

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Análisis estructural y funcional del cromosoma B de centeno

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Fernando Gómez-Aldecoa Cuadrado

DIRECTOR

Miriam González García
Juan Manuel Vega Melero

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL
CROMOSOMA B DE CENTENO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

FERNANDO GÓMEZ-ALDECOA CUADRADO

DIRECTORES

MIRIAM GONZÁLEZ GARCÍA

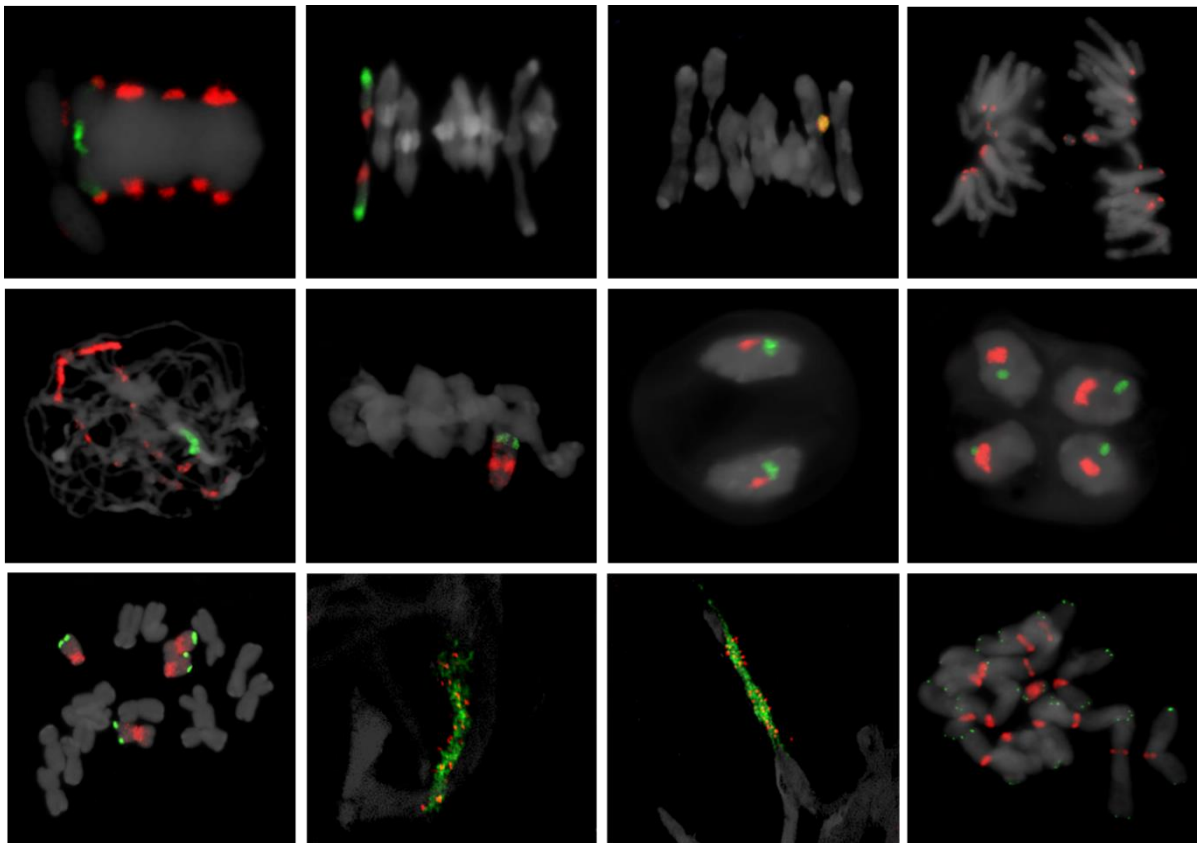
JUAN MANUEL VEGA MELERO



Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento Genética, Fisiología y Microbiología
Unidad Docente de Genética



Análisis estructural y funcional del cromosoma B de centeno



Fernando Gómez-Aldecoa Cuadrado

Directores:

Miriam González García y Juan Manuel Vega Melero

El desarrollo de la presente tesis se ha financiado con los siguientes proyectos:

- “Centrómeros y Cromosomas Artificiales de Cereales”

Entidad Financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad

Nº de referencia: AGL2011-28542. Investigador Principal: Prof. Juan Manuel Vega Melero

- “Cromosomas artificiales en trigo con fines biotecnológicos”

Entidad Financiadora: Banco Santander/Universidad Complutense de Madrid

Referencia: PR41/17:21031. Investigador principal: Prof. Juan Manuel Vega Melero

Asimismo, Fernando Gómez-Aldecoa Cuadrado ha disfrutado de una “Ayuda para la contratación de investigadores predoctorales cofinanciadas por el Fondo Social Europeo, a través del Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI)”. Convocatoria 2019 (BOCM 28-6-2019) de la Comunidad de Madrid. Desarrollada bajo la dirección de Mónica Pradillo Orellana en la Unidad Docente de Genética, Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Seré breve, quiero agradecer esta tesis a todo aquel que se sienta agradecido con estas palabras.

“Nadie ofrece tanto como el que no va a cumplir”

Francisco de Quevedo

“El coraje no es tener la fuerza para seguir; es seguir cuando no tienes fuerza”

Napoleón Bonaparte

“Lo imposible es el fantasma de los tímidos y el refugio de los cobardes”

Napoleón Bonaparte

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	8
EL CENTENO	10
LA MEIOSIS	11
Apareamiento, sinapsis y recombinación	12
EL CENTRÓMERO	13
CENH3	14
LOS CROMOSOMAS B	15
EL CROMOSOMA B DE MAÍZ	16
EL CROMOSOMA B DE CENTENO	17
Estructura del cromosoma B de centeno	17
Evolución del cromosoma B de centeno	18
Herencia del cromosoma B de centeno	19
Transcripción en el cromosoma B de centeno	22
Transmisión del cromosoma B de centeno (poblaciones)	23
La meiosis del cromosoma B de centeno	24
Derivados del B de centeno	25
MINICROMOSOMAS	27
APLICACIONES CROMOSOMAS B	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
MATERIALES	35
MÉTODOS	35
Germinación y cultivo	35
Obtención y fijación de raíces	35
Obtención y fijación de anteras	36

