from the other Eyprepocnemidinae about 3 to 4 million years ago, and in this time interval probably arose the 180 bp satellite DNA which is unique to this species.

5.- The B chromosome system in *E. plorans plorans* is unique to this subspecies, so that it should not be older than about 3.29 million years, which is the time when the *E. plorans* subspecies differentiated.

6.- Our analysis of the repeatability of the bands obtained for the ISSR markers showed the presence of low levels of allelic dropout, but this did not affect significantly the population structure analyses performed.

7.- Most ISSR markers analyzed for their mode of transmission showed allele segregation consistent with Mendelian inheritance, as has been suggested for other species.

8.- The ISSR markers showed high levels of polymorphism and marked population subdivision, especially between the two regions examined, one including coastal localities in the Granada and Malaga provinces, and the other including populations at the headwaters of the Segura river basin. Gene flow, as indicated by the Nm parameter was high, especially among Segura populations. In addition, in all ten populations and those from the coast, but not in Segura populations, there was isolation by distance. These facts suggest that Segura populations have been subjected to extinction and recolonization processes in the recent past.

9.- The frequency of the B chromosome artificially introduced in El Gallego increased during the '90s, but has declined from 2000 onwards. The significant fecundity reduction in B-carrying females, the tendency to B chromosome elimination during female transmission, and the impact of environmental factors,

such as those associated with altitude, might be hindering B chromosome invasion in this population.

10.- The combined analysis of several fitness components revealed an advantage of  $B_{24}$  over  $B_2$  in Algarrobo, which could explain its increase in frequency in this population.

11.- After its origin in Torrox, the  $B_{24}$  chromosome spread towards Western populations like Algarrobo, and more recently it has reached Eastern localities like Nerja, the nearest one, where the frequency appears to be increasing, and Tetuan and Maro, two farthest localities, where the presence of  $B_{24}$  is still sporadic.

12.- Out of the 97 ISSRs markers analyzed, 12 showed significant association with the presence of B chromosomes, but these markers appear to be also present in A chromosomes, as expected for a B chromosome of intraspecific origin. ISSRs markers shared by A and B chromosomes can be very useful to investigate the origin and differentiation of B chromosomes.

## 9. Bibliografía

---





- Aikhionbare FO & Mayo ZB (2000). Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Biomolecular Engineering* 16: 199–205.
- Albani MC, Batten NH & Wilkinson MJ (2004). The development of ISSR-derived SCAR markers around the *Seasonal Flowering Locus (SFL)* in *Fragaria vesca*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 571-579.
- Albre J, Gers C & Legal L (2008). Molecular phylogeny of the *Erebia tyndarus* (Lepidoptera, Rhopalocera, Nymphalidae, Satyrinae) species group combining *CoxII* and *ND5* mitochondrial genes: A case study of a recent radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 196–210.
- Anducho-Reyes MA, Cognato AI, Hayes JL & Zúñiga G (2008). Phylogeography of the bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 930–940.
- Arcade A, Anselin F, Faivre Rampant P, Lesage MC, Pâques LE & Prat D (2000). Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 299–307.
- Armengol J, Vicent A, León M, Berbegal M, Abad-Campos P & García-Jiménez J (2010). Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Pathology* 59: 179-185.
- Arnaldos MI & Presa JJ (1993). Estudio comparado de la aceptabilidad de distintas plantas cultivadas por *Eyprepocnemis plorans* (Charpentier, 1825) (Orthoptera: Caelifera). *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 19: 49-62.
- Árnason U, Grétarsdóttir S & Widegren B (1992). Mysticete (Baleen Whale) relationships based upon the sequence of the common cetacean DNA satellite. *Molecular Biology and Evolution* 9: 1018-1028.
- Avise JC (1991). Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual Review of Genetics* 25: 45-49.
- Avise JC (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, London.
- Ayonoadu U & Rees H (1971). The effects of B-chromosomes on the nuclear phenotype in root meristems of maize. *Heredity* 27: 365–383.
- Bacci M, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, Vieira LGE & Silva-Pinhati ACO (2009). Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta Fabricius* (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 427–437.
- Bakkali M, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F & Camacho JPM (1999). The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa I. B variants and frequency. *Heredity* 83: 428-434.

- Bakkali M & Camacho JPM (2004). The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: III. Mutation rate of B chromosomes. *Heredity* 92: 428-433.
- Balinsky B (1962). Patterns of animal distribution of the African continent. *Annals of the Cape Province Museum* 2: 299–310.
- Basheva EA, Torgasheva AA, Sakaeva GR, Bidau C & PM Borodin (2010). A- and B-chromosomes pairing and recombination in male meiosis of a silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). *Chromosome Research* 18: 689-696.
- Battaglia E (1964). Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia* 17: 245-299.
- Baverstock PR, Gelder M & Jahnke A (1982). Cytogenetic studies of the Australian rodent, *Uromys caudimaculatus*, a species showing extensive heterochromatin variation. *Chromosoma* 84: 517–533.
- Bell G & Burt A (1990). B chromosomes: germ-line parasites which induce changes in host recombination. *Parasitology* 100: S19–S26.
- Bensasson D, Zhang DX & Hewitt GM (2000). Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 406-415.
- Beukeboom LW (1994). Bewildering Bs: An imprecision of the 1<sup>st</sup> B-chromosome conference. *Heredity* 73: 928-996.
- Bidau CJ (1986). A nucleolar-organizing B chromosome showing segregation-distortion in the grasshopper *Dichroplus pratensis*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 28: 138–148.
- Bidau CJ (1987). Influence of a rare unstable B chromosome on chiasma frequency and non-haploid sperm production in *Dichroplus pratensis* (Melanoplidae, Acrididae). *Genética* 73: 201-210.
- Birchler JA, Chalfoun J & Levin DM (1990). Recombination in the B chromosome of maize to produce a-B-a Chromosomes. *Genetics* 126: 723-733
- Birungi J & Munstermann LE (2002). Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial *ND5* sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*. 95: 125-132.
- Bocak L & Yagi T (2009). Evolution of mimicry patterns in *Metriorrhynchus* (Coleoptera: Lycidae): the history of dispersal and speciation in southeast Asia. *Evolution* 64: 39–52.
- Boeskorov GG, Kartavtseva IV, Zagorodnyuk IV, *et al.* (1995). Nucleolus Organizer Regions and B chromosomes of wood mice (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*). *Genetika* 31: 185–192.
- Bonnet E & Van de Peer Y (2002). Zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical software* 7: 1-12.

- Bornet B & Branchard M (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Bosemark NO (1954). On accessory chromosomes in *Festuca pratensis*. II. Inheritance of the standard type of accessory chromosome. *Hereditas* 40: 425–437.
- Bosemark, NO (1957). Further studies on accessory chromosomes in grasses. *Hereditas* 43: 236-297.
- Bougourd SM & Parker JS (1979). The B chromosome system of *Allium schoenoprasum*. II. Stability, inheritance and phenotypic effects. *Chromosoma* 75: 369–383.
- Bougourd SM, Plowman AB, Ponsford NR, Elias ML *et al.* (1995). The case for unselfish B-chromosomes: evidence from *Allium schoenoprasum*. In: Brandham PE, Bennet MD (eds) *Kew Chromosome Conference IV*: 21-24. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Bouzid W, Lek S, Mace M, Hassine OB, Etienne R, Legal L & Loot G (2008). Genetic diversity of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphylobothriidea) based on analysis of inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Zoological Systematic & Evolutionary Research* 46: 289-296.
- Boyes JW & Van Brink JM (1967). Chromosomes of *Syrphidae* III. Karyotypes of some species in the tribes Milesiini and Myoleptini. *Chromosoma* 22: 417–455.
- Brockhouse C, Bas JAB, Fereday RM & Strauss NA (1989). Supernumerary chromosomes evolution in the *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32: 516-521.
- Brower AVZ (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial-DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 6491-6495.
- Brower AVZ & DeSalle R (1998). Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology* 7: 73-82.
- Bucci G & Menozzi P (1990). Segregation analysis of random amplified DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. *Mol Ecol* 2: 227-232.
- Buchan JC, Archie EA, Van Horn RC, Moss CJ & Alberts SC (2005). Locus effects and source of errors in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes* 5: 680-683.
- Buckley TR, Marske KA & Attanayake D (2009). Identifying glacial refugia in a geographic parthenogen using palaeoclimate modelling and phylogeography: the New Zealand stick insect *Argosarchus horridus* (White). *Molecular Ecology* 18: 4650–4663.

- Bugrov A, Novikova O, Mayorov V, Adkison L & Blinow A (2006). Molecular phylogeny of Palaearctic genera of Gomphocerinae grasshoppers (Orthoptera, Acrididae). *Systematic Entomology* 31: 362–368.
- Burt A & Trivers R (1998) Selfish DNA and breeding system in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B* 265: 141-146.
- Cabrero J & Camacho JPM (1987). Population cytogenetics of *Chorthippus vagans*. II. Reduced meiotic transmission but increased fertilization by males possessing a supernumerary chromosome. *Genome* 29: 285–291.
- Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A & Camacho JPM (1997). Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research* 5: 194-198.
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M & Camacho JPM (1999). Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435-439.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM & López-León MD (2003a). Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 11: 375-381.
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F & Camacho JPM (2003b). Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112: 207-211.
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska S'liwa E, López-León MD, Perfectti F & Camacho JPM (2003c). Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity* 90, 377–381.
- Cabrero J, Manrique-Poyato MI & Camacho JPM (2006). Detection of B chromosomes in interphase hemolymph nuclei from living specimens of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 114: 66-69.
- Camacho JPM, Carballo AR & Cabrero J (1980). The B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* (Charpentier). *Chromosoma* 80: 163-166.
- Camacho JPM, Díaz de la Guardia R & Ruiz-Rejón M (1981). Polysomy and supernumerary isochromosomes in the grasshopper *Omocestus bolivari* (Chopard). *Heredity* 46: 123–126.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, Pardo MC & Cabrero J (1997). Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *American Naturalist* 149: 1030–1050.
- Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW (2000). B chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 355: 163–178.

- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM, Cabrero J, López-León MD, Aranda I, Martín-Alganza A & Perfectti F (2002). Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proceedings of the Royal Society B* 269: 2173–2177.
- Camacho JPM, Perfectti F, Teruel M, López-León MD & Cabrero J (2004). The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 325–331.
- Camacho JPM (2005). B chromosomes. In: *The evolution of the genome* (Gregory TR, ed. Elsevier, San Diego): 223–286.
- Cano J, Rezusta A, Solé M, Gil J, Rubio M, Revillo M & Guarro J (2005). Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporium canis* strains. *Journal of Dermatological Science* 39: 17–21.
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, Costa-Nunes P, Caperta A, Morais-Cecílio L, Jones RN, Viegas W & Houben A (2007). Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *Plant Cell* 19: 1738–1749.
- Carchilan M, Kumbe K, Mikolajewski S & Houben A (2009). Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma* 118: 607–616.
- Carlson W (1969). Factors affecting preferential fertilization in maize. *Genetics* 62: 543–554.
- Cebriá A, Navarro ML & Puertas MJ (1994). Genetic control of B chromosome transmission in *Aegilops speltoides* (Poaceae). *American Journal of Botany* 81: 1502–1507.
- Chandra SBC, Vlk JL & Kapatral V (2006). Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synteny. *African Journal of Biotechnology* 5: 1308–1318.
- Chapco W & Litzenberger G (2002). A molecular phylogenetic analysis of the grasshopper genus *Melanoplus* Stål (Orthoptera: Acrididae) -an update. *Journal of Orthoptera Research* 11: 1–9.
- Chapco W (2006). A note on the phylogenetic position of *Duartettix montanus* within the subfamily Melanoplinae. *Journal of Orthoptera Research* 15: 59–63.
- Cheng YM & Lin BY (2003). Cloning and characterization of maize chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics* 164: 299–310.
- Clare EL, Ker KCR, von Königslöw TE, Wilson JJ & Hebert PDN (2008). Diagnosing mitochondrial DNA diversity: applications of a sentinel gene approach. *Journal of Molecular Evolution* 66: 362–367.
- Clary DO & Wolstenholme DR (1985). The mitochondrial molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 22: 252–271.
- Clement M, Posada D & Crandal KA (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.

- Clemente M, Garma C, García de Sola B & Henriques-Gil N (2001). Steep variation in mitochondrial DNA and B chromosomes among natural populations of *Eyprepocnemis plorans* (Acrididae). *Hereditas* 134: 135-140.
- Coeur d'acier A, Joussetin E, Martin JF & Raplus JY (2007). Phylogeny of the Genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 598–611.
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, Kuo A, Wasmann CC *et al.* (2009). The genome of *Naectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genetics* 5: e1000618.
- Coleman M, Liston A, Kadereit JW & Abbott RJ (2003). Repeat intercontinental dispersal and Pleistocene speciation in disjunct Mediterranean and desert *Senecio* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 90: 1446–1454.
- Contreras D & Chapco W (2006). Molecular phylogenetic evidence for multiple dispersal events in gomphocerine grasshoppers. *Journal of Orthoptera Research* 15: 91-98.
- Covert SF (1998). Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Current Genetics* 33: 311–319.
- Crow JF & Aoki K (1984). Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 6073–77.
- Crozier RH & Crozier YC (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133: 97-117.
- Cuadrado A, Acevedo R, Moreno Díaz de la Espina S, Jouve N & de la Torre C (2004). Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. *Journal of Experimental Botany* 55: 847-854.
- Culley TM & Wolfe AD (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR markers. *Heredity* 86: 545-556.
- Darlington CD & Upcott MB (1941). The activity of inert chromosomes in *Zea mays*. *Journal of Genetics* 41: 275–296.
- Darlington CD (1958). *Evolution of Genetic Systems*. Oliver and Boyd, Edinburgh and London.
- Datwyler SL & Wolfe AD (2004). Phylogenetic Relationships and morphological evolution in *Penstemon* subg. *Dasanthera* (Veronicaceae). *Systematic Botany* 29: 165-176.
- Dawkins R (1976). *The Selfish Gene*. Oxford: Oxford University Press.
- Dayteg C, Rasmussen M, Tuveesson S, Merker A & Jahoor A (2008). Development of an ISSR-derived PCR marker linked to nematode resistance (*Ha2*) in spring barley. *Plant Breeding* 127: 24-27.
- De León JH & Jones WA (2005). Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the

- glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulate*. *Journal of Insect Science* 5: 1-9.
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK & Gill BS (2002). Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* 111: 332-340.
- Dherawattana A & Sadanaga K (1973). Cytogenetics of a crown rust-resistant hexaploid oat with 42-1-2 fragment chromosomes. *Crop Science* 13: 591-594.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Dimitri P, Arca B, Berghella L & Mei E (1997). High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 8052-8057.
- Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G & Biamonti G (2009). Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118: 419-435.
- Dirsh, VM (1958). Revision of the genus *Eyprepocnemis* Fieber, 1893 (Orthoptera: Acridoidea). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London B* 27: 33-45.
- Drummond AJ & Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Duret L (2002). Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Current Opinion in Genetics & Development* 12: 640-649.
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Evans GM, Rees H, Snell CL & Sun S (1972). The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle. *Chromosomes Today* 3: 24-31.
- Excoffier L & Lischer HEL (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Faccoli M, Piscedda A, Salvato P, Simonato M, Masutti L & Battisti A (2005). Genetic structure and phylogeography of pine shoot beetle populations (*Tomicus destruens* and *T. piniperda*, Coleoptera Scolytidae) in Italy. *Annals of Forest Science* 62: 361-368.
- Falush D, Stephens M & Pritchard JK (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574-578.
- Fang DQ & Roose ML (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-417.

- Felsenstein J (1989). PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Fernández ME, Figueiras AM & Benito C (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 845-851.
- Ferraro M, Buglia GL & Romano F (2001). Involvement of histone H4 acetylation in the epigenetic inheritance of different activity states of maternally and paternally derived genomes in the mealybug *Planococcus citri*. *Chromosoma* 110: 93-101.
- Fontana PG & Vickery VR (1973). Segregation-distortion in the B-chromosome system of *Tettigidea lateralis* (Say) (Orthoptera: Tetrigidae). *Chromosoma* 43: 75-100.
- Fontdevila A & Moya A (1999). *Introducción a la genética de poblaciones*. Ed. Síntesis, Madrid.
- Fox DP, Hewitt GM & Hall DJ (1974). DNA replication and RNA transcription of euchromatic and heterochromatic chromosome regions during grasshopper meiosis. *Chromosoma* 45: 43-62.
- Friebe B (1989). Nucleolar activity of B-chromosomes in *Allium cernuum* (Alliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 163: 87-92.
- Fries M, Chapco W & Contreras D (2007). A molecular phylogenetic analysis of the Oedipodinae and their intercontinental relationships. *Journal of Orthoptera Research* 16: 115-225.
- Frohlich DR, Torres-Jerez I, Bedford ID, Markham PG & Brown JK (1999). A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 1683-1691.
- Fröst S & Ising G (1964). Cytogenetics of fragment chromosomes in barley. *Hereditas* 52: 176-180.
- Fröst S (1958). Studies of the genetical effects of accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. *Hereditas* 44: 112-122.
- Fröst S (1969). The inheritance of accessory chromosomes in plants, especially in *Ranunculus acris* and *Phleum nodosum*. *Hereditas* 61: 317-326.
- Gagneaux P, Boesch C & Woodruff DS (1997). Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* 6: 861-868.
- Gao L, Chen WQ & Liu TG (2010). Development of a SCAR marker by inter-simple repeat for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Folia microbiológica* 55: 258-264.

- Garesse R (1988). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* 118: 649-663.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejón C & Ruiz Rejón M (1995). The EcoRI centromeric satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) contains a sequence motive common to other vertebrate centromeric satellite-DNA. *Cytogenetics and Cell Genetics* 71: 345–351.
- Gaubert F, Godoy JA, del Cerro I & Palomares F (2009). Early phases of a successful invasion: mitochondrial phylogeography of the common genet (*Genetta genetta*) within the Mediterranean Basin. *Biological Invasions* 11:523–546.
- Geiser DM, Arnold ML & Timberlake W (1996). Wild chromosomal variants in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*. 29: 293-300.
- Gerber AS, Loggins R, Kumar S & Dowling TE (2001). Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes?. *Annual Review of Genetics* 35: 539–566.
- Gerlach WL & Bedbrook JR (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research*: 7: 1869- 1885.
- Gerloff U, Schlötterer C, Rassamann K, Rambold I, Hohmann G, Fruth B & Tautz D (1995). Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology* 4: 515-518.
- Goldblatt P (1978). An analysis of the flora of southern Africa: its characteristics, relationships, and origins. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 369–463.
- Gonçalves I, Duret L & Mouchiroud D (2000). Nature and structure of human genes that generate retropseudogenes. *Genome Research* 10: 672-678.
- González-Sánchez M, González-González E, Molina, F, Chiavarino AM, Rosato M & Puertas MJ (2003). One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90: 122-129.
- González-Sánchez M, González-García M, Vega JM, Rosato M, Cuacos M & Puertas MJ (2007). Meiotic loss of the B chromosome of maize is influenced by the B univalent co-orientation and the TR-1 knob constitution of the A chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 119: 282-290.
- Goosens B, Waits LP & Taberlet P (1998). Plucked hair samples as a sources of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology* 7, 1237-1241.
- Gorlov IP & Tsurusaki N (2000). Analysis of the phenotypic effects of B chromosomes in a natural population of *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Heredity* 84: 209–217.
- Gosálvez J & López-Fernández C (1984). Elimination of an introduced B-chromosome from a wild population of *Arcyptera fusca* (Orthoptera). *Heredity* 53: 453-456.

- Gourmet C & Rayburn AL (1996). Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. *Heredity* 77: 240–244.
- Green DM (1988). Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma* 97: 55-70.
- Green DM (1990). Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* 33: 818–824.
- Green DM, Zeyl CW & Sharbel TF (1993). The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosome in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 417-441.
- Guindon S & Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P & Gascuel O (2005). PhyML Online a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue): W557-W559.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J & Owen JP (1994). Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 571-579.
- Gutknecht J, Sperlich D & Bachmann L (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma* 103: 539-544.
- Haaf T (2001). The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo. *Chromosome Research* 9: 263-271.
- Håkansson A (1945). Überzählige Chromosomen in einer rasse von *Godetia nutans* Hiorth. *Botaniska Notiser* 2: 1–19.
- Håkansson A (1948). Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. *Hereditas* 34: 35–59.
- Håkansson, A (1954). Transmission of accessory chromosomes in *Poa alpine*. *Hereditas* 40: 523-526.
- Hall, TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Han F, Lamb JC, Yu W, Gao Z & Birchler JA (2007). Centromere function and nondisjunction are independent components of the maize B chromosome accumulation mechanism. *Plant Cell* 19: 524-533.
- Harrison RG (1989). Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 6-11.
- Hartley SE & Davidson WS (1994a). Characterization and distribution of genomic repeat sequences from Arctic char (*Salvelinus alpinus*), in Beamont AR (ed):

- Genetics and Evolution of Aquatic Organisms, pp 271–279 (Chapman and Hall, London).
- Hartley SE & Davidson WS (1994b). Distribution of satellite DNA sequences isolated from Arctic char, *Salvelinus alpinus*, in the genus *Salvelinus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 51: 277–283.
- Harvey AW & Hewitt GM (1979). B-chromosomes slow development in a grasshopper. Heredity 42: 397–401.
- He L, Wang S, Miao X, Wu H & Huang Y (2007). Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. Forensic Science International 168: 148–153.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH & Hallwachs W (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 101: 14812–14817.
- Heikkinen E, Launonen V, Müller E & Bachmann L (1995). The pvB370 BamHI satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. Journal of Molecular Evolution 41: 604–614.
- Henriques-Gil N & Arana P (1990). Origin and substitution of B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Evolution 44: 747–753.
- Henriques-Gil N, Santos JL & Arana P (1984). Evolution of a complex polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Chromosoma 89: 290–293.
- Hernández F & Presa JJ (1984). Sobre la biología de *Eyprepocnemis plorans* (Charpentier, 1825) (Orthoptera: Acrididae), en la huerta de Murcia (S.E. España). Boletín del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica 10: 245–249.
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J, Shaw MW & Camacho JPM (1996). Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 76: 633–639.
- Hewitt GM & East TM (1978). Effects of B chromosomes on development in grasshopper embryos. Heredity 41: 347–356.
- Hewitt GM & John B (1967). The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) III. The statistics. Chromosoma 21: 140–162.
- Hewitt GM (1973a). The integration of supernumerary chromosomes into the orthopteran genome. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 38: 183–194.
- Hewitt GM (1973b). Variable transmission rates of a B chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.). Chromosoma 40: 83–106.
- Hewitt GM (1976). Meiotic drive for B chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). Chromosoma 56: 381–391.

- Hewitt GM (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- Hewitt GM (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- Hewitt GM & Ruscoe C (1971). Changes in microclimate correlated with a cline for B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Animal Ecology* 40: 753-765.
- Hiremath SC & Murthy HN (1986). The structure, stability and meiotic behaviour of B chromosomes in *Guizotia scabra* (vis.) Chiov. Ssp. *Scabra* (Compositae). *Caryologia* 39: 397-402.
- Hoffman JL & Amos W (2005). Microsatellite genotyping errors detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14: 599-612.
- Holmes DS & Bougourd SM (1989). B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum* L. Natural populations. *Heredity* 63: 83-87.
- Holsinger KE & Lewis PO (2003). Hickory: a package for the analysis of population bgenetic data. Version 1.1. Distributed by the authors, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs.
- Houben A & Schubert I (2007). Engineered Plant Minichromosomes: A Resurrection of B chromosomes?. *The Plant Cell* 19, 2323-2327.
- Hundsdoerfer AK & Wink M (2006). Incongruence of morphology and genetic markers in *Hyles tithymali* (Lepidoptera: Sphingidae) from the Canary Islands. *Journal of Zoological Systematic & Evolutionary Research*: 44: 316-322.
- Hundsdoerfer AK, Kitching I & Wink M (2005). The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): Molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints. *Organisms Diversity & Evolution* 5: 173-198.
- Huo H, Conner JA & Ozias-Akins P (2009). Genetic mapping of the apospory-specific genomic region in *Pennisetum squamulatum* using retrotransposon-based molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 199-212.
- Hurst LD, Atlan A & Bengtson B (1996). Genetic conflicts. *The Quartley Review of biology* 71: 317-364.
- Ishak B, Jaafar H, Maetz JL & Rumpler Y (1991). Absence of transcriptional activity of the B-chromosome of *Apodemus peninsulae* during pachytene. *Chromosoma* 100: 278-281.
- Jackson RC & Newmark KP (1960). Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science* 132: 1316-1317.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz-Rejón M & Ruiz-Rejón C (1995). Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis Capillaris*. *Chromosoma* 104: 113-120.

- Jamilena M, Ruiz-Rejón C & Ruiz-Rejón M (1994). A molecular análisis of the origin of the *Crepis Capillaris* B chromosome. *Journal of Cell Science* 107: 703-708.
- Jeffery KJ, Keller LF, Arcese P & Bruford MW (2001) The development of microsatellite loci in the song sparrow, *Melospiza melodia* (Aves) and genotyping errors associated with quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 1: 11-13.
- Jiménez MM, Romera F, Gallego A & Puertas MJ (1995). Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. II. 0B x 2B crosses. *Heredity* 74: 518–523.
- Jin W, Lamb JC, Vega JM, Dawe RK, Birchler JA & Jiang J (2005). Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere. *Plant Cell* 17: 1412–1423.
- John B & Hewitt GM (1969) Parallel polymorphism for supernumerary segments in *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt). *Chromosoma* 28: 73-84.
- John B & Lewis KR (1965). Genetic speciation in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 16: 308-344.
- John B & Hewitt GM (1965). The B chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.), I. The mechanics. *Chromosoma* 16: 548–578.
- John UP, Leach CR & Timmins JN (1991). A sequence specific to B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Genome* 34: 739-44.
- Johnson PCD & Haydon DT (2007). Maximum-likelihood estimation of allelic dropout and false allele error rates for microsatellites genotypes in the absence of reference data. *Genetics* 75: 827-842.
- Jones R & Rees H (1967). Genotypic control of chromosome behaviour in rye. XI. The influence of B chromosomes on meiosis. *Heredity* 22: 333-347.
- Jones RN & Houben A (2005). B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 838-849.
- Jones RN & Puertas MJ (1993). The B chromosome of rye (*Secale cereale* L.). In *Frontiers in plant science research* (ed. Dhir KK, Sareen TS). Delhi: Bhagwati Enterprises. pp. 81-112.
- Jones RN & Rees H (1982). B chromosome. New York: Academic Press.
- Jones RN (1985). Are B chromosomes selfish? In *The evolution of genome size* (ed. T. Cavalier-Smith), pp. 397-425. London: Wiley.
- Jones RN (1995). Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. *New Phytologist* 131: 411-434.
- Jones RN, González-Sánchez M, González-García M, Vega JM & Puertas MJ (2008). Chromosomes with a life of their own. *Cytogenetic and Genome Research* 120: 265–280.
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK & Brar DS (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.

- Jurgens N (1997). Floristic biodiversity and history of African arid regions. *Biodiversity and Conservation* 6: 495–514.
- Kantety RV, Zeng X Bennetzen JL & Zher BE (1995). Assesment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using intersimple sequences repeated (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1: 365-373.
- Kar PK, Vijayan K, Mohandas TP, Nair CV, Saratchandra B & Thangavelu K (2005). Genetic variability and genetic structure of wild and semi-domestic populations of tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) ecorace Daba as revealed through ISSR markers. *Genetica* 125:173–183
- Karpen GH, Le M-H & Le H (1996). Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science* 273: 118-122.
- Kato Y & Yagi T (2004). Biogeography of the subspecies of *Parides (Byasa) alcinous* (Lepidoptera: Papilionidae) based on a phylogenetic analysis of mitochondrial *ND5* sequences. *Systematic Entomology* 29: 1-9.
- Kayano H (1971). Accumulation of B chromosomes in the germ line of the *Locusta migratoria*. *Heredity* 74: 119-123.
- Kenton A (1991). Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). *Chromosoma* 100: 467–478.
- Kim C-G, Zhou H-Z, Imura Y, Tominaga O, Su Z-H & Osawa S (2000). Pattern of morphological diversification in the *Leptocarabus* Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae) as deduced from mitochondrial *ND5* gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 17: 137-145.
- Kirk D & Jones RN (1970). Nuclear genetic activity in B-chromosome rye, in terms of the quantitative interrelationships between nuclear protein, nuclear RNA and histone. *Chromosoma* 31: 241–254.
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K & Ogihara Y (1998). Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*: 96: 37-45.
- Krzywinski J, Wilkerson RC & Besansky N (2001a). Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 479–487.
- Krzywinski J, Wilkerson RC & Besansky N (2001b). Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. *Systematics Biology* 50: 540–556.
- Kumar S, Dudley J, Nei M & Tamura K (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Lamb JC, Riddle NC, Cheng YM, Theuri J & Birchler JA (2007). Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Research* 15: 383–398.