Extracción ADN genómico	36
Obtención de sondas de ADN, secuenciación y alineamiento.....	37
Identidad de las secuencias.....	39
Clonaje de sondas de ADN	42
Almacenamiento y conservación sondas	43
Marcaje de sondas	44
Preparaciones por técnica de <i>Spreading</i>	44
Preparaciones por <i>Squash</i>	44
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	45
Inmunolocalización y FISH.....	46
Microscopía	47
Estadística y análisis de datos	48
RESULTADOS	49
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CROMOSOMA B	50
Estudio región centromérica y pericentromérica del cromosoma B de centeno... 50	
Análisis funcional del centrómero del cromosoma B de centeno en metafase I ... 55	
Distribución y organización de satélites en la región distal del cromosoma B..... 58	
Localización subtelomérica de <i>ScCL11</i>	64
Inmunolocalización de CENH3 en el B de centeno	66
Análisis de la localización del ADN de orgánulos	68
MINICROMOSOMA B	72
Origen del minicromosoma B.....	72
Análisis estructural del minicromosoma B de centeno	74
Análisis del comportamiento y segregación del minicromosoma B.....	77
Inmunolocalización de CENH3 en el minicromosoma B	86
ISO-BL ASIMÉTRICO DE DELECCIÓN	89
Origen del Iso-BL asimétrico de delección.....	89
Análisis estructural en mitosis y formación del Iso-BL asimétrico de delección..... 90	
Análisis estructural del Iso-BL asimétrico de delección en paquitena	95
ANÁLISIS MEIÓTICO DEL CROMOSOMA B DE CENTENO Y DERIVADOS	98
Análisis meiótico de plantas con 2Bs	98
Análisis meiótico de plantas con 1B.....	111
Comparación del autoapareamiento y segregación de plantas con 2Bs y 1B.	124

Análisis meiótico de plantas con 2adlso-BL	126
Comparación del comportamiento de plantas con 2Bs y 2adlso-BL	135
NUEVAS VARIACIONES CROMOSÓMICAS	140
Adlso-BL translocado.....	140
Cromosoma B con inversión paracéntrica	143
DISCUSIÓN	147
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CROMOSOMA B DE CENTENO	148
MINICROMOSOMA B	157
ISO-BL ASIMÉTRICO DE DELECCIÓN	163
ANÁLISIS MEIÓTICO DEL CROMOSOMA B DE CENTENO Y DERIVADOS	169
NUEVAS VARIACIONES CROMOSÓMICAS.....	181
CONCLUSIONES	184
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CROMOSOMA B	185
MINICROMOSOMA B	186
ISOCROMOSOMA-BL ASIMÉTRICO DE DELECCIÓN.....	186
ANÁLISIS MEIÓTICO DEL CROMOSOMA B DE CENTENO Y DERIVADOS	187
NUEVAS VARIACIONES CROMOSÓMICAS.....	188
BIBLIOGRAFÍA	189

RESUMEN



* USDA-NRCS PLANTS Database / Hitchcock, A.S. (rev. A. Chase). 1950. Manual of the grasses of the United States. USDA Miscellaneous Publication No. 200. Washington, DC

Los cromosomas B (Bs) son cromosomas accesorios que aparecen en adición al grupo estándar de cromosomas (As) y están presentes numerosas especies de plantas, animales y hongos. Los Bs al no ser esenciales, presentan gran número de polimorfismos tanto numéricos como estructurales. Los Bs se mantienen en las poblaciones mediante mecanismos de acumulación o impulso que les permiten transmitirse en frecuencias superiores a las esperadas. El mecanismo de acumulación en centeno, es postmeiótico y se denomina no disyunción.

La estructura de algunos Bs, como el de maíz, ha sido estudiada en detalle y ha permitido resolver distintos interrogantes sobre su origen, comportamiento en las divisiones celulares y transmisión; por ese motivo se decidió realizar un análisis estructural y funcional del B de centeno. Se realizó un mapa físico de alta resolución en el estadio de paquitenia mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) de las secuencias *Bilby* (retrotransposón específico de los centrómeros de centeno) *ScCCS1*, *Sc192pb*, *ScCRW2*, *pBs301-1* y *Sc6C6-3* (secuencias de centeno con homología a distintas regiones del retrotransposón centromérico de trigo CRW); *CRRye* (parte del retrotransposón centromérico CR específico de centeno); *ScCL11-1* (retrotransposón de la familia *Copia* específico del B de centeno); ADN de orgánulos; *Sc9c130*, *Sc21c67*, *Sc26c38*, *Sc55-3.FGA*, *Sc63-2.FGA*, *E3900* y *D1100* (secuencias repetidas del brazo largo del B de centeno). Se observó que todas las secuencias centroméricas y pericentroméricas (salvo *pBs301-1* y *Sc6C6-3*) se encontraban además en los bloques heterocromáticos 2 y 3 del brazo largo del B. El análisis funcional de estas secuencias en metafase I, mostró que la organización del centrómero del B es diferente a la de los As. Las secuencias específicas del brazo largo se encuentran en la región distal del mismo, ocupando los bloques 2, 3, 4, 5 y 6. *ScCL11-1* es la única secuencia presente en las regiones centromérica y pericentroméricas (donde se produce la no disyunción) y en el bloque 6 (región controladora de la no disyunción). Por otra parte, el ADN de orgánulos se localiza en regiones centroméricas y pericentroméricas, así como en los bloques 1, 2, 3 y 4.

Se descubrió un minicromosoma derivado del B de centeno (miniB), cuya estructura y comportamiento fueron estudiados mediante FISH. El miniB es un cromosoma lineal formado por las regiones centromérica y pericentroméricas del B. Carece de brazos cromosómicos y en paquitenia puede apreciarse que su estructura es

asimétrica. El estudio de la descendencia de las plantas que lo portaban permitió conocer que el miniB no se encuentra en todas las espigas. Se analizó la presencia del miniB en metafases y núcleos interfásicos del meristemo apical radicular de plantas portadoras de 1 miniB, pudiéndose observar células con 0 o más de 1 miniB (18,75%), lo cual puede ser debido a la no disyunción de las cromátidas hermanas. En las células binucleadas del tapete también se encontraron células con 0 o más de 1 miniB (48%). Por otra parte, se realizó un análisis de la presencia de miniB en meiocitos en metafase I, observándose metafases con 0, 1, 2 y 3 miniBs, indicando que existe inestabilidad mitótica previa a la meiosis. En anafase I el miniB queda rezagado y en ocasiones separa cromátidas antes de tiempo. En diadas y tétradas el número de núcleos con miniB baja debido a la formación de micronúcleos. Tanto en mitosis como meiosis, en el centrómero del miniB se detectó una señal de CENH3 de menor tamaño que en As y Bs, lo cual puede ser responsable de su baja transmisión e inestabilidad.