- Langdon T, Seago C, Jones RN, Ougham H, Thomas H, Forster JW & Jenkins G (2000). De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics* 154: 869-884.
- Laridondo R, Rodrigues D, Pavan V & Moreira O (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco river basin (MG Brazil). *Micron* 40: 552-559.
- Leach CR, Houben A, Field B, Pistrick K, Demidov D & Timmis JN (2005). Molecular evidence for transcription of B chromosome ribosomal RNA genes in *Crepis capillaris*. *Genetics* 171: 269–278.
- Leclair S, Ansan-Melayah D, Rouxel T & Balesdent M (1996). Meiotic behavior of the minichromosome in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* 30: 541-548.
- Leitão A, Chaves R, Joaquim S, Matias D, Ruano F & Guedes-Pinto H (2009). Supernumerary chromosomes on Southern European population of the cockle *Cerastoderma edule*: Consequence of environmental pollution?. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79: 152-156.
- Lercher MJ, Urrutia AO & Hurst LD (2002). Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nature genetics* 31: 180-183.
- Lepinasse R, De Paepe R & Koulou A (1987). Induction of B chromosome formation in androgenetic lines of *Nicotiana glauca*. *Caryologia* 40: 327-338.
- Levin DA, Palestis BG, Jones RN & Trivers R (2005) Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution* 59: 962-969.
- Li W-H (1997). *Molecular Evolution*. 1ª ed. Ed. Sinauer Associates, Inc., Pub. Sunderland, USA.
- Lia V V, Confalonieri V A & Poggio L (2007). B chromosome polymorphism in maize landraces: adaptive vs. demographic hypothesis of clinal variations. *Genetics* 177: 895-904
- Librado P & Rozas J (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lica LM, Narayanswami S & Hamkalo BA (1986). Mouse satellite DNA, centromere structure and sister chromatid pairing. *Journal of Cell Biology* 103: 1145-1151.
- Lica LM, Narayanswami S & Hamkalo Ba (1986). Mouse satellite DNA, centromere structure and sister chromatid pairing. *Journal of Cell Biology* 103: 1145-1151.
- Litzenberger G & Chapco W (2001). Molecular Phylogeny of Selected Eurasian Podismine Grasshopper (Orthoptera: Acrididae). *Annals of the Entomological Society of America* 94: 505-511.
- Litzenberger G & Chapco W (2003). The North American Melanoplinae (Orthoptera: Acrididae): A molecular phylogenetic study of their origins and taxonomic relationships. *Annals of the Entomological Society of America* 96: 491-497.

- Liu A & Wang J (2006). Genomic evolution of *Brassica* allopolyploids revealed by ISSR marker. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 603–611.
- Liu D, Trumble JT & Stouthamer R (2006). Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 118: 177-183.
- Loaiza JR, Scott ME, Bermingham E, Rovira J & Conn JE (2010). Evidence for pleistocene population divergence and expansion of *Anopheles albimanus* in southern Central America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 156–164
- López-Fernández C & Gosálvez J (1981). Differential staining of a heterochromatic zone in *Arcyptera fusca* (Orthoptera). *Experientia* 37: 240.
- López-Fernández C & Gosálvez J (1983a). The chromosome system in three species of the genus *Arcyptera* (Orthoptera: Acrididae). II. Unstable B-chromosomes in *Arcyptera fusca*. *Genetica* 62: 41-46.
- López-Fernández C, García de la Vega C & Gosálvez J (1983b). Spontaneous supernumerary isochromosomes in the grasshopper *Arcyptera fusca* (Pall). *Cytobios*, 37: 107-111.
- López-Fernández C, Mezzanotte R & Gosálvez J (1992). Autosomal, sex and B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera) viewed with restriction endonuclease *in situ* digestion. *Heredity* 68: 365-372.
- López-Fernández C, Pradillo E, Zabal-Aguirre M, Fernández JL, García de la Vega C & Gosálvez J (2004). Telomeric and interstitial telomeric-like DNA sequences in Orthoptera genomes. *Genome* 47: 757-63.
- López-León MD, Cabrero J & Camacho JPM (1991). Meiotic drive against an autosomal supernumerary segment promoted by the presence of a B chromosome in females of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 100: 282-287.
- López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM, Cano MI & Santos JL (1992a). A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. *Evolution* 46: 529-539.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J & Camacho JPM (1992b). Random mating and absence of sexual selection for B chromosomes in two natural populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 69: 558-561.
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov NB & Camacho JPM (2008). Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western population of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 121: 260-265.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM & Camacho JPM (1994a). Possible origin of a B chromosome deduced from its

- DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2: 87-92.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J & Camacho JPM (1994b). Dynamics of sperm storage in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Physiological Entomology* 19:46-50.
- López-León MD, Pardo MC, Cabrero J, Viseras E, Camacho JPM & Santos JL (1993). Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 71: 352-362.
- López-León MD, Vázquez P, Hewitt GM & Camacho JPM (1995). Cloning and sequence analysis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75: 370-375.
- Lu Z, Wang Y, Peng Y, Korpelainen H & Li C (2006). Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehder populations in southwestern China revealed by ISSR markers. *Plant Science* 170: 407-412.
- Lunt DH, Ibrahim KM & Hewitt GM (1998). mtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity* 80: 633-641.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM & Hewitt GM (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153-165.
- Luque C, Legal L, Staudter H, Gers C & Wink M (2002). Brief report ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* 136: 251-253.
- Maia RT, Scarpassa VM, Maciel-Litaiff LH & Tadei WP (2009). Reduced levels of genetic variation in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazonas State, Brazil, based on analysis of the mitochondrial DNA *ND5* gene. *Genetics and Molecular Research* 8: 998-1007.
- Mallet J (2001). Gene flow. In: Woiwod IP, Reynolds DR & Thomas CD (Eds.) *Insect Movement: Mechanisms and Consequences*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 337-360.
- Marczewski W, Strzelczyk-Zyta D, Henning J, Witek K & Gebhardt C (2006). Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to potato virus. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1232-1238.
- Maroja LS, Bogdanowicz SM, Wallin KF, Raffa KF & Harrison RG (2007). Phylogeography of spruce beetles (*Dendroctonus rufipennis* Kirby) (Curculionidae: Scolytinae) in North America. *Molecular Ecology* 16: 2560-2573.
- Martin S, Arana P & Henriques-Gil N (1996). The effect of B chromosomes on mating success of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetica* 97: 197-203
- Martinsen L, Venanzetti F & Bachmann L (2009). Phylogeography and mitochondrial DNA divergence in *Dolichopoda* cave crickets (Orthoptera, Rhahidophoridae). *Hereditas* 146: 33-45.

- McAllister BF & Werren JH (1997). Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106: 243–253.
- McIlvaine, TC (1921). A Buffer solution for colorimetric comparison. *The Journal of Biological Chemistry*. *Journal of Biological Chemistry* 49: 183-186.
- McMeniman CJ & Barker SC (2006). Transmission ratio distortion in the human body louse, *Pediculus humanus* (Insecta: Phthiraptera). *Heredity* 96: 63-68.
- McVean GT (1995). Fractious chromosomes-hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *BioEssay* 17: 579-582.
- Mende M, Biström O, Meichssner E & Kölsch G (2010). The aquatic leaf beetle *Macrolea mutica* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe: Population structure, postglacial colonization and the signature of passive dispersal. *European Journal of Entomology* 107: 101–113.
- Meredith R (1969). A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian tests. *Chromosoma* 26: 254-258.
- Mestriner CA, Galetti PM, Valentini, SR, Ruiz, IRG, Abel, LDS, Moreira-Filho O & Camacho JPM (2000). Structural and functional evidence that B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85:1-9.
- Miao VP, Covert SF & VanEtten HD (1991a). A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ('B') chromosome. *Science* 254: 1773–1776.
- Miao VP, Matthews DE & VanEtten HD (1991b). Identification and chromosomal locations of a family of *cytochrome P-450* genes for pisatin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. *Molecular & General Genetics* 226: 214–223.
- Miller CR, Joyce P & Waits LP (2002). Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160: 357-366.
- Mills D & McCluskey K (1990). Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Molecular Plant Microbe Interactions* 3: 351-357.
- Mitchell SE, Cockburn AF & Seawright JA (1993). The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and genome organization. *Genome* 36: 1058-1073.
- Morcillo G, Gorab E, Tanguay RM & Díez JL (1997). Specific intranucleolar distribution of Hsp70 during heat shock in paquitene cells. *Experimental Cell Research* 236: 361-370.
- Morgan K, O'Loughlin SM, Mun-Yik F, Linton Y-M, Somboon P, Min S, Than Htun P, Nambanya S, Weerasinghe I, Sochantha T, Prakash A & Walton C (2009). Molecular phylogenetics and biogeography of the Neocellia series of *Anopheles* mosquitoes in the Oriental Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 588–601.
- Morilha Neó D, Moreira Filho O & Camacho JPM (2000). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85: 136-141.

- Moritz C, Dowling TE & Brown WM (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292.
- Morton BR (1993). Chloroplast DNA codon use: Evidence for selection at the *psb A* locus based on tRNA availability. *Journal of Molecular Evolution* 37: 273-280.
- Müntzing A (1948). Accessory chromosomes in *Poa alpina*. *Heredity* 2: 49–61.
- Müntzing A (1954). Cytogenetics of accessory chromosomes (B-chromosomes). *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress of Genetics. Caryologia* S6: 282–301.
- Muñoz E, Perfectti F, Martín-Alganza A & Camacho JPM (1998). Parallel effect of a B chromosome and a mite decreasing female fitness in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Proceedings of the Royal Society B* 265: 1903-1909.
- Nadivi W, Arnheim N & Waterman MS (1992). A multiple tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *The American Journal of Human Genetics* 50: 347-359.
- Nagaoka T & Ogihara Y (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in what for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- Nagaraju J, Reddy KD, Nagaraja GM & Sethuraman BN (2001). Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity* 86: 588-597.
- Narita S, Nomura M, Kato Y, Yata O & Kageyama D (2007). Molecular phylogeography of two sibling species of *Eurema* butterflies. *Genetica* 131: 241-253.
- Niwa K & Sakamoto S (1995). Origin of B-chromosomes in cultivated rye. *Genome* 38: 307–312.
- Noonan BP & Gaucher P (2005). Phylogeography and demography of Guianan harlequin toads (*Atelopus*): diversification within a refuge. *Molecular Ecology* 14: 3017–3031.
- Norgate M, Chamings J, Pavlova A, Bull JK, Murray ND, *et al.* (2009) Mitochondrial DNA indicates late Pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging oodell in environmental change biology. *Plos One* 4: e7950.
- Nur U & Brett BLH (1985). Genotypes suppressing meiotic drive of a B chromosome in the mealy bug *Pseudococcus obscurus*. *Genetics* 110: 73–92.
- Nur U & Brett BLH (1987). Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis* (*obscurus*). *Genetics* 115: 499–510.
- Nur U & Brett BLH (1988). Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis*. *Chromosoma* 96: 205–212.

- Nur U (1962). A supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in the lecanoid genetic system. *Chromosoma* 13: 249–271.
- Nur U (1963). A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma* 14: 407–422.
- Nur U (1966). The effect of supernumerary chromosomes on the development of mealy bugs. *Genetics* 54: 1239–1249.
- Nur U (1969). Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma* 27: 1–19.
- Nur U (1977). Maintenance of a “parasitic” B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Genetics* 87: 499–512.
- Ogihara R (1968). B-chromosomes of *Libum japonicuni* Thunb. Frequency of the ordinary type in natural populations and its meiotic behaviour at AI in PMC. *La Kromosomo* 72-73:2346-2355.
- Oliver JL, Posse F, Martínez-Zapater JM, Enriquez AM & Ruiz-Rejón M (1982). B chromosomes and E1 isoenzyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis*. *Chromosoma* 85: 399-403.
- Omoto K, Yonezawa T & Shinkawa T (2009). Molecular systematics and evolution of the recently discovered “Parnassian” butterfly (*Parnassius davydovi* Churkin, 2006) and its allied species (Lepidoptera, Papilionidae). *Gene* 441: 80–88.
- Östergren G (1945). Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Botaniska Notiser* 2: 157-163.
- Oyama RX, Volz SM & Renner SS (2009). A sex-linked SCAR marker in *Bryonia dioica* (Cucurbitaceae), a dioecious species with XY sex-determination and homomorphic sex chromosomes. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 214–224.
- Palestis BG, Burt A, Jones RN & Trivers R (2004) B chromosomes are more frequent in mammals with acrocentric karyotypes: support for the theory of centromeric drive. *Proceedings of the Royal Society (Suppl)*. 271: S22-S24.
- Paliwal RL & Hyde BB (1959). The association of a single B chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *American Journal of Botany* 46: 460–466.
- Palumbi SR (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13: S146-S158.
- Pardo MC, López-León MD, Hewitt GM & Camacho JPM (1995). Female fitness is increased by frequent mating in grasshoppers. *Heredity* 74: 654-660.
- Pasquali M, Dematheis F, Gullino ML & Garibaldi A (2007). Identification of Race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on Lettuce by Inter-Retrotransposon Sequence-Characterized Amplified Region Technique. *Phytopathology* 97: 987-996.
- Pelham HRB (1984). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO Journal* 3: 3095-3100.

- Pensel SM, Vilardi JC & Remis MI (2005). Mitochondrial DNA variation in the grasshopper *Sinipta dalmani*: application of long-PCR to the development of a homologous probe. *Genome* 48: 971–976.
- Peppers JA, Wiggins LE & Baker RJ (1997). Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research* 5: 475–479.
- Perfectti F & Werren JH (2001). The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution* 55: 1069–1073.
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA, Cabrero J, Bakkali M, López-León MD & Camacho JPM (2004a). Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 338–343.
- Perfectti F, Pita M, de la Vega CG & Camacho JPM (2004b). Spatio-temporal dynamics of a neutralized B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 376–385.
- Peters GB (1981). Germ line polysomy in the grasshopper *Atractomorpha similis*. *Chromosoma* 81: 593–617.
- Petit E, Balloux F & Goudet J (2001). Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution* 55:635–640.
- Phillips CB, Cane RP, Mee J, Chapman HM, Hoelmer KA & Coutinot D (2002). Intraspecific variation in the ability of *Microctonus aethiopoidea* (Hymenoptera: Braconidae) to parasitise *Sitona lepidus* (Coleoptera: Curculionidae). *New Zealand Journal of Agricultural Research* 45: 295–303.
- Pinedo-Cancino V, Sheen P, Tarazona-Santos E, Oswald W, Jeri C, Vittor AY, Patz JA & Gilman RH (2006). Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the peruvian amazon región of Iquitos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 238–245.
- Plowman AB & Bougourd SM (1994). Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72: 587–593.
- Pons J, Petitpierre E & Juan C (2002). Evolutionary dynamics of datellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Molecular Biology and Evolution*. 19: 1329–1340.
- Posada D & Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Pradeep AR, Chatterjee SN & Nair CV (2005). Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. *Journal of Applied Genetics* 46: 291–298.
- Pradeep M, Sarla N & Siddiq EA (2002). Inter-simple sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.

- Puertas MJ (2002). Nature and evolution of B chromosomes in plants: A non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 96: 198-205.
- Puertas MJ, González-Sánchez M, Manzanero S, Romera F & Jiménez MM (1998). Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. *Heredity* 80: 209-213.
- Puertas MJ, Jiménez MM, Romera F, Vega JM & Diez M (1990). Maternal imprinting effect on B chromosome transmission in rye. *Heredity* 64: 197-204.
- Qui YX, Hong DY, Fu CX & Cameron KM (2004). Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 583–596
- Rand DM (1996). Neutrality test of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. *Conservation Biology* 10: 665–671.
- Randolph LF (1928). Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anatomical Record* 41: 102.
- Ratnaparkhe MB, Tekeoglu M & Muehlbauer FJ (1998). Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 515-519.
- Reddy KD, Nagaraju J & Abraham EG (1999). Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity* 83: 681-687.
- Ren Z, Zhu B, Wang D, Ma E, Su D & Zhong Y (2008). Comparative population structure of Chinese sumac aphid *Schlechtendalia chinensis* and its primary host-plant *Rhus Chinensis*. *Genetica* 132: 103–112.
- 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: 716-719.
- Robles F, de la Herrán R, Ludwig A, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M & Garrido-Ramos MA (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* 338: 133–142.
- Romera F, Jiménez MM & Puertas MJ (1991). Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. I. Effects in 2B x 0B crosses. *Heredity* 66: 61–65.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Rosato M, Chiavarino AM, Naranjo CA, Puertas MJ & Poggio L (1996). Genetic control of B chromosome transmission rate in *Zea mays* ssp. *mays* (Poaceae). *American Journal of Botany* 83: 1107–1112.
- Rosetti N, Vilardi JC & Remis MI (2007). Effect of B chromosome and supernumerary segments on morphometric traits and adult fitness components in the

- grasshopper, *Dichroplus elongatus* (Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology* 20: 249-259.
- Roskams J & Rodgers L (2002). *Lab Ref. A handbook of recipes, reagents and other reference tools for use at the bench*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D & Legal L (2007). ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 240-250.
- Ruiz-Rejón M, Posse F & Oliver JL (1980). The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae): Effects at the isozyme level. *Chromosoma* 79: 341-348.
- Saitou N & Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sannomiya M (1974). Cytogenetic studies on natural populations of grasshoppers with special reference to B-chromosomes I. *Gonista bicolor*. *Heredity* 32: 251-265.
- Santos JL & Giráldez R (1978). The effect of C-heterochromatin in chiasma terminalisation in *Chortippus biguttulus* (Acrididae, Orthoptera). *Chromosoma* 70: 56-66.
- Santos JL, Del Cerro AL, Fernández A & Díez M (1993). Meiotic behavior of B chromosomes in the grasshopper *Omocestus burri*. A case of drive in females. *Hereditas* 118: 139-143.
- Santucci F, Emerson BC & Hewitt GM (1998). Mitochondrial DNA phylogeography of European Hedgehogs. *Molecular Ecology* 7: 1163-1172.
- Sapre AB & Deshpande DS (1987). Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity* 78: 191-196.
- Saraste M (1990). Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly reviews of biophysics* 23: 331-366.
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M & Parzefall J (1995). Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373: 68-71.
- Schlüter PM & Harris SA (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569-572.
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I & Schartl M (2006). Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Research* 14: 231-242.
- Sesarini C & Remis MI (2008). Molecular and morphometric variation in chromosomally differentiated populations of the grasshopper *Sinipta dalmani* (Orthoptera: Acrididae). *Genetica* 133: 295-306.
- Sharbel TF, Green DM & Houben A (1998). B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41: 14-22.

- Shaw MW & Hewitt GM (1985b). The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity* 54: 259–268.
- Shaw MW & Hewitt GM (1990). B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: Where next? In: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* (eds. Futuyma D, Antonovics J), Oxford Univ. Press, 7. pp 197-223.
- 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.
- Shaw MW, Hewitt GM & Anderson DA (1985a). Polymorphism in the rates of meiotic drive acting on the chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity* 55: 61–68.
- Shufran KA, Burd JD, Anstead JA & Lushai G (2000). Mitochondrial DNA sequence divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: evidence for host-adapted races. *Insect Molecular Biology* 9(2): 179–184.
- Silva MJJ & Yonenaga-Yassuda Y (1998). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Research* 6: 455–462.
- Simon, C (1991). Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA. *Molecular Techniques in Taxonomy* (Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W., eds), pp. 33-71. Springer, Berlin.
- Slatkin M & Barton NH (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Slatkin M (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Slatkin M (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Slatkin M (1994). Gene flow and population structure. In *Ecological Genetics* edited by L. Real, Princeton University Press, pp. 3-17.
- Sobhian R, Ryan FJ, Khamraev A, Pitcairn MJ & Bell DE (2003). DNA phenotyping to find a natural enemy in Uzbekistan for California biotypes of *Salsola tragus* L. *Biological Control* 28: 222–228.
- Solorzano CD, Szalanski AL, Owens CB & Steelman CD (2010). Genetic diversity of *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae) from New Orleans: pre- and post-Katrina. *Biochemical genetics* 48: 711-726.
- Soulsbury CD, Iossa G, Edwards KJ, Baker P & Harris S (2007). Allelic dropout from a high-quality DNA source. *Conservation Genetics* 8: 733–738.
- Spiegelhalter DJ, Best NJ, Carlin BP & Van der Linde A (2002). Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society B* 17: 37-49.

- Staub RW (1987). Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *Journal of Heredity* 78: 71-74.
- Stepien CA & Kocher TD (1997). Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Kocher TD & Stepien SD (eds). *Molecular Systematics of Fishes*, pp. 1-11. Academic Press, San Diego.
- Stitou S, Díaz de la Guardia R, Jiménez R & Burgos M (2000). Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Research* 8: 305–311.
- Su Z-H, Imura Y, Okamoto M & Osawa S (2004b). Pattern of phylogenetic diversification of the *Cychnini* ground beetles in the world as deduced mainly from sequence comparisons of the mitochondrial genes. *Gene* 326: 43–57.
- Su Z-H, Imura Y, Okamoto M, Kim C-G, Zhou H-Z, Paik J-C & Syozo Osawa S (2004a). Phylogeny and evolution of Digitulati ground beetles (Coleoptera, Carabidae) inferred from mitochondrial *ND5* gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 152–166.
- Su Z-H, Ohama T, Okada TS, Nakamura K, Ishikawa R & Osawa S (1996). Geography-Linked Phylogeny of the *Damaster* Ground Beetles Inferred from Mitochondrial ND5 Gene Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 42: 130–134.
- Suárez NM, Betancor E & Pestano J (2009). Intraspecific evolution of canarian *Euchloe* (Lepidoptera: Pieridae) butterflies, based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 601–605.
- Swofford DL (2003). PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Versión 4.0b10. Sinauer, Sunderland, MA.
- Taberlet P, Friffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V *et al.* (1996). Reliable genotyping of samples with low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189-3194.
- Tajima, F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Takahata N (1983). Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. *Genetics* 104, 497-512.
- Talavera M, López-León MD, Cabrero J & Camacho JPM (1990). Male germ line polysomy in the grasshopper *Chorthippus binotatus*: extra chromosomes are not transmitted. *Genome* 33: 384–388.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tanic N, Dedovic N, Vuyosevic M & Dimitrijevic B (2000). DNA profiling of B chromosomes from the Yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome Research* 10: 55–61.

- Temu EA & Yan G (2005). Microsatellite and mitochondrial genetic differentiation of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from western Kenya, the great rift valley, and coastal Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 726-733.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F & Camacho JPM (2007). Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Research* 15: 755–765.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F & Camacho JPM (2009b). Quantitative analysis of NOR expression in a B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 118: 291–301.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F & Camacho JPM (2010a). B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119: 217–225.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Alché JD & Camacho JP (2009a). Abnormal spermatid formation in the presence of the parasitic B<sub>24</sub> chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Sexual Development* 3: 284-289.
- Teruel, M (2009c). Tesis Doctoral: Origen, expresión y efectos fenotípicos de un parásito genómico. Universidad de Granada.
- Teruel M, Sørensen JG, Loeschcke V, Cabrero J, Perfectti F & Camacho JP (2010b). Level of Heat Shock Proteins Decreases in Individuals Carrying B-Chromosomes in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* (in press).
- Tester DJ, Cronk LB, Carr JL, Schulz V, Salisbury BA, Judson RS & Ackerman MJ (2006). Allelic dropout in long QT syndrome genetic testing: a possible mechanism underlying false-negative results. *Hearth Rhythm* 3: 815-821
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tosta VC, Fernandes-Salomão TM, Tavares MG, Pompolo SG, Barros EG & Campos LAO (2004). A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic Genome Research* 106: 279-283.
- Trivers R, Burt A & Palestis BG (2004). B-chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome* 47: 1-8.
- Tsumura Y, Ohba K & Strauss SH (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeated polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40-45.
- Tulsiera LK, Glaubitz JC, Kiss G, Carlson JE (1992). Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid from megagametophytes. *Nature Biotechnology* 10: 689-690.

- Tzeng TH, Lyhgholm LK, Ford CF & Bronson CR (1992). A restriction fragment length polymorphism and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Genetics* 130: 81-96.
- Uhl CH & Moran R (1973). The chromosomes of *Pachyphytum* (Crassulaceae). *American Journal of Botany* 60: 648-656.
- Urrutia AO & Hurst LD (2003). The signature of selection mediated by expression on human genes. *Genome Research* 13: 2260-2264.
- Van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1: 1-30.
- Van Zinderen Bakker EM (1975). The origin and palaeoenvironment of the Namib Desert biome. *Journal of Biogeography* 2: 65-73.
- Vandergast AG, Lewallen EA, Deas J, Bohonak AJ, Weissman DB & Fisher RN (2009). Loss of genetic connectivity and diversity in urban microreserves in a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmatidae: *Stenopelmatus* n. sp. "santa monica"). *Journal of Insect Conservation* 13: 329-345.
- Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield PM & Saccherib IJ (2004). Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 630-646.
- Varley JM, Macgregor HC & Barnett L (1990). Characterisation of a short, highly repeated and centromerically localised DNA sequence in crested and marbled newts of the genus *Triturus*. *Chromosoma* 100: 15-31.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M & Roldan-Ruiz I (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasmy and of a relationship between degree of homoplasmy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139-151.
- Verdcourt B (1969). The arid corridor between the north-east and southwest areas of Africa. *Palaeoecology of Africa* 4: 140-144.
- Vig BK (1987). Sequence of centromere separation: a possible role for repetitive DNA. *Mutagenesis* 2: 155-159.
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV *et al.* (2006). Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6: 1-11.
- Vinogradov AE (2003). Isochores and tissue-specificity. *Nucleic Acids Research* 31: 5212-5220.
- Viseras E, Camacho JPM, Cano MI & Santos JL (1990). Relationship between mitotic instability and accumulation of B chromosomes in males and females of *Locusta migratoria*. *Genome* 33: 23-29.
- Volobujev VT & Timina NZ (1980). Unusually high number of B-chromosomes and mosaicism by them in *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae). *Tsitol Genet* 14: 43-45.

- Wang B, Li W & Wang J (2005). Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. *Aquatic Botany* 81: 277-283.
- Waples RS (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89: 438-450.
- Weber JL & Wong C (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.
- Werren JH (1991). The paternal sex ratio chromosome of *Nasonia*. *American Naturalist* 137: 392-402.
- White WJD (1973). *Animal Cytology and Evolution*, 3<sup>rd</sup> ed. London: Cambridge University Press.
- Wilson EB (1906). Studies on chromosomes. V. The chromosomes of *Metapodius*. A contribution to the hypothesis of genetic continuity of chromosomes. *Journal of Experimental Zoology* 6: 147-205.
- Wilson EB (1907). The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science* 26: 870-871.
- Wolf KW, Mertl HG & Traut W (1991). Structure, mitotic and meiotic behavior, and stability of centromerelike elements devoid of chromosome arms in the fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *Chromosoma* 1: 99-108.
- Wolfe A (2000). ISSR Resource Website. [www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html](http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html)
- Wolfe AD & Liston A (1998a). Contributions of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. *Plant Molecular Systematics II: Soltis PS & Doyle JJ (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 43-86.*
- Wolfe AD & Randle CP (2001). Relationships within and among species of the holoparasitic *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding nucleotide sequences. *Systematic Botany* 26: 120-130.
- Wolfe AD, Xiang Q-Y & Kephart SR (1998b). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.
- Wolstenholme DR (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology* 141: 173-216.
- Wright F (1990). The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene* 87: 23-29.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wright S (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with a special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright S (1969). *Evolution and the genetics of populations, vol. 2, The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wu W, Zheng YL, Chen L, Wei YM, Yang RW & Yan ZH (2005). Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 1141-1157.

- Wurster-Hill DH, Ward OG & Davis BH (1988). Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccoon. *Cytogenetic and Cell Genetic* 49: 278–281.
- Xia X & Xie Z (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L & Wang Y (2003). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1-7.
- Yagi T, Katoh T, Chichvarkhin A, Shinkawa T & Omoto K (2001). Molecular phylogeny of butterflies *Parnassius glacialis* and *P. Stubbendorffii* at various localities in East Asia. *Genes*.
- Yagi T, Sasaki G & Takebe H (1999). Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. *Journal of molecular evolution* 48: 42-48.
- Yassin A, Amédégnato C, Cruaud C & Veuille M (2009). Molecular taxonomy and species delimitation in Andean *Schistocerca* (Orthoptera: Acrididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 404–411.
- Yau FCF, Wong KL, Wang J, But PPH & Shaw PC (2002). Generation of a sequence characterized amplified region probe for authentication of crocodylian species source. *Journal of Experimental Zoology* 294: 382–6.
- Yockteng R, Ballard HE, Mansion G, Dajoz I & Nadot S (2003). Relationships among pansies (*Viola* section *Melanium*) investigated using ITS and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution* 241: 153–170.
- Yonenaga-Yassuda Y, De Assis MDL & Kasahara S (1992). Variability of the nucleolus organizer regions and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon* aff. *arviculoides* (Cricetidae, Rodentia). *Caryologia* 45: 163–174.
- Yu H, Nason JD, Ge X & Zeng J (2010). Slatkin's Paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*. *Molecular Ecology* 19: 4441–4453.
- Zhang DX & Hewitt GM (1996). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial *COI* primers in insects. *Insect Molecular Biology* 6: 143-150.
- Zhang XP, Li XH & Qui YX (2006). Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 38-47.
- Zietkiewicz E, Rafalski A & Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence Repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD & Camacho JPM (1998). Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* 52: 274-277.



## 10. Anexos y alineamientos

---





Anexo 4.1. Frecuencia de los alelos amplificados utilizando el cebador ISSR6.

Alelos	Algarrobo	Torrox	Nerja0	Tetuán	Salobreña	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
6-250	0.893	0.769	0.800	0.897	0.870	0.143	0.447	0.133	0.133	0.250
6-330	0.964	1	0.900	1	0.826	1	0.915	1	1	1
6-350	0.000	0.038	0.033	0	0	0.143	0.021	0	0.133	0.036
6-380	0.036	0.038	0.067	0	0	0.286	0.064	0	0.067	0.179
6-450	0.036	0.038	0.100	0.069	0	0.143	0	0	0	0.071
6-500	1	0.923	0.900	0.586	1	0	0.191	0	0.067	0.250
6-550	0	0.077	0	0	0	0.143	0	0	0	0
6-630	0	0	0.100	0.138	0.174	0	0.191	0.267	0.267	0.429
6-750	0.429	0.192	0.500	0.483	0.304	0.429	0.574	0.267	0.467	0.536
6-800	0	0.115	0.267	0	0	0.286	0.191	0.067	0.067	0.107
6-900	0	0	0.067	0	0.043	0	0.043	0	0.133	0.107
6-1100	0	0	0	0	0.043	0.714	0.213	0.533	0.333	0.464
6-1200	0	0.077	0.233	0.138	0.478	0.714	0.149	0.333	0.333	0.464
6-1300	0.179	0.192	0.167	0.241	0.261	0.143	0.085	0.200	0.200	0.071
6-1400	0.036	0	0.033	0.103	0.043	0	0	0.133	0.067	0
6-1600	0	0	0	0	0	0	0.021	0	0	0

Anexo 4.2. Frecuencia de los alelos amplificados utilizando el cebador ISSR7.