Se ha descubierto otro nuevo derivado del B de centeno, al cual se ha denominado Iso-BL asimétrico de delección o deficiencia (adIso-BL). La planta donde se originó el adIso-BL desciende de una planta portadora de dos isocromosomas para el brazo largo del B (Iso-BL); en sus raíces se observaron diversos tipos de nuevos derivados del B, incluyendo un Iso-BL dicéntrico. Los dos centrómeros del dicéntrico eran funcionales y formaban puentes anafásicos, que al romperse dieron lugar al adIso-BL, siendo este el único derivado que se transmitió a la descendencia. El adIso-BL tiene una estructura muy similar a un Iso-BL normal en mitosis, pero en paquitena se observó que posee una delección distal en uno de sus brazos; más concretamente la delección se produjo en la zona media del bloque heterocromático 4, el cual para estabilizarse después de la rotura se amplificó 4 veces.

Se decidió comparar el B estándar con el adIso-BL, con el fin de conocer cuál de ellos se transmitiría mejor a la descendencia, lo que le haría mejor candidato para su uso como vector autónomo. Para ello se realizó un estudio mediante FISH del apareamiento y la segregación cromosómica en la profase I, metafase I, diadas y tétradas en plantas portadoras de 1B, 2Bs, 2adIso-BL y 2Iso-BL. En plantas con 2Bs, el apareamiento del B es asincrónico con respecto a los cromosomas A. Puede adelantar al inicio de la sinapsis a leptotena, puede no completarla en paquitena y puede ser asináptico. Se observó autoapareamiento de los Bs desde leptotena a paquitena,

pudiéndose identificar diferentes configuraciones de autoapareamiento en las cuales siempre están implicadas las regiones centromérica y pericentroméricas, así como la región distal del brazo largo. En plantas con 1B, este se encuentra como univalente, aumentando significativamente el autoapareamiento con respecto a las plantas con 2Bs, además parecen formarse quiasmas intracromosómicos, de manera que la morfología que adopta el B en metafase I se ve alterada. Por otra parte, en plantas con 2adIso-BL, el adIso-BL no es tan asincrónico en el inicio del apareamiento, no muestra autoapareamiento y el porcentaje de apareamiento es significativamente superior al de 2Bs en cigotena y en paquitena. En metafase I el porcentaje de bivalentes del adIso-BL (70,77%) es significativamente superior al de 2 Iso-BL (46,77%) y 2Bs (37,96%), lo cual se ve reflejado en diadas y tétradas, donde se observa mayor número de núcleos de diada (99,02%) y de tétrada (82,02%) portadores de adIso-BL que de B estándar (72,78% y 68,15%).

El estudio de la sinapsis y apareamiento, ha permitido descubrir y describir dos nuevas variaciones estructurales del B de centeno: un B con una inversión paracéntrica y un adIso-BL con una translocación con dos cromosomas A, lo cual hace que su transmisión sea significativamente menor a la de un adIso-BL normal.

ABSTRACT



B Chromosomes (Bs) are accessory chromosomes that appear in addition to the standard set of chromosomes (As). They are present in numerous species of plants, animals, and fungi. Bs are maintained in populations by accumulation or impulse mechanisms, allowing them to be transmitted at higher than expected frequencies. In grasses, the accumulation mechanism is postmeiotic, and it is called nondisjunction. Furthermore, as B chromosomes are not essential, they show a large number of both numerical and structural polymorphisms.

Studies of the maize B structure have allowed to solve questions about its origin, behaviour and transmission; for that reason, it was decided to carry out a structural and functional analysis of rye B. High-resolution mapping was performed by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) at pachytene with following probes: *Bilby* (retrotransposon specific of rye centromeres); *ScCCS1*, *Sc192pb*, *ScCRW2*, *pBs301-1* and *Sc6C6-3* (rye sequences with homology to different regions of the wheat centromeric retrotransposon CRW); *CRRye* (CR centromeric retrotransposon specific of rye); *ScCL11-1* (*Copia* retrotransposon specific of the rye B); Organellar DNA; *Sc9c130*, *Sc21c67*, *Sc26c38*, *Sc55-3.FGA*, *Sc63-2.FGA*, *E3900* and *D1100* (repeat sequences of the long arm of rye B). All the centromeric and pericentromeric sequences (except *pBs301-1* and *Sc6C6-3*) were also found in heterochromatic blocks 2 and 3. The functional analysis of these same sequences at metaphase I has revealed that the organization of the B centromere is different to As centromeres. The specific sequences of the long arm are found in the distal region of the arm, occupying blocks 2, 3, 4, 5 and 6. *ScCL11-1* is the only sequence present in the centromeric and pericentromeric regions (nondisjunction region) and in block 6 (nondisjunction controlling region). On the other hand, organellar DNA is located in the centromeric and pericentromeric regions, as well as in blocks 1, 2, 3 and 4. Most of the centromeric sequences are also found in an interstitial region of the long arm, which suggests a dicentric origin for the rye B; however, no CENH3 signal was seen outside the centromere.

A minichromosome derived from the rye B has been discovered (miniB), whose structure and behaviour were studied by FISH. The miniB is a linear chromosome formed by centromeric and pericentromeric regions of the B. It lacks chromosomal arms and at pachytene its asymmetric structure could be seen. The study of progeny plants allowed to know that the miniB is not found in all spikes. The presence of the miniB was

analysed at root meristems metaphase and interphase nuclei of plants carrying 1 miniB; being able to observe cells with 0 or more than 1 miniB (18,75%), possibly due to non-disjunction of the sister chromatids. Cells with 0 or more than 1 miniB (48%) were also found in the binucleated tapetal cells. On the other hand, an analysis of the presence of the miniB in meiocytes at metaphase I was performed, observing metaphases with 0, 1, 2 and 3 miniBs, indicating that there is mitotic instability prior to meiosis. At anaphase I the miniB lags and sometimes separates chromatids prematurely. At dyads and tetrads, the number of nuclei with miniB decreases due to the formation of micronuclei. In both mitosis and meiosis, a CENH3 signal of smaller size than in As and Bs was detected in the miniB centromere. This smaller size may be responsible for its low transmission and instability.