Alelos	Algarrobo	Torroxo	Nerjao	Tetuán	Salobreña	Ciaras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
7-250	0	0	0	0	0	0	0.104	0	0.333	0.138
7-320	0.276	0	0.100	0	0.174	0	0.125	0	0.133	0
7-350	0.034	0	0.033	0	0.043	0	0.021	0	0.067	0
7-380	0.034	0.174	0.133	0.25	0.348	0	0.042	0.077	0.067	0.345
7-430	0.966	0.957	1	1	0	0.714	0.750	0.846	0.800	0.862
7-480	0.483	0	0	0.179	0.391	0	0.063	0	0.067	0
7-550	0.034	0	0.033	0	0.087	0	0.042	0	0.200	0.034
7-600	0.759	0.565	0.633	0.393	0.652	0.571	0.542	0.231	0.867	0.690
7-650	0.034	0.087	0	0	0.043	0	0.021	0	0	0
7-700	0.552	0.174	0.400	0.143	0.783	0.714	0.646	0.231	0.733	0.552
7-800	0.862	0.783	0.733	0.786	0.783	0.714	0.521	0.308	0.667	0.483
7-900	0.034	0.174	0.200	0.107	0.261	0.714	0.125	0.308	0.467	0.276
7-1000	0.655	0.783	0.400	0.429	0.826	1	0.958	0.846	1	0.931
7-1100	0	0.043	0.067	0	0	0	0.083	0	0	0
7-1150	0.655	0.348	0.333	0.250	0.826	0.286	0.333	0.231	0.667	0.310
7-1400	0.552	0.304	0.200	0.179	0.043	0.429	0.229	0.154	0.333	0.310
7-1600	0.621	0.609	0.733	0.786	0.652	0.286	0.042	0	0.200	0.138
7-1800	0	0	0	0	0.043	0.143	0	0	0	0
7->2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.067	0.034

Anexo 4.3. Frecuencia de los alelos amplificadas utilizando el cebador ISSR14.

Alelos	Algarrobo	Torrox	Nerjao	Tetuán	Salobreña	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
14-300	0.483	0.148	0.200	0.345	0.391	0.143	0.271	0.143	0.067	0
14-400	0.241	0.037	0.300	0.241	0.087	0	0	0	0	0
14-500	0.207	0.111	0.300	0.069	0.087	0	0.167	0	0.133	0
14-600	0.931	1	1	0.931	0.957	1	0.896	0.929	1	0.964
14-750	0.448	0.481	0.433	0.310	0.565	0.143	0.375	0.071	0.200	0.643
14-800	0.862	0.852	0.900	0.966	0.826	0.857	0.854	0.929	0.667	0.964
14-850	0.586	0.481	0.367	0.103	0.565	0.143	0.313	0.071	0.400	0.357
14-1250	0.828	0.963	0.933	0.793	0.957	0.286	0.188	0.214	0.533	0.286
14-1400	0.862	0.963	0.933	0.897	0.826	0.571	0.250	0.143	0.800	0.750
14-1450	0.241	0.407	0.067	0.138	0.304	0	0	0	0	0.036
14-1800	0.138	0.741	0.800	0.517	0.826	0.714	0.438	0.286	0.933	0.464

Anexo 4.4. Frecuencia de los alelos amplificadores utilizando el cebador ISSR26.

Alelos	Algarrobo	Torroxo	Nerja0	Tetuán	Salobreña	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
26-280	0	0.160	0	0	0.130	0.429	0.553	0.571	0.867	0.889
26-300	0.714	0.640	0.793	0.724	0.609	0.857	0.489	0.429	0.533	0.556
26-340	0.179	0.240	0.034	0.172	0.783	0.143	0.255	0.357	0.2	0.519
26-380	0.893	0.720	0.897	0.759	0.174	0.286	0.340	0.143	0.6	0.222
26-430	1	0.920	0.931	0.793	1	1	0.894	0.786	0.933	0.963
26-480	0.214	0.080	0.103	0	0.087	0.143	0.085	0	0	0.111
26-500	0.429	0.400	0.310	0.310	0.174	0.571	0.404	0.071	0.333	0.407
26-550	0.179	0.120	0.103	0.207	0.043	0.429	0.191	0	0.067	0.148
26-600	0.357	0.120	0.379	0.207	0.696	0.571	0.638	0.500	0.533	0.481
26-650	0.179	0.040	0.103	0.138	0.217	0.429	0.128	0.071	0.200	0.148
26-700	0.714	0.760	0.586	0.759	0.522	0	0.255	0.500	0.533	0.148
26-750	0.214	0.160	0.241	0.379	0.304	0.571	0.255	0.286	0.067	0.444
26-800	0.821	0.720	0.724	0.655	0.826	1	0.809	0.786	1.000	0.778
26-900	0.143	0.480	0.241	0.276	0.609	0.143	0.319	0.357	0.400	0.333
26-1000	0.214	0.240	0.034	0.034	0.130	0.143	0.170	0.071	0.067	0.185
26-1100	0.036	0.040	0.034	0.069	0.043	0.143	0	0	0.133	0.185
26-1200	0.036	0.040	0.034	0.034	0.130	0.286	0.106	0	0.067	0.074
26-1300	0.071	0.080	0.034	0.069	0	0.286	0.021	0	0.133	0.074
26-1600	0	0.160	0.138	0.241	0.130	0.143	0.043	0	0	0.185
26-1800	0	0.040	0.034	0	0	0	0	0	0	0
26-2000	0	0	0	0	0.043	0	0.043	0	0.067	0.037
26->2000	0.179	0.280	0.069	0.103	0.261	0.286	0.170	0.071	0.400	0.111



Anexo 4.6. Frecuencia de los alelos amplificados utilizando el cebador ISSR43.

Alelos	Algarrobo	Torrox	Nerja0	Tetuán	Salobreña	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
39-1100	1	0.944	0.957	0.923	0.810	0.714	0.639	0.769	1	0.926
43-250	0.143	0.360	0.071	0.233	0	0.571	0.605	0.667	0.600	0.267
43-280	0.643	0.560	0.571	0.367	0.455	1	0.674	1	0.867	0.933
43-320	0.286	0.200	0.250	0.433	0.409	0	0.233	0.250	0.200	0
43-380	0.143	0.120	0.214	0.333	0.545	0.857	0.465	0.917	0.933	0.933
43-400	0.143	0.520	0.607	0.667	0.182	0.143	0.233	0.083	0.067	0
43-490	1	0.600	1	0.900	1	1	1	1	1	0.967
43-540	0.143	0.240	0.107	0.700	0.182	0	0.163	0.250	0.533	0.100
43-600	0.750	0.520	0.393	0.400	0.636	0.143	0.093	0.250	0.533	0.067
43-650	0.036	0	0.036	0.133	0.045	0.143	0.047	0.167	0.067	0
43-780	0.929	0.600	1	0.867	1	1	0.977	1	1	0.967
43-800	0.607	0.440	0.679	0.700	0.182	0	0.233	0.333	0.200	0

Anexo 4.7. Valores de probabilidad asignados a cada uno de los valores de K y sus réplicas.

Réplicas	L(K <sub>1</sub> )*	L(K <sub>2</sub> )	L(K <sub>3</sub> )	L(K <sub>4</sub> )	L(K <sub>5</sub> )	L(K <sub>6</sub> )	L(K <sub>7</sub> )	L(K <sub>8</sub> )	L(K <sub>9</sub> )	L(K <sub>10</sub> )	L(K <sub>11</sub> )
1	-13705.2	-12820.2	-12608.3	-12353.2	-12219.9	-12066	-11965	-11981.7	-11859.8	-11918.1	-11751.2
2	-13700.4	-12823.8	-12584.1	-12353.1	-12188.2	-12061.3	-12017.6	-12019.5	-11823.5	-11718.2	-11728.4
3	-13706.8	-12819.9	-12612.3	-12333.4	-12174.7	-12065.3	-12107.1	-11934	-11814.3	-11692.8	-11746.1
4	-13705.4	-12817.3	-12628	-12384.9	-12222.6	-12101.3	-12040.7	-11925.8	-11789.5	-11772.4	-11694.3
5	-13705.1	-12813.2	-12614	-12357.5	-12185	-12056.5	-12021.6	-11998.2	-11846.7	-11707.4	-11792
6	-13702	-12818	-12598.5	-12363	-12182.3	-12045.3	-11978.8	-11930	-12026.7	-11720.5	-11712.8
7	-13702.3	-12818.3	-12606.2	-12340.7	-12194.9	-12068.3	-12013.3	-11897	-11760	-11733.2	-11794.1
8	-13704.2	-12819.6	-12603.1	-12335.7	-12180.5	-12047.9	-11984	-11871.5	-13073.7	-11629.6	-11809.3
9	-13704.9	-12812.5	-12628.4	-12372.1	-12285.8	-12066.2	-12037.8	-11915.4	-11811.5	-11660.6	-11703.4
10	-13705.2	-12816.6	-12599	-12359.6	-12280.6	-12236	-12114.4	-11956.7	-11780.2	-11739.2	-11755.9
<b>SD**</b>	1.95405561	3.34072514	13.4993374	16.08034	41.0658347	56.4167715	50.1884681	46.092318	398.740365	77.6662804	39.9799742

\*L(K<sub>1</sub>) corresponde a los valores de probabilidad asociados a K cuando su valor es igual a 2.

\*\*Desviación estándar correspondiente a las diez réplicas de L(K).

Anexo 4.8. Valores de  $L'(K)$ ,  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  calculados a partir del anexo 4.7.

Réplicas	$L'(K_1)$	$L'(K_2)$	$L'(K_3)$	$L'(K_4)$	$L'(K_5)$	$L'(K_6)$	$L'(K_7)$	$L'(K_8)$	$L'(K_9)$	$L'(K_{10})$	$L'(K_{11})$
1	13705.2	885	211.9	255.1	133.3	153.9	101	-16.7	121.9	-58.3	166.9
2	13700.4	876.6	239.7	231	164.9	126.9	43.7	-1.9	196	105.3	-10.2
3	13706.8	886.9	207.6	278.9	158.7	109.4	-41.8	173.1	119.7	121.5	-53.3
4	13705.4	888.1	189.3	243.1	162.3	121.3	60.6	114.9	136.3	17.1	78.1
5	13705.1	891.9	199.2	256.5	172.5	128.5	34.9	23.4	151.5	139.3	-84.6
6	13702	884	219.5	235.5	180.7	137	66.5	48.8	-96.7	306.2	7.7
7	13702.3	884	212.1	265.5	145.8	126.6	55	116.3	137	26.8	-60.9
8	13704.2	884.6	216.5	267.4	155.2	132.6	63.9	112.5	-1202.2	1444.1	-179.7
9	13704.9	892.4	184.1	256.3	86.3	219.6	28.4	122.4	103.9	150.9	-42.8
10	13705.2	888.6	217.6	239.4	79	44.6	121.6	157.7	176.5	41	-16.7

Anexo 4.9. Valores absolutos de  $L''(K)$ ,  $L''(K) = L'(K+1) - L'(K)$ , calculados a partir del anexo 4.8.

Réplicas	$L''(K_1)$	$L''(K_2)$	$L''(K_3)$	$L''(K_4)$	$L''(K_5)$	$L''(K_6)$	$L''(K_7)$	$L''(K_8)$	$L''(K_9)$	$L''(K_{10})$
1	12820.2	673.1	43.2	121.8	20.6	52.9	117.7	138.6	180.2	225.2
2	12823.8	636.9	8.7	66.1	38	83.2	45.6	197.9	90.7	115.5
3	12819.9	679.3	71.3	120.2	49.3	151.2	214.9	53.4	1.8	174.8
4	12817.3	698.8	53.8	80.8	41	60.7	54.3	21.4	119.2	61
5	12813.2	692.7	57.3	84	44	93.6	11.5	128.1	12.2	223.9
6	12818	664.5	16	54.8	43.7	70.5	17.7	145.5	402.9	298.5
7	12818.3	671.9	53.4	119.7	19.2	71.6	61.3	20.7	110.2	87.7
8	12819.6	668.1	50.9	112.2	22.6	68.7	48.6	1314.7	2646.3	1623.8
9	12812.5	708.3	72.2	170	133.3	191.2	94	18.5	47	193.7
10	12816.6	671	21.8	160.4	34.4	77	36.1	18.8	135.5	57.7
Media	12817.94	676.46	44.86	109	44.61	92.06	70.17	205.76	374.6	306.18

Anexo 4.10. Valores de  $\Delta K$ ,  $\Delta K = m(L''(K)) / s(L(K))$  obtenidos a partir de los datos del anexo 4.9.

	$\Delta K$
$K_2$	202.4889724
$K_3$	3.323126059
$K_4$	6.778463655
$K_5$	1.086304475
$K_6$	1.631784264
$K_7$	1.398129941
$K_8$	4.46408445
$K_9$	0.939458437
$K_{10}$	3.942251366

Anexo 4.11. Ascendencia inferida para cada individuo con respecto a los dos grupos establecidos con Structure en las poblaciones de la costa.

Id	Algarrobo		Torrox		Nerja		Tetuán		Salobreña	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	0.02	0.98	0.012	0.988	0.007	0.993	0.353	0.647	0.026	0.974
2	0.015	0.985	0.007	0.993	0.006	0.994	0.011	0.989	0.068	0.932
3	0.759	0.241	0.049	0.951	0.013	0.987	0.011	0.989	0.013	0.987
4	0.104	0.896	0.034	0.966	0.008	0.992	0.018	0.982	0.192	0.808
5	0.02	0.98	0.007	0.993	0.053	0.947	0.01	0.99	0.018	0.982
6	0.007	0.993	0.016	0.984	0.057	0.943	0.013	0.987	0.02	0.98
7	0.012	0.988	0.017	0.983	0.012	0.988	0.012	0.988	0.009	0.991
8	0.837	0.163	0.004	0.996	0.008	0.992	0.014	0.986	0.03	0.97
9	0.019	0.981	0.01	0.99	0.007	0.993	0.01	0.99	0.028	0.972
10	0.009	0.991	0.021	0.979	0.015	0.985	0.005	0.995	0.058	0.942
11	0.015	0.985	0.087	0.913	0.016	0.984	0.019	0.981	0.092	0.908
12	0.015	0.985	0.184	0.816	0.006	0.994	0.01	0.99	0.054	0.946
13	0.008	0.992	0.006	0.994	0.006	0.994	0.023	0.977	0.025	0.975
14	0.004	0.996	0.008	0.992	0.006	0.994	0.018	0.982	0.044	0.956
15	0.004	0.996	0.01	0.99	0.009	0.991	0.006	0.994	0.421	0.579
17	0.006	0.994	0.018	0.982	0.009	0.991	0.127	0.873	0.012	0.988
18	0.056	0.944	0.013	0.987	0.017	0.983	0.052	0.948	0.008	0.992
20	0.007	0.993	0.009	0.991	0.007	0.993	0.037	0.963	0.067	0.933
21	0.01	0.99	0.011	0.989	0.027	0.973	0.004	0.996	0.077	0.923
22	0.008	0.992	0.013	0.987	0.008	0.992	0.005	0.995	0.017	0.983
23	0.01	0.99	0.009	0.991	0.114	0.886	0.006	0.994	0.012	0.988
25	0.012	0.988	0.011	0.989	0.009	0.991	0.099	0.901	0.007	0.993
29	0.008	0.992	0.059	0.941	0.004	0.996	0.051	0.949	0.257	0.743
30	0.008	0.992	0.017	0.983	0.01	0.99	0.006	0.994		
31	0.006	0.994	0.022	0.978	0.02	0.98	0.028	0.972		
32	0.016	0.984	0.01	0.99	0.02	0.98	0.088	0.912		
33	0.006	0.994	0.008	0.992	0.012	0.988	0.007	0.993		
34	0.006	0.994	0.006	0.994	0.016	0.984	0.005	0.995		
35	0.007	0.993	0.008	0.992	0.027	0.973	0.009	0.991		
					0.077	0.923	0.008	0.992		

Anexo 4.1.2. Ascendencia inferida para cada individuo con respecto a los dos grupos establecidos con Structure en las poblaciones del Segura.

Claros			El Gallego			Socovos			Mundo			Calasparra					
Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos				
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2			
1	0.997	0.003	4	0.989	0.011	36	0.976	0.024	1	0.996	0.004	1	0.993	0.007	1	0.995	0.005
2	0.684	0.316	5	0.991	0.009	37	0.992	0.008	2	0.994	0.006	2	0.984	0.016	2	0.986	0.014
3	0.991	0.009	6	0.995	0.005	38	0.977	0.023	3	0.937	0.063	3	0.99	0.01	3	0.996	0.004
4	0.993	0.007	8	0.996	0.004	40	0.983	0.017	4	0.989	0.011	4	0.966	0.034	4	0.99	0.01
5	0.996	0.004	10	0.974	0.026	42	0.986	0.014	5	0.984	0.016	5	0.962	0.038	5	0.958	0.042
6	0.996	0.004	12	0.995	0.005	43	0.755	0.245	6	0.994	0.006	6	0.903	0.097	7	0.963	0.037
7	0.957	0.043	13	0.515	0.485	44	0.034	0.966	7	0.948	0.052	7	0.912	0.088	8	0.994	0.006
			14	0.995	0.005	45	0.957	0.043	8	0.979	0.021	8	0.99	0.01	9	0.959	0.041
			16	0.994	0.006	46	0.955	0.045	9	0.99	0.01	9	0.892	0.108	10	0.99	0.01
			17	0.994	0.006	47	0.693	0.307	1ast	0.995	0.005	11	0.922	0.078	11	0.986	0.014
			18	0.992	0.008	48	0.762	0.238	1h	0.987	0.013	12	0.983	0.017	12	0.993	0.007
			20	0.992	0.008	49	0.99	0.01	2h	0.996	0.004	13	0.96	0.04	13	0.988	0.012
			21	0.946	0.054	51	0.99	0.01	3h	0.974	0.026	14	0.99	0.01	14	0.946	0.054
			22	0.992	0.008	52	0.974	0.026	4h	0.994	0.006	15	0.967	0.033	15	0.995	0.005
			23	0.991	0.009	53	0.957	0.043	5h	0.991	0.009	16	0.96	0.04	16	0.994	0.006
			24	0.918	0.082	54	0.98	0.02				17	0.96	0.04	17	0.985	0.015
			26	0.991	0.009	56	0.981	0.019				18	0.98	0.02	18	0.98	0.02
			27	0.989	0.011	57	0.913	0.087				19	0.995	0.005	19	0.995	0.005
			28	0.996	0.004	58	0.986	0.014				20	0.995	0.005	20	0.995	0.005
			29	0.976	0.024	59	0.985	0.015				21	0.996	0.004	21	0.996	0.004
			30	0.622	0.378	60	0.987	0.013				22	0.989	0.011	22	0.989	0.011
			32	0.83	0.17	62	0.993	0.007				23	0.996	0.004	23	0.996	0.004
			33	0.992	0.008	63	0.208	0.792				24	0.993	0.007	24	0.993	0.007
			34	0.983	0.017	65	0.976	0.024				25	0.975	0.025	25	0.975	0.025
			35	0.962	0.038	65ast	0.757	0.243				26	0.994	0.006	26	0.994	0.006
												27	0.918	0.082	27	0.918	0.082
												28	0.997	0.003	28	0.997	0.003
												29	0.978	0.022	29	0.978	0.022
												30	0.935	0.065	30	0.935	0.065
												33	0.665	0.335	33	0.665	0.335

Anexo 4.13. Valores de probabilidad asignados a cada uno de los valores de K y sus réplicas.

Réplicas	L(K <sub>1</sub> )	L(K <sub>2</sub> )	L(K <sub>3</sub> )	L(K <sub>4</sub> )	L(K <sub>5</sub> )	L(K <sub>6</sub> )
1	-7185	-7025.1	-6830.9	-6707.4	-6664	-6600.8
2	-7183.9	-7028.6	-6832.4	-6689.3	-6680.9	-6604.7
3	-7184.3	-7012	-6834.2	-6706.5	-6655.9	-6602.6
4	-7185.2	-7034	-6828.2	-6702.1	-6688.6	-6629.7
5	-7182.9	-7027.1	-6823.8	-6688.5	-6689.3	-6585.1
6	-7184	-7032.3	-6834.9	-6706.7	-6674.5	-6607.9
7	-7183.6	-7009.3	-6831.3	-6695.1	-6655.7	-6605.5
8	-7184.8	-7014.8	-6841.3	-6707.8	-6648.1	-6653.2
9	-7186.9	-7033.2	-6838.1	-6688.8	-6651.3	-6593.2
10	-7185.8	-7031.1	-6831	-6694.5	-6674.3	-6603.9
<b>SD</b>	1.15969345	9.27975694	4.91899945	8.27245093	15.3272597	19.3447782

Anexo 4.14. Valores de L'(K), L'(K)=L(K)-L(K-1) calculados a partir del anexo 4.13.

Réplicas	L'(K <sub>1</sub> )	L'(K <sub>2</sub> )	L'(K <sub>3</sub> )	L'(K <sub>4</sub> )	L'(K <sub>5</sub> )	L'(K <sub>6</sub> )
1	7185	159.9	194.2	123.5	43.4	63.2
2	7183.9	155.3	196.2	143.1	8.4	76.2
3	7184.3	172.3	177.8	127.7	50.6	53.3
4	7185.2	151.2	205.8	126.1	13.5	58.9
5	7182.9	155.8	203.3	135.3	-0.8	104.2
6	7184	151.7	197.4	128.2	32.2	66.6
7	7183.6	174.3	178	136.2	39.4	50.2
8	7184.8	170	173.5	133.5	59.7	-5.1
9	7186.9	153.7	195.1	149.3	37.5	58.1
10	7185.8	154.7	200.1	136.5	20.2	70.4

Anexo 4.15. Valores absolutos de L''(K), L''(K)=|L'(K+1)-L'(K)|, calculados a partir del anexo 4.14.

Réplicas	L''(K <sub>1</sub> )	L''(K <sub>2</sub> )	L''(K <sub>3</sub> )	L''(K <sub>4</sub> )	L''(K <sub>5</sub> )
1	7025.1	34.3	70.7	80.1	19.8
2	7028.6	40.9	53.1	134.7	67.8
3	7012	5.5	50.1	77.1	2.7
4	7034	54.6	79.7	112.6	45.4
5	7027.1	47.5	68	136.1	105
6	7032.3	45.7	69.2	96	34.4
7	7009.3	3.7	41.8	96.8	10.8
8	7014.8	3.5	40	73.8	64.8
9	7033.2	41.4	45.8	111.8	20.6
10	7031.1	45.4	63.6	116.3	50.2
<b>Media</b>	7024.75	32.25	58.2	103.53	42.15

Anexo 4.16. Valores de ΔK, ΔK=m(L''(K))/s[L(K)] obtenidos a partir del anexo 4.15.

ΔK	
K <sub>2</sub>	3.737166848
K <sub>3</sub>	11.83167444
K <sub>4</sub>	12.22128736
K <sub>5</sub>	2.750002343

Algarrobo					Torrox				Nerja0				Tetuán				Salobreña								
Id	Grupos				Id	Grupos				Id	Grupos				Id	Grupos									
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4						
1	0.01	0.018	0.026	0.946	5	0.011	0.018	0.949	0.022	1	0.006	0.016	0.006	0.972	8	0.019	0.059	0.009	0.914	2	0.95	0.024	0.018	0.007	
2	0.014	0.009	0.029	0.949	11	0.109	0.033	0.84	0.018	2	0.015	0.045	0.859	0.081	13	0.014	0.963	0.01	0.012	4	0.988	0.004	0.005	0.004	
3	0.257	0.703	0.017	0.023	25	0.017	0.004	0.964	0.016	3	0.025	0.025	0.088	0.862	17	0.022	0.932	0.029	0.018	7	0.969	0.008	0.014	0.01	
4	0.011	0.015	0.01	0.963	30	0.007	0.003	0.982	0.008	4	0.015	0.007	0.044	0.934	26	0.03	0.053	0.413	0.504	10	0.959	0.017	0.012	0.012	
5	0.009	0.037	0.021	0.933	38	0.021	0.01	0.202	0.767	5	0.007	0.01	0.004	0.978	1	0.003	0.007	0.004	0.986	12	0.971	0.005	0.013	0.01	
6	0.008	0.013	0.96	0.019	41	0.028	0.009	0.018	0.945	6	0.147	0.016	0.817	0.02	2	0.011	0.021	0.081	0.887	13	0.971	0.016	0.008	0.005	
7	0.018	0.01	0.955	0.016	42	0.012	0.967	0.014	0.007	7	0.071	0.095	0.794	0.04	3	0.006	0.007	0.005	0.982	17	0.968	0.01	0.009	0.014	
8	0.008	0.918	0.005	0.068	43	0.026	0.894	0.073	0.008	9	0.015	0.009	0.925	0.051	4	0.014	0.129	0.028	0.83	19	0.955	0.009	0.02	0.017	
9	0.034	0.039	0.89	0.037	44	0.006	0.007	0.016	0.971	10	0.009	0.007	0.977	0.008	5	0.003	0.007	0.006	0.984	20	0.767	0.021	0.189	0.024	
10	0.014	0.012	0.966	0.008	52	0.026	0.006	0.94	0.028	11	0.006	0.009	0.118	0.866	6	0.008	0.012	0.954	0.026	21	0.955	0.009	0.031	0.005	
11	0.016	0.005	0.94	0.04	53	0.062	0.015	0.908	0.014	12	0.084	0.003	0.888	0.025	7	0.009	0.019	0.792	0.179	24	0.988	0.004	0.004	0.004	
12	0.016	0.024	0.952	0.008	55	0.008	0.732	0.008	0.252	13	0.017	0.008	0.94	0.036	9	0.101	0.006	0.5	0.393	25	0.776	0.009	0.18	0.035	
13	0.018	0.016	0.949	0.017	60	0.028	0.009	0.814	0.149	14	0.01	0.014	0.96	0.017	10	0.02	0.01	0.016	0.953	26	0.981	0.004	0.007	0.008	
14	0.013	0.009	0.97	0.008	67	0.01	0.968	0.017	0.006	15	0.037	0.09	0.849	0.024	11	0.003	0.989	0.003	0.005	27	0.962	0.003	0.018	0.017	
15	0.041	0.008	0.947	0.005	68	0.01	0.963	0.022	0.005	16	0.014	0.01	0.971	0.005	12	0.015	0.022	0.799	0.164	29	0.984	0.007	0.005	0.004	
17	0.032	0.008	0.939	0.02	69	0.022	0.03	0.111	0.837	17	0.016	0.1	0.03	0.854	14	0.008	0.026	0.121	0.846	30	0.97	0.008	0.011	0.011	
18	0.015	0.1	0.007	0.879	70	0.02	0.946	0.008	0.026	18	0.01	0.014	0.093	0.883	15	0.005	0.018	0.011	0.966	32	0.966	0.008	0.018	0.008	
20	0.022	0.01	0.962	0.006	71	0.01	0.939	0.034	0.018	20	0.018	0.037	0.364	0.581	16	0.006	0.023	0.008	0.963	33	0.971	0.014	0.006	0.009	
21	0.008	0.004	0.979	0.009	72	0.016	0.008	0.011	0.965	21	0.095	0.06	0.067	0.778	18	0.024	0.008	0.959	0.009	34	0.988	0.005	0.004	0.003	
22	0.006	0.005	0.982	0.007	73	0.058	0.045	0.785	0.112	22	0.013	0.021	0.957	0.009	19	0.04	0.008	0.937	0.014	36	0.951	0.012	0.028	0.009	
23	0.15	0.019	0.813	0.018	74	0.093	0.017	0.028	0.862	23	0.106	0.024	0.86	0.01	20	0.235	0.009	0.704	0.021	41	0.963	0.008	0.02	0.009	
25	0.01	0.004	0.955	0.031	75	0.004	0.009	0.029	0.958	29	0.014	0.01	0.018	0.958	21	0.022	0.038	0.061	0.879	42	0.936	0.011	0.039	0.014	
29	0.014	0.016	0.961	0.009	76	0.05	0.057	0.043	0.849	30	0.007	0.006	0.944	0.043	23	0.037	0.012	0.33	0.621	43	0.735	0.066	0.034	0.164	
30	0.009	0.005	0.98	0.005	83	0.008	0.981	0.007	0.004	31	0.022	0.024	0.287	0.667	24	0.016	0.007	0.811	0.166						
31	0.009	0.009	0.975	0.006	85	0.009	0.98	0.004	0.007	32	0.016	0.048	0.923	0.012	25	0.048	0.395	0.376	0.182						
32	0.665	0.015	0.306	0.013	89	0.007	0.98	0.007	0.006	33	0.022	0.103	0.653	0.222	28	0.011	0.004	0.005	0.98						
33	0.017	0.009	0.969	0.006	90	0.009	0.976	0.008	0.007	34	0.014	0.02	0.559	0.406	30	0.039	0.035	0.649	0.277						
34	0.016	0.013	0.958	0.013						36	0.013	0.042	0.056	0.889	31	0.004	0.013	0.916	0.067						
35	0.014	0.011	0.967	0.008						42	0.015	0.112	0.019	0.854	33	0.008	0.027	0.085	0.88						
										44	0.008	0.055	0.007	0.93	35	0.011	0.047	0.678	0.264						

Anexo 4.18. Valores de probabilidad asignados a cada uno de los valores de K y sus réplicas.

Réplicas	L(K <sub>1</sub> )	L(K <sub>2</sub> )	L(K <sub>3</sub> )	L(K <sub>4</sub> )	L(K <sub>5</sub> )	L(K <sub>6</sub> )
1	-5590.3	-5301	-5343.3	-5362.1	-5114.2	-5166.1
2	-5592.6	-5310.2	-5272.4	-5228.2	-5111.6	-5167.4
3	-5591.4	-5318.1	-5478.3	-5166.5	-5127.5	-5174.4
4	-5589.2	-5293.3	-5288.2	-5319.3	-5130	-5135.4
5	-5590.8	-5284.8	-5478	-5172.6	-5118.3	-5124.4
6	-5592.6	-5303.6	-5298.8	-5164	-5105.2	-5157.6
7	-5590.3	-5284.4	-5325.9	-5210.3	-5138.4	-5184.8
8	-5590.4	-5301.1	-5234	-5316.8	-5105	-5219.4
9	-5591.3	-5291.1	-5279.4	-5339.7	-5112.4	-5102.4
10	-5590.3	-5291.2	-5358.3	-5406.3	-5105.7	-5181.9
SD	1.07579428	10.9433694	83.2572479	90.2250864	11.5839976	33.4984842

Anexo 4.19. Valores de L'(K), L'(K)=L(K)-L(K-1) calculados a partir del anexo 4.18.