Another new derivative of rye B has been discovered, it has been called asymmetric deficiency Iso-BL (adIso-BL). This new derivative derives from a plant carrying 2 Iso-BL, and several new B derivatives were observed in its roots, including a dicentric Iso-BL. The two centromeres of the dicentric chromosome were functional and sometimes formed anaphasic bridges. The breakage of these bridges allowed the formation of the adIso-BL, being the only derivative that was transmitted to the offspring. In mitosis, the adIso-BL has a very similar structure compared to Iso-BL, but at pachytene it was observed that it has a distal deletion in one of its arms. More specifically, the deletion occurred in the middle region of heterochromatic block 4 and part of this block was amplified four times to stabilize the chromosome end after the deletion.

It was decided to compare the standard B with the adIso-BL, in order to know which of them would be better transmitted to the offspring, and would be the best candidate to be used as an autonomous vector. To this end, a FISH study of chromosomal pairing and segregation was carried out at prophase I, metaphase I, dyads and tetrads of plants carrying 1B, 2Bs, 2adIsos-BL and 2Isos-BL. In the standard Bs, it was observed that the pairing is asynchronous with respect to the As, even sometimes an incomplete synapsis can happen. Bs self-pairing was observed from leptotene to pachytene; those chromosomes adopt different configurations of self-pairing involving the centromeric and pericentromeric regions as well as the distal region of the long arm. In 1B plants, B univalents self-pairing increases significantly with respect to plants with

2Bs, this fact produces the formation of intrachromosomal chiasmata, causing an altered B morphology.

On the other hand, adIso-BL is less asynchronous in pairing than standard Bs, does not show self-pairing, and the percentage of paired chromosomes is significantly higher than the percentage founded for 2Bs at zygotene and pachytene. At metaphase I, the percentage of bivalents of adIso-BL (70,77%) is significantly higher than that of 2 Iso-BL (46,77%) and 2Bs (37,96%). This fact is reflected in dyads and tetrads, where it can be observed that there is a greater number of nuclei carrying adIso-BL (99.02% and 82,02%) than carrying Bs (72,78% and 68,15%).

The study of chromosomal pairing and synapsis made possible to discover and describe two new structural rye B variations: a B chromosome with a paracentric inversion and an adIso-BL with a translocation with two A chromosomes, that reduces its transmission.

INTRODUCCIÓN



EL CENTENO

El centeno (*Secale cereale* L.) es una monocotiledónea anual de la familia *Poaceae* (gramíneas), muy resistente a cambios de temperatura y humedad, capaz de adaptarse a gran variedad de ambientes. Puede crecer incluso en altitudes superiores a los 3000 metros sobre el nivel del mar. Su altura puede oscilar entre 1 y 2 metros según la variedad. Su tallo es largo, flexible y hueco, con nudos estructurales, que se erige de unas raíces fasciculadas muy desarrolladas. Sus hojas son estrechas y glabras, alternas a lo largo del tallo. Sus inflorescencias son espigas que pueden llegar a una longitud de entre 10 y 15 cm; pueden tener un número variable de espigas, las cuales se consideran hermanas. A su vez estas espigas están compuestas por espiguillas sin pedúnculo, acabadas en una arista. Cada espiguilla está formada por dos flores, una pequeña y una grande, que contienen tres estambres y un gineceo (FIGURA 1). Estas flores son asincrónicas, siendo la flor más grande la más madura, pero la sincronía se mantiene entre de las tres anteras de cada flor. Además, las espigas poseen un gradiente de maduración, de forma que las espiguillas del centro son las más maduras y hacia los extremos las espiguillas están en los estadios más tempranos de la meiosis (FIGURA 1).

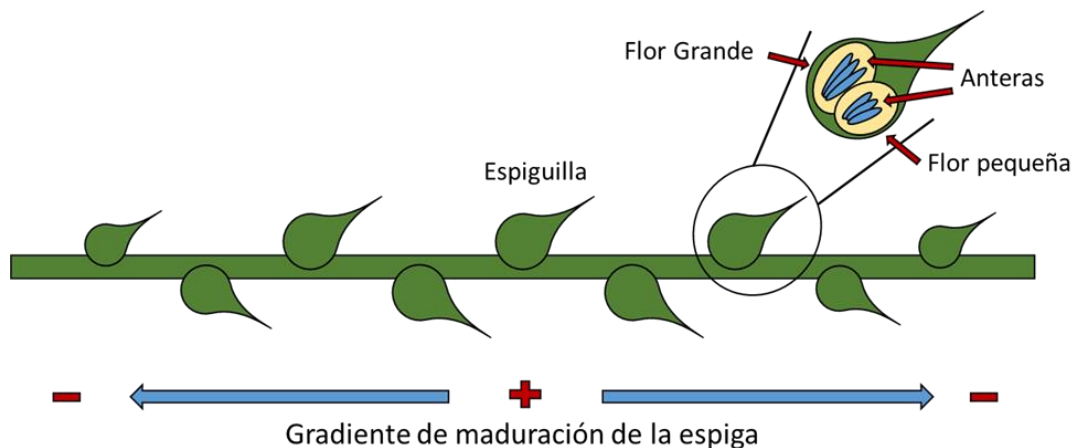


FIGURA 1. Esquema de una espiga de centeno y su gradiente de maduración. La ampliación representa una espiguilla con una flor grande y una pequeña, estando formadas cada una de ellas por tres anteras y un gineceo (que no se representa).

LA MEIOSIS

La meiosis es un tipo de división celular especializada de organismos con reproducción sexual, que produce la formación de gametos con dotación cromosómica haploide a partir de células germinales diploides, permitiendo la restauración del número cromosómico de la especie después de la fecundación (Zickler y Kleckner, 1998). Además, favorece la formación de nuevas combinaciones alélicas, ampliando la diversidad genética. La meiosis se produce después de una ronda de replicación (también denominada fase S), y consiste en dos divisiones celulares consecutivas que permiten la reducción del número cromosómico dando lugar a cuatro productos meióticos haploides (Zickler y Kleckner, 1998; Gao y Colaiácovo, 2018). Las dos divisiones son: una reduccional (I) y otra ecuacional (II); y ambas se subdividen en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase, siendo la profase I, la fase más larga e importante, puesto que en ella se van a producir los procesos de apareamiento, sinapsis y sobrecruzamiento. Esta fase a su vez se subdivide en 5 estadios: leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis.

En la primera división meiótica o división reduccional, los cromosomas homólogos, provenientes de cada uno de los parentales, forman bivalentes. Para que se dé la formación de los bivalentes, es necesario que se produzca alineación cromosómica, apareamiento, sinapsis, y posterior recombinación homóloga o intercambio recíproco de material genético, produciéndose al menos un sobrecruzamiento por cromosoma, siendo el quiasma la manifestación citológica del mismo (Lacadena, 1996). En metafase I los bivalentes se sitúan en la placa ecuatorial y los centrómeros de cada cromosoma homólogo coorientan hacia distintos polos celulares, y en anafase I los homólogos segregan a polos celulares opuestos. Posteriormente se da la segunda división meiótica o división ecuacional donde los haces de microtúbulos se unen al centrómero de cada cromátida, de manera que en este caso lo que coorienta y se separa son las cromátidas hermanas, dando lugar a cuatro productos meióticos con una dotación cromosómica haploide.

Apareamiento, sinapsis y recombinación

Los extremos distales de los cromosomas o regiones teloméricas se encuentran dispersas por el núcleo antes de comenzar la meiosis. Al comienzo de la profase I, más concretamente al inicio de leptotena, los extremos distales de los cromosomas se asocian a la superficie interna de la membrana nuclear por medio de proteínas que les van a servir de anclaje y de nexo con el citoesqueleto (Bhalla y Dernburg, 2008). Esta interacción con el citoesqueleto va a permitir que en algunas especies (como el trigo y el centeno) se produzca el desplazamiento de las regiones teloméricas de los cromosomas a una pequeña región nuclear, donde se van a agrupar, formando una configuración cromosómica polarizada conocida como ramillete o *bouquet*. Este movimiento facilita que haya mayor probabilidad de interacción entre cromosomas homólogos y el reconocimiento entre los mismos (Naranjo, 2012; Zickler y Kleckner, 2015). Además de esta polarización telomérica, también debe existir una homología de secuencias en el ADN; si existe algún tipo de interacción entre cromosomas no homólogos debe ser eliminada antes de continuar el proceso de meiosis (Kleckner, 1996). Una vez reconocidos los homólogos, su asociación física cada vez es mayor; esta asociación puede depender de la recombinación o de mecanismos independientes de la recombinación según la especie, es decir, estos mecanismos pueden depender o no de las roturas de doble hebra (DSB) programadas (Cahoon y Hawley, 2016). Estas DSBs marcan el inicio de la recombinación, ya que al repararse podrán resultar en un sobrecruzamiento. La reparación de estas DSBs se controla para poder asegurar al menos la presencia de un quiasma por par cromosómico (Naranjo, 2015).

Una vez producido el alineamiento y apareamiento, los pares de homólogos se asocian de manera más íntima en un proceso conocido como sinapsis. La sinapsis comienza en cigotena y finaliza en paquitena, durante este período se forma una estructura proteica denominada complejo sinaptonémico, que se sitúa entre el par de homólogos a lo largo de toda su longitud (Mercier *et al.*, 2015; Zickler y Kleckner, 2015). El complejo sinaptonémico es una estructura tripartita que consta de dos elementos laterales (EL), un elemento central (EC) y las denominadas fibras transversales (FT) (FIGURA 2), que permiten conectar los cromosomas homólogos (Gao y Colaiácovo, 2018).

La recombinación se da por finalizada cuando el complejo sinaptonémico queda formado totalmente, al inicio de paquitena, fase en la que se producen los sobrecruzamientos (Lacadena, 1996; Pattabiraman *et al.*, 2017). Entonces, el complejo sinaptonémico comienza a desensamblarse y los homólogos quedarán unidos únicamente en aquellos lugares donde se ha producido recombinación, apreciándose como quiasmas en diplotena, estadio en el cual el complejo sinaptonémico ha sido desensamblado por completo.

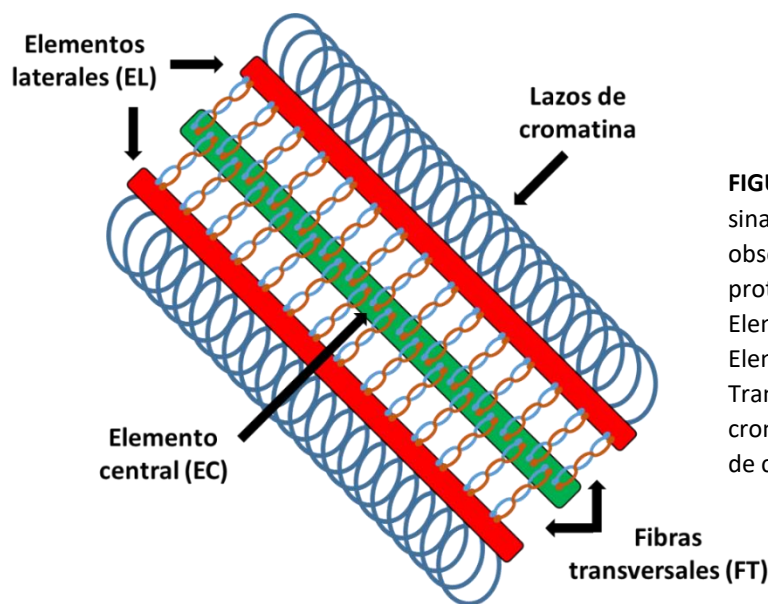


FIGURA 2. Esquema del complejo sinaptonémico, donde se observan las estructuras proteicas que lo conforman: Elementos Laterales (EL), Elemento Central (EC) y Fibras Transversales (FT). Los lazos de cromatina están anclados y salen de cada Elemento Lateral.