Réplicas	L'(K <sub>1</sub> )	L'(K <sub>2</sub> )	L'(K <sub>3</sub> )	L'(K <sub>4</sub> )	L'(K <sub>5</sub> )	L'(K <sub>6</sub> )
1	5590.3	289.3	-42.3	-18.8	247.9	-51.9
2	5592.6	282.4	37.8	44.2	116.6	-55.8
3	5591.4	273.3	-160.2	311.8	39	-46.9
4	5589.2	295.9	5.1	-31.1	189.3	-5.4
5	5590.8	306	-193.2	305.4	54.3	-6.1
6	5592.6	289	4.8	134.8	58.8	-52.4
7	5590.3	305.9	-41.5	115.6	71.9	-46.4
8	5590.4	289.3	67.1	-82.8	211.8	-114.4
9	5591.3	300.2	11.7	-60.3	227.3	10
10	5590.3	299.1	-67.1	-48	300.6	-76.2

Anexo 4.20. Valores absolutos de L''(K), /L''(K)/=|L'(K+1)-L'(K)|, calculados a partir del anexo 4.19.

Réplicas	L''(K <sub>1</sub> )	L''(K <sub>2</sub> )	L''(K <sub>3</sub> )	L''(K <sub>4</sub> )	L''(K <sub>5</sub> )
1	5301	331.6	23.5	266.7	299.8
2	5310.2	244.6	6.4	72.4	172.4
3	5318.1	433.5	472	272.8	85.9
4	5293.3	290.8	36.2	220.4	194.7
5	5284.8	499.2	498.6	251.1	60.4
6	5303.6	284.2	130	76	111.2
7	5284.4	347.4	157.1	43.7	118.3
8	5301.1	222.2	149.9	294.6	326.2
9	5291.1	288.5	72	287.6	217.3
10	5291.2	366.2	19.1	348.6	376.8
Media	5297.88	330.82	156.48	213.39	196.3

Anexo 4.21. Valores de ΔK, ΔK=m/(L''(K)/) / s[L(K)] obtenidos a partir del anexo 4.20.

	ΔK
K <sub>2</sub>	30.230
K <sub>3</sub>	1.879
K <sub>4</sub>	2.365
K <sub>5</sub>	16.946

Anexo 4.22. Ascendencia inferida para cada individuo con respecto a los dos grupos establecidos con Structure en las poblaciones del Segura.

Claras			El Gallego				Socovos				Mundo				Calasparra			
Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos		Id	Grupos		
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2		1	2	
1	0.78	0.22	4	0.354	0.646	36	0.943	0.057	1	0.248	0.752	1	0.789	0.211	1	0.049	0.951	
2	0.984	0.016	5	0.014	0.986	37	0.042	0.958	2	0.377	0.623	2	0.976	0.024	2	0.615	0.385	
3	0.882	0.118	6	0.011	0.989	38	0.901	0.099	3	0.143	0.857	3	0.942	0.058	3	0.02	0.98	
4	0.899	0.101	8	0.015	0.985	40	0.885	0.115	4	0.487	0.513	4	0.949	0.051	4	0.882	0.118	
5	0.044	0.956	10	0.923	0.077	42	0.204	0.796	5	0.926	0.074	5	0.978	0.022	5	0.794	0.206	
6	0.974	0.026	12	0.022	0.978	43	0.961	0.039	6	0.016	0.984	6	0.98	0.02	7	0.94	0.06	
7	0.965	0.035	13	0.063	0.937	44	0.944	0.056	7	0.148	0.852	7	0.974	0.026	8	0.165	0.835	
			14	0.032	0.968	45	0.108	0.892	8	0.352	0.648	8	0.967	0.033	9	0.498	0.502	
			16	0.034	0.966	46	0.239	0.761	9	0.53	0.47	9	0.98	0.02	10	0.569	0.431	
			17	0.047	0.953	47	0.941	0.059	1ast	0.099	0.901	11	0.98	0.02	11	0.944	0.056	
			18	0.576	0.424	48	0.81	0.19	1h	0.793	0.207	12	0.617	0.383	12	0.382	0.618	
			20	0.021	0.979	49	0.68	0.32	2h	0.015	0.985	13	0.842	0.158	13	0.945	0.055	
			21	0.046	0.954	51	0.861	0.139	3h	0.977	0.023	14	0.24	0.76	14	0.941	0.059	
			22	0.507	0.493	52	0.925	0.075	4h	0.088	0.912	15	0.716	0.284	15	0.668	0.332	
			23	0.127	0.873	53	0.948	0.052	5h	0.021	0.979	16	0.966	0.034	16	0.672	0.328	
			24	0.946	0.054	54	0.904	0.096				17			17	0.954	0.046	
			26	0.035	0.965	56	0.936	0.064				18			18	0.983	0.017	
			27	0.053	0.947	57	0.951	0.049				19			19	0.982	0.018	
			28	0.065	0.935	58	0.943	0.057				20			20	0.974	0.026	
			29	0.64	0.36	59	0.966	0.034				21			21	0.144	0.856	
			30	0.903	0.097	60	0.95	0.05				22			22	0.94	0.06	
			32	0.931	0.069	62	0.915	0.085				23			23	0.014	0.986	
			33	0.015	0.985	63	0.955	0.045				24			24	0.979	0.021	
			34	0.386	0.614	65	0.883	0.117				25			25	0.884	0.116	
			35	0.972	0.028	65ast	0.98	0.02				26			26	0.191	0.809	
												27			27	0.543	0.457	
												28			28	0.03	0.97	
												29			29	0.901	0.099	
												30			30	0.98	0.02	
												33			33	0.404	0.596	

Anexo 4.23. Matriz de distancias genéticas (Pairwise-F<sub>st</sub>) en la parte inferior y matriz del número de migrantes en la parte superior.

	Algarrobo	Torroxo	Nerjao	Tetuán	Salobreña	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
Algarrobo	0	5.5	7.6	4.7	2.8	1.3	1.5	1.2	1.5	1.3
Torroxo	0.0432	0	8.8	10.0	2.6	1.6	1.8	1.5	1.8	1.5
Nerjao	0.0320	0.0276	0	12.1	2.6	1.4	1.6	1.3	1.5	1.3
Tetuán	0.0501	0.0243	0.0203	0	2.0	1.5	1.8	1.7	1.5	1.4
Salobreña	0.0814	0.0884	0.0888	0.1136	0	1.4	1.5	1.1	1.4	1.3
Claras	0.1619	0.1380	0.1501	0.1437	0.1555	0	10.3	12.3	43.6	14.5
El Gallego	0.1397	0.1249	0.1376	0.1195	0.1411	0.0238	0	10.4	4.7	4.8
Socovos	0.1751	0.1455	0.1657	0.1297	0.1808	0.0199	0.0234	0	4.1	7.2
Mundo	0.1455	0.1232	0.1414	0.1396	0.1492	0.0057	0.0509	0.0573	0	6.3
Calasparra	0.1646	0.1427	0.1580	0.1489	0.1593	0.0170	0.0499	0.0337	0.0381	0

Anexo 4.24. Matriz de distancias geográficas. En la parte superior se muestra la distancia en metros mientras que en la parte inferior (en negrita) se representa el logaritmo decimal de la distancias en metros.

	Algarrobo	Torroxo	Nerjao	Tetuán	Salobreña	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
Algarrobo	0	8452	13154	17050	40532	238272	257605	253792	275618	266527
Torroxo	<b>3,927</b>	0	4836	8893	32146	233573	252699	248643	270541	260810
Nerjao	<b>4,119</b>	<b>3,684</b>	0	4085	27377	229859	248916	244753	266659	256691
Tetuán	<b>4,232</b>	<b>3,949</b>	<b>3,611</b>	0	23567	226422	245390	241157	263051	252930
Salobreña	<b>4,608</b>	<b>4,507</b>	<b>4,437</b>	<b>4,372</b>	0	213774	232025	227066	248882	248877
Claras	<b>5,377</b>	<b>5,368</b>	<b>5,361</b>	<b>5,355</b>	<b>5,330</b>	0	32570	68640	118960	109870
El Gallego	<b>5,411</b>	<b>5,403</b>	<b>5,396</b>	<b>5,390</b>	<b>5,366</b>	<b>4,513</b>	0	37840	89390	77200
Socovos	<b>5,404</b>	<b>5,396</b>	<b>5,389</b>	<b>5,382</b>	<b>5,356</b>	<b>4,837</b>	<b>4,578</b>	0	78290	67120
Mundo	<b>5,440</b>	<b>5,432</b>	<b>5,426</b>	<b>5,420</b>	<b>5,396</b>	<b>5,075</b>	<b>4,951</b>	<b>4,894</b>	0	51510
Calasparra	<b>5,426</b>	<b>5,416</b>	<b>5,409</b>	<b>5,403</b>	<b>5,396</b>	<b>5,041</b>	<b>4,888</b>	<b>4,827</b>	<b>4,712</b>	0

Anexo 4.25. Matriz del coeficiente de disimilitud de Dice. En la matriz inferior aparece los valores del promedio del coeficiente de disimilitud de Dice de los individuos que componen cada población junto con su desviación estándar. En la matriz superior se muestran los valores del error estándar (SE) que también aparecen a su vez en la diagonal de la matriz junto con los valores del promedio y desviación estándar.

	Algarrobo	Torrox	Nerja0	Tetuán	Salob	Claras	El Gallego	Socovos	Mundo	Calasparra
Algarrobo	0.353 ± 0.119 (SE=0.006)	0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.003	0.006	0.004	0.003
Torrox	0.398 ± 0.094	0.382 ± 0.101 (SE= 0.005)	0.003	0.004	0.003	0.005	0.003	0.006	0.004	0.003
Nerja0	0.378 ± 0.089	0.382 ± 0.085	0.348 ± 0.075 (SE=0.004)	0.003	0.003	0.005	0.003	0.006	0.004	0.003
Tetuán	0.406 ± 0.095	0.415 ± 0.117	0.381 ± 0.087	0.387 ± 0.111 (SE=0.005)	0.003	0.005	0.003	0.006	0.004	0.003
Salob	0.408 ± 0.093	0.422 ± 0.082	0.408 ± 0.070	0.443 ± 0.092	0.341 ± 0.089 (SE=0.006)	0.007	0.003	0.007	0.004	0.004
Claras	0.490 ± 0.076	0.501 ± 0.072	0.480 ± 0.075	0.505 ± 0.078	0.487 ± 0.084	0.357 ± 0.066 (SE= 0.014)	0.006	0.015	0.007	0.006
El Gallego	0.498 ± 0.112	0.520 ± 0.118	0.503 ± 0.111	0.518 ± 0.114	0.510 ± 0.117	0.422 ± 0.110	0.467 ± 0.129 (SE=0.004)	0.005	0.004	0.003
Socovos	0.544 ± 0.132	0.552 ± 0.131	0.545 ± 0.126	0.536 ± 0.127	0.551 ± 0.135	0.444 ± 0.149	0.486 ± 0.147	0.466 ± 0.168 (SE=0.016)	0.010	0.008
Mundo	0.453 ± 0.085	0.459 ± 0.079	0.451 ± 0.078	0.472 ± 0.082	0.453 ± 0.074	0.379 ± 0.068	0.444 ± 0.115	0.453 ± 0.154	0.360 ± 0.088 (SE=0.009)	0.004
Calasparra	0.477 ± 0.082	0.491 ± 0.095	0.476 ± 0.081	0.501 ± 0.089	0.466 ± 0.096	0.372 ± 0.085	0.441 ± 0.111	0.441 ± 0.159	0.390 ± 0.091	0.358 ± 0.116 (SE=0.006)

Anexo 5.1. Valores de probabilidad asignados a cada uno de los valores de K y sus réplicas.

Réplicas	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
1	-7093.9	-6719.5	-6519.1	-6475	-6395.2	-6289.3	-6769.2
2	-7093	-6709.8	-6514.7	-6534.2	-6447.9	-6332.7	-6289
3	-7093.3	-6706.2	-6513.7	-6528.4	-6397.5	-6294	-6323.2
4	-7090.7	-6705.9	-6513.5	-6493.7	-6468.8	-6333.2	-6322.7
5	-7094	-6704	-6512.9	-6526.9	-6363.5	-6322.9	-6367.5
6	-7093.9	-6693.9	-6512.3	-6464.5	-6464.4	-6289.5	-6304.2
7	-7093	-6693.9	-6511.8	-6546.9	-6456	-6310.9	-6327.3
8	-7094.1	-6693.1	-6511.3	-6476.5	-6465.1	-6320.4	-6358.7
9	-7093.7	-6688.7	-6510.9	-6479.2	-6483.7	-6333.6	-6314.6
10	-7092.7	-6673.7	-6510.6	-6553.5	-6467.4	-6289.5	-6291.1
<b>SD</b>	<b>1.014</b>	<b>12.884</b>	<b>2.489</b>	<b>33.417</b>	<b>40.401</b>	<b>19.394</b>	<b>143.691</b>

\*L(K<sub>1</sub>) corresponde a los valores de probabilidad asociados a K cuando su valor es igual a 2.

\*\*Desviación estándar correspondiente a las diez réplicas de L(K).

Anexo 5.2. Valores de L'(K), L'(K)= L(K)-L(K-1) calculados a partir del anexo 5.1.

Réplicas	L'(K <sub>1</sub> )	L'(K <sub>2</sub> )	L'(K <sub>3</sub> )	L'(K <sub>4</sub> )	L'(K <sub>5</sub> )	L'(K <sub>6</sub> )	L'(K <sub>7</sub> )
1	7093.9	374.4	200.4	44.1	79.8	105.9	-479.9
2	7093	383.2	195.1	-19.5	86.3	115.2	43.7
3	7093.3	387.1	192.5	-14.7	130.9	103.5	-29.2
4	7090.7	384.8	192.4	19.8	24.9	135.6	10.5
5	7094	390	191.1	-14	163.4	40.6	-44.6
6	7093.9	400	181.6	47.8	0.1	174.9	-14.7
7	7093	399.1	182.1	-35.1	90.9	145.1	-16.4
8	7094.1	401	181.8	34.8	11.4	144.7	-38.3
9	7093.7	405	177.8	31.7	-4.5	150.1	19
10	7092.7	419	163.1	-42.9	86.1	177.9	-1.6

Anexo 5.3. Valores absolutos de  $L''(K)$ ,  $/L''(K)/=/(L'(K+1)-L'(K))$ , calculados a partir del anexo 5.2.

Réplicas	$L''(K_1)$	$L''(K_2)$	$L''(K_3)$	$L''(K_4)$	$L''(K_5)$	$L''(K_6)$
1	6719.5	174	156.3	35.7	26.1	585.8
2	6709.8	188.1	214.6	105.8	28.9	71.5
3	6706.2	194.6	207.2	145.6	27.4	132.7
4	6705.9	192.4	172.6	5.1	110.7	125.1
5	6704	198.9	205.1	177.4	122.8	85.2
6	6693.9	218.4	133.8	47.7	174.8	189.6
7	6693.9	217	217.2	126	54.2	161.5
8	6693.1	219.2	147	23.4	133.3	183
9	6688.7	227.2	146.1	36.2	154.6	131.1
10	6673.7	255.9	206	129	91.8	179.5
<b>Media</b>	6698.87	208.57	180.59	83.19	92.46	184.5

Anexo 5.4. Valores de  $\Delta K$ ,  $\Delta K=m/(L''(K)) / s[L(K)]$  obtenidos a partir de los datos del anexo 5.3.