EL CENTRÓMERO

El centrómero es un dominio cromosómico formado por secuencias altamente repetidas que pueden llegar a ocupar megabases de ADN, y es necesario para garantizar la correcta transmisión del genoma durante la división celular. Tiene un papel central en la prevención de aneuploidias, orquestando el ensamblaje de los diversos componentes necesarios para la segregación cromosómica. Sin embargo, el centrómero también adopta una estructura compleja que le hace susceptible a ser sitio de reordenaciones cromosómicas (Barra y Fachinetti, 2018). El centrómero es capaz de unirse a microtúbulos durante la división celular gracias a una compleja estructura proteica denominada cinetocoro. Zhang y Dawe (2012) observaron una correlación entre el tamaño del genoma de la especie y el tamaño del centrómero, viendo que especies con genomas grandes tendían a tener centrómeros más grandes (como es el caso del

centeno). Dependiendo del tamaño del centrómero, varía el número de haces de microtúbulos que pueden unirse a ellos, siendo este número específico de cada especie, pudiendo oscilar entre uno y ocho haces de microtúbulos por cinetocoro (Peterson y Ris, 1976; Jensen, 1982). Además, el complejo centrómero-cinetocoro permite la cohesión de cromátidas hermanas en meiosis hasta anafase II y está implicado en el reconociendo de cromosomas homólogos en organismos en los que el apareamiento es independiente de recombinación (Brar y Amon, 2008).

La función centromérica y la estructura del cinetocoro se han conservado a lo largo de la evolución, sin embargo, a nivel de secuencias de ADN la evolución es continua, siendo la composición de estas muy diversas entre especies e incluso entre los cromosomas de una misma especie; a este fenómeno se le denominó paradoja del centrómero y fue acuñado por primera vez por Henikoff *et al.* (2001). Las gramíneas son un ejemplo de la paradoja del centrómero, pudiéndose diferenciar en ellas dos tipos diferentes de secuencias centroméricas: retrotransposones centroméricos y satélites centroméricos. Mientras que los primeros están más conservados entre especies, los segundos son muy diferentes entre especies muy emparentadas (Henikoff *et al.*, 2001). Los retrotransposones centroméricos (CRs) en las gramíneas pertenecen a la familia *Ty3/gypsy*, y se localizan en el centrómero y en las regiones de heterocromatina pericentroméricas. En el caso del centeno, además de CRs *Ty3/gypsy*, también se ha encontrado un retrotransposón centromérico descrito como tipo *Ty1/copia* llamado *Bilby* (Francki, 2001).

CENH3

Generalmente se acepta que la función centromérica está determinada epigenéticamente por nucleosomas especiales que contienen una variante de la histona H3 (Perpelescu y Fukagawa, 2011), denominada CENH3 (llamada CENP-A en humanos, Cnp1 en levaduras y CID en *Drosophila*). CENH3 reemplaza parcialmente a la histona H3 en las regiones centroméricas (Feng *et al.*, 2019). Los nucleosomas con CENH3 son la base para la formación del cinetocoro y son los marcadores más importantes para la función centromérica en eucariotas (Allshire y Karpen, 2008); CENH3 se detecta únicamente en centrómeros activos, estando ausente en los centrómeros que han

perdido su actividad (Warburton *et al.*, 1997). Fue descrita por primera vez en humanos por Earnshaw y Rothfield (1985) y está presente en todos los eucariotas, salvo en el protozoo *Trypanosoma* (Talbert y Henikoff, 2009).

LOS CROMOSOMAS B

Los cromosomas B (Bs) son cromosomas supernumerarios que aparecen en adición al grupo estándar de cromosomas (As) en muchas especies de plantas, animales y hongos (Jones y Rees, 1982); más concretamente han sido observados en 2828 especies (D'Ambrosio *et al.*, 2017). Fueron descritos por primera vez en el insecto *Metapodius* por Wilson (1907a, b), mientras que en plantas la primera evidencia de su existencia fue en centeno, descrito por Gotoh (1924), y posteriormente Kuwada (1925) los identificó en maíz. Los Bs son componentes dispensables del genoma y en general no confieren ninguna ventaja a los organismos que los portan, pero reducen el vigor y la fertilidad cuando aparecen en números altos. Los Bs poseen, dependiendo de la especie, distintos mecanismos de acumulación o impulso que les permiten transmitirse en frecuencias mayores que las mendelianas (Jones y Rees, 1982; Jones, 1991; Jones, 2018). Estos mecanismos pueden ser mitóticos como es el caso de *Crepis capilaris*, meióticos como es el caso de *Eyprepocnemis plorans* o postmeióticos como en el caso de las gramíneas (Gregory, 2005). Por otro lado, aunque los cromosomas B sean muy diferentes entre sí y su estructura varíe mucho entre las diferentes especies, se considera que todos derivan de cromosomas A y evolucionan de manera diferente a ellos (Camacho *et al.*, 2000). En general, la actividad replicativa de los cromosomas B tiene una diferente cronología con respecto a los cromosomas A (Marschner *et al.*, 2007). A los cromosomas B se les ha considerado genéticamente inertes, ya que están formados mayoritariamente por secuencias repetidas y, en menor medida, por pseudogenes o genes no funcionales. Estudios recientes de transcriptómica han revelado la existencia de genes ribosomales activos en *Crepis capilaris* y en *Eyprepocnemis plorans* (Leach *et al.*, 2005; Ruiz-Estévez *et al.*, 2012). Aunque, en el caso de *E. plorans* el ARNr transcrito de los cromosomas B representan una proporción muy pequeña si se compara con los producidos por los cromosomas A (Ruiz-Estévez *et al.*, 2014).

EL CROMOSOMA B DE MAÍZ

El maíz (*Zea mays* L.) tiene una dotación cromosómica de 20 cromosomas ($2n=20$) (1C~2067 Mbp), y un número de Bs que puede llegar hasta 34, lo cual ha sido observado en material experimental (Jones and Rees, 1982). Normalmente cada cromosoma B suele representar aproximadamente el 4% del volumen cromosómico total, además el número de Bs presentes esta correlacionado con el tamaño de los knobs o bloques heterocromáticos (Rosato *et al.*, 1998).

El B de maíz fue estudiado ampliamente por Longley (1927). McClintock en 1933 fue la primera que describió la estructura del B en paquitena, distinguiendo los diferentes cromómeros que forman los dos brazos de este cromosoma. Ward (1973) analizó más en detalle la estructura del B en paquitena, describiendo los bloques heterocromáticos y las diferentes subunidades que forman el brazo largo del B. Por otro lado, Roman (1947, 1948) desarrolló translocaciones del B de maíz con los As, que han permitido caracterizar mucho mejor el B a nivel de marcadores genéticos asociados a fenotipos.

El B de maíz se compone mayoritariamente de ADN altamente repetido (satélites y secuencias relacionadas con retroelementos), en los cromosomas A estas secuencias están principalmente localizadas en el centrómero o adyacentes a él (Jones *et al.*, 2008). Aunque su origen aún no se ha podido esclarecer, se han realizado diversos estudios a nivel de secuencia (Alfenito y Birchler, 1993; Stark *et al.*, 1996; Cheng y Lin, 2003; Cheng y Lin, 2004; Jin *et al.*, 2005; Lamb *et al.*, 2005; Revisado en Marques *et al.*, 2018). Estos estudios han permitido encontrar secuencias específicas del B que se localizan en el centrómero, y en otras posiciones distintas del centrómero, como es en el brazo largo. Algunas secuencias mostraban señales de FISH (Hibridación *in situ* fluorescente) tanto en el brazo largo como en el centrómero, como es el caso de la repetición *CL-repeat* (Cheng y Lin, 2004; Cheng, 2010). Hasta el momento, el mapeo de estas secuencias específicas del B y otras también presentes en los As de maíz se ha realizado gracias a la combinación de FISH y otras técnicas de hibridación *in situ*, con el uso de translocaciones del B de maíz. Por otro lado, al estar caracterizado el B atendiendo a los bloques heterocromáticos que se observan en paquitena, se facilita el estudio de la distribución de distintas secuencias mediante técnicas moleculares. De esta manera se consiguió

desarrollar un mapa detallado del B de maíz (Lamb *et al.*, 2005) (FIGURA 3). Kato *et al.* (2004), observaron que, en este cromosoma, algunas secuencias de ADN propias del centrómero se encontraban en localizaciones diferentes a él. Posteriormente Lamb *et al.* (2005), estudiaron si estas secuencias centroméricas localizadas en otras regiones cromosómicas estaban asociadas con CENH3; descubriendo que dichas secuencias no poseían función centromérica cuando estaban presentes en lugares distintos a la región centromérica. Estos resultados les permitieron concluir que la secuencia de ADN es insuficiente por sí misma para determinar la función centromérica.

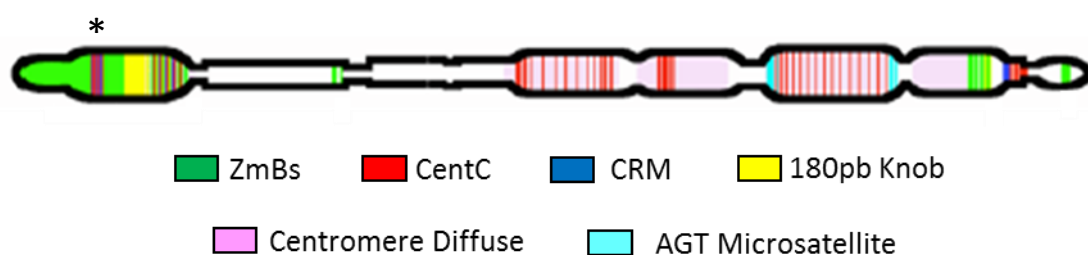


FIGURA 3. Localización de las secuencias repetidas que forman el cromosoma B de maíz acorde a los bloques heterocromáticos que se observan en paquítina (Lamb *et al.*, 2005). La posición del centrómero está marcada por un asterisco.

EL CROMOSOMA B DE CENTENO

El centeno (*Secale cereale L.*) tiene una dotación cromosómica de 14 cromosomas ($2n=14$) (1C ~ 7,917 Mbps) y su número de cromosomas B puede oscilar entre 0 y 8 (1C ~ 580 Mbps cada uno). El cromosoma B de centeno además de ser el primer cromosoma B descubierto en plantas, es uno de los modelos más empleados para la investigación de cromosomas B.

Estructura del cromosoma B de centeno

Muntzig en 1944, describió el cromosoma B de centeno en mitosis, como un cromosoma subteloicéntrico, con el brazo largo aproximadamente 5 veces mayor que el corto. Estudios de Lima de Faria (1952 y 1963) describieron estructuralmente el B de centeno de diferentes variedades geográficas en el estadio meiótico de paquítina (FIGURA 4). Observó que este tipo de cromosoma tiene una morfología muy

característica: posee un brazo corto muy pequeño, de manera que es fácilmente diferenciable del brazo largo en cuanto a tamaño. Además, los Bs tienen unos patrones de cromómeros característicos en cada brazo. De esta manera, Lima de Faria comparó la estructura de los Bs de las diferentes variedades geográficas de centeno y pudo deducir que, aunque poseían ligeras diferencias en sus patrones de cromómeros, todos ellos tenían un origen evolutivo común. Posteriormente, Maques *et al.* en 2013, describieron que, los Bs mantienen una estructura molecular similar a nivel de subespecie, en las variedades cultivadas de centeno, lo cual sugiere que el B de centeno tiene un origen monofilético.

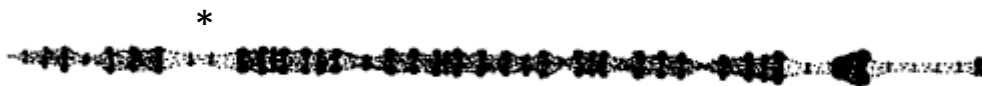


FIGURA 4. Patrón estructural en paquitenia del cromosoma B de Corea (Lima de Faria, 1963). La posición del centrómero está indicada por un asterisco.