$\Delta K$	
$K_2$	16.18719099
$K_3$	72.54229147
$K_4$	2.48941519
$K_5$	2.288555828
$K_6$	9.513090108

Anexo 5.5. Ascendencia inferida para cada individuo con respecto a los dos grupos establecidos con Structure en las poblaciones del Segura.

Id	Grupos			Claros			Socovos			Mundo				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
2	0.007	0.959	0.034	0.852	0.138	0.01	1	0.252	0.737	0.011	1	0.833	0.153	0.014
4	0.008	0.977	0.016	0.969	0.007	0.024	2	0.384	0.607	0.009	2	0.976	0.009	0.014
7	0.01	0.979	0.011	0.917	0.075	0.008	3	0.091	0.722	0.186	3	0.967	0.024	0.009
10	0.022	0.908	0.07	0.937	0.053	0.01	4	0.423	0.526	0.051	4	0.907	0.024	0.069
12	0.009	0.968	0.023	0.016	0.979	0.005	5	0.959	0.031	0.01	5	0.925	0.009	0.066
13	0.014	0.978	0.009	0.982	0.012	0.006	6	0.006	0.99	0.004	6	0.978	0.009	0.013
17	0.009	0.983	0.008	0.959	0.013	0.028	7	0.063	0.857	0.08	7	0.979	0.01	0.011
19	0.015	0.967	0.018				8	0.18	0.632	0.187	8	0.976	0.015	0.009
20	0.022	0.947	0.031				9	0.484	0.455	0.061	9	0.951	0.009	0.04
21	0.012	0.964	0.023				1ast	0.054	0.911	0.036	11	0.983	0.008	0.009
24	0.01	0.973	0.017				1h	0.853	0.122	0.026	12	0.712	0.262	0.026
25	0.007	0.878	0.115				2h	0.006	0.99	0.005	13	0.759	0.124	0.117
26	0.007	0.981	0.012				3h	0.972	0.008	0.02	14	0.159	0.804	0.037
27	0.008	0.957	0.035				4h	0.054	0.925	0.021	15	0.773	0.192	0.035
29	0.017	0.967	0.017				5h	0.009	0.984	0.006	16	0.969	0.014	0.017
30	0.008	0.977	0.015											
32	0.008	0.983	0.009											
33	0.027	0.961	0.012											
34	0.011	0.979	0.01											
36	0.018	0.971	0.012											
41	0.008	0.98	0.012											
42	0.007	0.983	0.01											
43	0.162	0.805	0.033											

Anexo 5.6. Ascendencia inferida para cada individuo con respecto a los dos grupos establecidos con Structure en las poblaciones del Segura.

Id	Grupos			El Gallego			Grupos				
	1	2	3	Id	1	2	3	Id	1	2	3
1	0.035	0.958	0.007	17	0.963	0.021	0.016	4	0.143	0.75	0.107
2	0.559	0.37	0.071	18	0.961	0.007	0.032	5	0.006	0.99	0.005
3	0.008	0.988	0.004	19	0.985	0.007	0.008	6	0.005	0.992	0.004
4	0.927	0.062	0.011	20	0.973	0.012	0.015	8	0.006	0.99	0.004
5	0.748	0.159	0.094	21	0.07	0.909	0.021	10	0.622	0.069	0.309
7	0.958	0.027	0.015	22	0.916	0.028	0.055	12	0.009	0.986	0.005
8	0.132	0.833	0.035	23	0.007	0.989	0.005	13	0.032	0.891	0.078
9	0.213	0.565	0.222	24	0.976	0.008	0.015	14	0.012	0.983	0.006
10	0.537	0.371	0.092	25	0.893	0.055	0.052	16	0.015	0.978	0.007
11	0.949	0.025	0.026	26	0.093	0.817	0.09	17	0.019	0.974	0.007
12	0.375	0.55	0.076	27	0.28	0.279	0.441	18	0.631	0.351	0.018
13	0.957	0.031	0.012	28	0.012	0.984	0.004	20	0.008	0.987	0.005
14	0.919	0.023	0.058	29	0.929	0.046	0.025	21	0.01	0.897	0.092
15	0.804	0.183	0.012	30	0.973	0.008	0.019	22	0.464	0.516	0.02
16	0.785	0.203	0.012	33	0.054	0.607	0.339	23	0.051	0.91	0.039
								24	0.897	0.027	0.076
								26	0.012	0.969	0.018
								27	0.023	0.951	0.026
								28	0.029	0.962	0.009
								29	0.608	0.342	0.049
								30	0.53	0.091	0.379
								<b>32</b>	<b>0.212</b>	<b>0.06</b>	<b>0.728</b>
								33	0.006	0.988	0.005
								34	0.283	0.633	0.083
								35	0.972	0.012	0.016
								65ast	0.949	0.009	0.043

Anexo 7.1. Frecuencias observadas y esperadas de los marcadores ISSR que muestran asociación significativa positiva con la presencia de cromosomas B en el conjunto de poblaciones con B y sin B.

<b>6-250</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>81</b>	74	155
<b>Individuos +B</b>	19	<b>74</b>	93
<b>Total</b>	100	148	248
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>62.5</b>	92.5	155
<b>Individuos +B</b>	37.5	<b>55.5</b>	93
<b>Total</b>	100	148	248

<b>6-500</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>96</b>	59	155
<b>Individuos +B</b>	16	<b>77</b>	93
<b>Total</b>	112	136	248
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>70</b>	85	155
<b>Individuos +B</b>	42	<b>51</b>	93
<b>Total</b>	112	136	248

<b>7-480</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>139</b>	15	154
<b>Individuos +B</b>	74	<b>17</b>	91
<b>Total</b>	213	32	245
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>133.89</b>	20.11	154
<b>Individuos +B</b>	79.11	<b>11.89</b>	91
<b>Total</b>	213	32	245

<b>7-800</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>65</b>	89	154
<b>Individuos +B</b>	14	<b>74</b>	95
<b>Total</b>	82	163	245
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>50.27</b>	103.73	154
<b>Individuos +B</b>	28.73	<b>59.27</b>	95
<b>Total</b>	82	163	245

<b>7-1600</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>110</b>	44	154
<b>Individuos +B</b>	33	<b>58</b>	91
<b>Total</b>	143	102	245
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>89.89</b>	64.11	154
<b>Individuos +B</b>	53.11	<b>37.89</b>	91
<b>Total</b>	143	102	245

<b>14-850</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>107</b>	48	155
<b>Individuos +B</b>	53	<b>42</b>	95
<b>Total</b>	160	90	250
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>99.2</b>	55.80	155
<b>Individuos +B</b>	60.80	<b>34.20</b>	95
<b>Total</b>	160	90	250

<b>14-1250</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>85</b>	70	155
<b>Individuos +B</b>	12	<b>83</b>	95
<b>Total</b>	97	153	250
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>60.14</b>	94.86	155
<b>Individuos +B</b>	36.86	<b>58.14</b>	95
<b>Total</b>	97	153	250

<b>14-1400</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>66</b>	89	155
<b>Individuos +B</b>	9	<b>86</b>	95
<b>Total</b>	75	175	250
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>46.50</b>	108.50	155
<b>Individuos +B</b>	28.50	<b>66.50</b>	95
<b>Total</b>	75	175	250

14-1450	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>145</b>	10	155
<b>Individuos +B</b>	73	<b>22</b>	95
<b>Total</b>	218	32	250
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>135.16</b>	19.84	155
<b>Individuos +B</b>	82.84	<b>12.16</b>	95
<b>Total</b>	218	32	250

26-380	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>83</b>	68	151
<b>Individuos +B</b>	31	<b>62</b>	93
<b>Total</b>	114	130	244
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>70.55</b>	80.45	151
<b>Individuos +B</b>	43.45	<b>49.55</b>	93
<b>Total</b>	114	130	244

26-700	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>92</b>	59	151
<b>Individuos +B</b>	31	<b>62</b>	93
<b>Total</b>	123	121	244
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>76.12</b>	74.88	151
<b>Individuos +B</b>	46.88	<b>46.12</b>	93
<b>Total</b>	123	121	244

39-390	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>61</b>	72	133
<b>Individuos +B</b>	20	<b>54</b>	74
<b>Total</b>	81	126	207
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>52.04</b>	80.96	133
<b>Individuos +B</b>	28.96	<b>45.04</b>	74
<b>Total</b>	81	126	207

<b>39-600</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>86</b>	47	133
<b>Individuos +B</b>	19	<b>55</b>	74
<b>Total</b>	105	102	207
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>67.46</b>	65.54	133
<b>Individuos +B</b>	37.54	<b>36.46</b>	74
<b>Total</b>	105	102	207

<b>39-700</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>124</b>	9	133
<b>Individuos +B</b>	58	<b>16</b>	74
<b>Total</b>	182	25	207
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>116.94</b>	16.06	133
<b>Individuos +B</b>	65.06	<b>8.94</b>	74
<b>Total</b>	182	25	207

<b>39-1000</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>32</b>	101	133
<b>Individuos +B</b>	7	<b>67</b>	74
<b>Total</b>	39	168	207
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>25.06</b>	107.94	133
<b>Individuos +B</b>	13.94	<b>60.06</b>	74
<b>Total</b>	39	168	207

<b>43-400</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>112</b>	36	148
<b>Individuos +B</b>	57	<b>35</b>	92
<b>Total</b>	169	71	240
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>104.22</b>	43.78	148
<b>Individuos +B</b>	64.78	<b>27.22</b>	92
<b>Total</b>	169	71	240

<b>43-600</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>117</b>	31	148
<b>Individuos +B</b>	34	<b>58</b>	92
<b>Total</b>	151	89	240
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>93.12</b>	54.88	148
<b>Individuos +B</b>	57.88	<b>34.12</b>	92
<b>Total</b>	151	89	240

<b>43-800</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>104</b>	44	148
<b>Individuos +B</b>	47	<b>45</b>	92
<b>Total</b>	151	89	240
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>93.12</b>	54.88	148
<b>Individuos +B</b>	57.88	<b>34.12</b>	92
<b>Total</b>	151	89	240

Anexo 7.2. Frecuencias observadas y esperadas de los marcadores ISSR que muestran asociación significativa positiva con la presencia de cromosomas B considerando solo las poblaciones con cromosomas B.

<b>6-250</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>36</b>	50	86
<b>Individuos +B</b>	19	<b>74</b>	93
<b>Total</b>	55	124	179
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>26.42</b>	59.58	86
<b>Individuos +B</b>	28.58	<b>64.42</b>	93
<b>Total</b>	55	124	179

<b>6-500</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>36</b>	50	86
<b>Individuos +B</b>	16	<b>77</b>	93
<b>Total</b>	52	127	179
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>24.98</b>	61.02	86
<b>Individuos +B</b>	27.02	<b>65.98</b>	93
<b>Total</b>	52	127	179

<b>7-800</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>31</b>	55	86
<b>Individuos +B</b>	17	<b>74</b>	91
<b>Total</b>	48	129	177
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>23.32</b>	62.68	86
<b>Individuos +B</b>	24.68	<b>66.32</b>	91
<b>Total</b>	48	129	177

<b>7-1600</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>46</b>	40	86
<b>Individuos +B</b>	33	<b>58</b>	91
<b>Total</b>	79	98	177
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>38.38</b>	47.62	86
<b>Individuos +B</b>	40.62	<b>50.38</b>	91
<b>Total</b>	79	98	177

14-1250	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>30</b>	56	86
<b>Individuos +B</b>	12	<b>83</b>	95
<b>Total</b>	42	139	181
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>19.96</b>	66.04	86
<b>Individuos +B</b>	22.04	<b>72.96</b>	95
<b>Total</b>	42	139	181

14-1450	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>76</b>	10	86
<b>Individuos +B</b>	73	<b>22</b>	95
<b>Total</b>	149	32	181
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>70.8</b>	15.2	86
<b>Individuos +B</b>	78.2	<b>16.8</b>	95
<b>Total</b>	149	32	181

26-700	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>43</b>	40	83
<b>Individuos +B</b>	31	<b>62</b>	93
<b>Total</b>	74	102	176
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>34.9</b>	48.1	83
<b>Individuos +B</b>	39.1	<b>53.9</b>	93
<b>Total</b>	74	102	176

39-600	Individuos sin banda (0)	Individuos con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>35</b>	42	77
<b>Individuos +B</b>	19	<b>55</b>	74
<b>Total</b>	54	97	151
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>27.54</b>	49.46	77
<b>Individuos +B</b>	26.46	<b>47.54</b>	74
<b>Total</b>	54	97	151

<b>39-700</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>72</b>	5	77
<b>Individuos +B</b>	58	<b>16</b>	74
<b>Total</b>	130	21	151
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>66.29</b>	10.71	77
<b>Individuos +B</b>	63.71	<b>10.29</b>	74
<b>Total</b>	130	21	151

<b>43-320</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>70</b>	16	86
<b>Individuos +B</b>	63	<b>29</b>	92
<b>Total</b>	133	45	178
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>64.26</b>	21.74	86
<b>Individuos +B</b>	68.74	<b>23.26</b>	92
<b>Total</b>	133	45	178

<b>43-600</b>	<b>Individuos sin banda (0)</b>	<b>Individuos con banda (1)</b>	<b>Total</b>
Frecuencias observadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>63</b>	23	86
<b>Individuos +B</b>	34	<b>58</b>	92
<b>Total</b>	97	81	178
Frecuencias esperadas			
<b>Individuos 0B</b>	<b>46.87</b>	39.13	86
<b>Individuos +B</b>	50.13	<b>41.87</b>	92
<b>Total</b>	97	81	178

Anexo 7.3. Frecuencias observadas y esperadas de los marcadores ISSR que muestran asociación significativa positiva con la presencia de cromosomas B obtenidas a través del análisis de cruzamientos controlados.

♀5 x ♂7	Descendientes sin banda (0)	Descendientes con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Descendientes 0B</b>	<b>8</b>	3	<b>11</b>
<b>Descendientes +B</b>	0	<b>6</b>	6
<b>Total</b>	8	9	17
Frecuencias esperadas			
<b>Descendientes 0B</b>	<b>5.18</b>	5.82	11
<b>Descendientes +B</b>	2.82	<b>3.18</b>	6
<b>Total</b>	8	9	17

♀3 x ♂3	Descendientes sin banda (0)	Descendientes con banda (1)	Total
Frecuencias observadas			
<b>Descendientes 0B</b>	<b>8</b>	2	<b>10</b>
<b>Descendientes +B</b>	3	<b>7</b>	10
<b>Total</b>	11	9	20
Frecuencias esperadas			
<b>Descendientes 0B</b>	<b>5.5</b>	4.5	10
<b>Descendientes +B</b>	5.5	<b>4.5</b>	10
<b>Total</b>	11	9	20

