Evolución del cromosoma B de centeno

Martis *et al.*, (2012) estimaron que el B de centeno tiene una edad de en torno a 1.1–1.3 millones de años, coincidiendo con el origen del género *Secale* hace 1.7 millones de años. Recientemente se ha comparado la composición de ADN de los As y el B de centeno, aislados por citometría de flujo y secuenciados utilizando tecnologías de nueva generación. Gracias a estos estudios se pudo apreciar que el B contiene pseudogenes derivados de distintos genes de cromosomas A (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013), además estos estudios permitieron conocer que el B proviene principalmente de los cromosomas 3RS y 7R, y que posee gran cantidad de repeticiones de secuencias específicas del B y ADN de orgánulos, tanto de cloroplastos como mitocondrias (Martis *et al.*, 2012). Estas observaciones han llevado a Martis *et al.* (2012) a elaborar el siguiente modelo sobre el origen del B de centeno (FIGURA 5). Duplicaciones segmentarias en los cromosomas A indujeron translocaciones recíprocas entre los mismos, principalmente entre los cromosomas 3RS y 7R (FIGURA 5.1). Como resultado se obtuvo un cromosoma proto-B (FIGURA 5.2) de reducido tamaño que no apareaba con los cromosomas de los que derivó. Esta reducción en la recombinación con los

cromosomas donadores fue el punto de partida para la evolución independiente del proto-B. Debido a que un aumento en la dosis génica puede ser perjudicial para un organismo, la expresión de los genes parálogos presentes en el proto-B debió de ser modificada mediante mecanismos epigenéticos. Probablemente, los genes en el proto-B fueron primero silenciados y, posteriormente, degeneraron por acumulación de mutaciones e inserciones de secuencias derivadas de los As y de los genomas de los orgánulos citoplasmáticos (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013). Por último, se produjo una amplificación de secuencias repetidas específicas del B, principalmente en la región pericentromérica y en la región distal del brazo largo (Klemme *et al.*, 2013) (FIGURA 5.3), que son responsables del mecanismo de acumulación del B de centeno durante la gametogénesis.

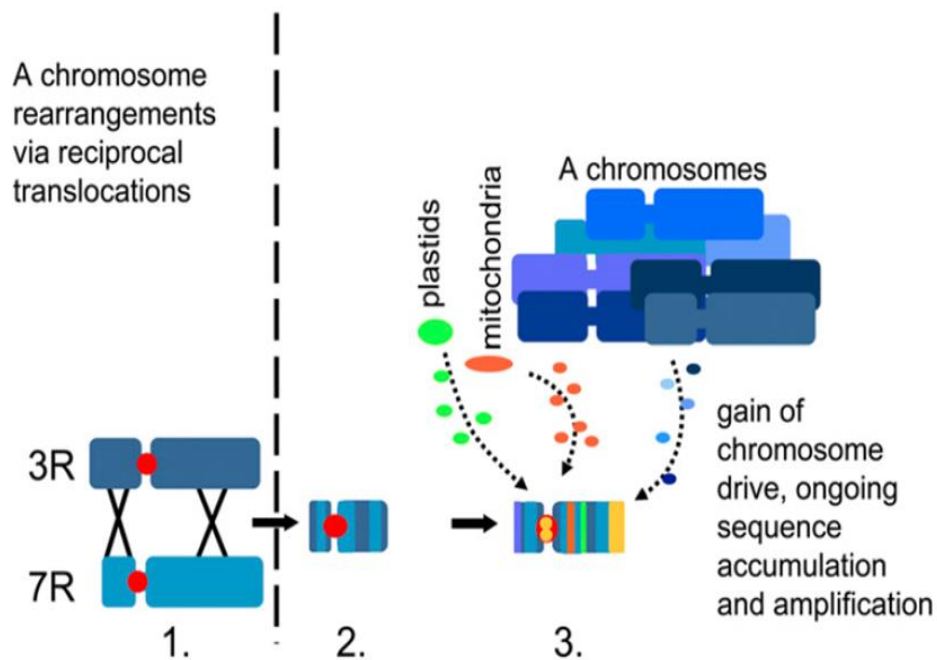


FIGURA 5. Modelo sobre el origen y evolución del cromosoma B de centeno (Martis *et al.*, 2012).

Herencia del cromosoma B de centeno

El mecanismo de acumulación o impulso del B de centeno es postmeiótico y no mendeliano. Fue descrito por Hasegawa (1934) en la primera mitosis del polen, donde el B no separa cromátidas en anafase, sino que migra con ambas al núcleo generativo; por ese motivo a este fenómeno se le conoce como no disyunción. Posteriormente, el B

separa cromátidas (FIGURA 6 A-C), y en la segunda mitosis del polen, el núcleo generativo se divide para dar lugar a dos núcleos espermáticos, cada uno portador de dos cromosomas B en vez de un único B como la célula de la que provenía (FIGURA 6 D-E). Más adelante, Hakansson (1948) también observó este fenómeno en la gametogénesis femenina; se produce durante la primera mitosis de formación del saco embrionario, donde el cromosoma B sufre no disyunción y migra con sus dos cromátidas a un polo celular que posteriormente dará lugar al óvulo. En centeno, por tanto, se ha observado la no disyunción del B en las mitosis postmeióticas tanto en el lado femenino como en el masculino, y además existe una segregación preferencial del cromosoma B a los gametos.

Las dos cromátidas del B se mantienen unidas en la primera mitosis del polen por la región pericentromérica de ambos brazos. Esta zona contiene un satélite específico de este cromosoma, denominado *ScCL11*, intercalado con el retrotransposón *Bilby*, que es el principal componente de los centrómeros de los cromosomas A de centeno. La acumulación de secuencias produce que la región pericentromérica del B sea más extensa que la de los As (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012). En *Schizosaccharomyces pombe* el ADN repetido que delimita el cinetocoro es esencial para la cohesión, lo que sugiere que la heterocromatina es necesaria para la cohesión de cromátidas hermanas (Bernard *et al.*, 2001). En el caso del cromosoma B, el mayor tamaño de la región pericentromérica aumentaría la cohesión de dicha región cuando tiene lugar el fenómeno de no disyunción. Además, se ha observado que el huso es asimétrico en la primera mitosis del polen (FIGURA 6; Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012), de forma que la placa ecuatorial está más cercana al polo generativo que al vegetativo. El B, al no separar cromátidas, quedaría en la placa ecuatorial y sería incorporado al núcleo generativo al formarse la membrana nuclear (FIGURA 6 A-C). Por consiguiente, sería una combinación del fenómeno de no disyunción y la presencia de un huso asimétrico lo que resultaría en la segregación preferencial del B de centeno al núcleo generativo.

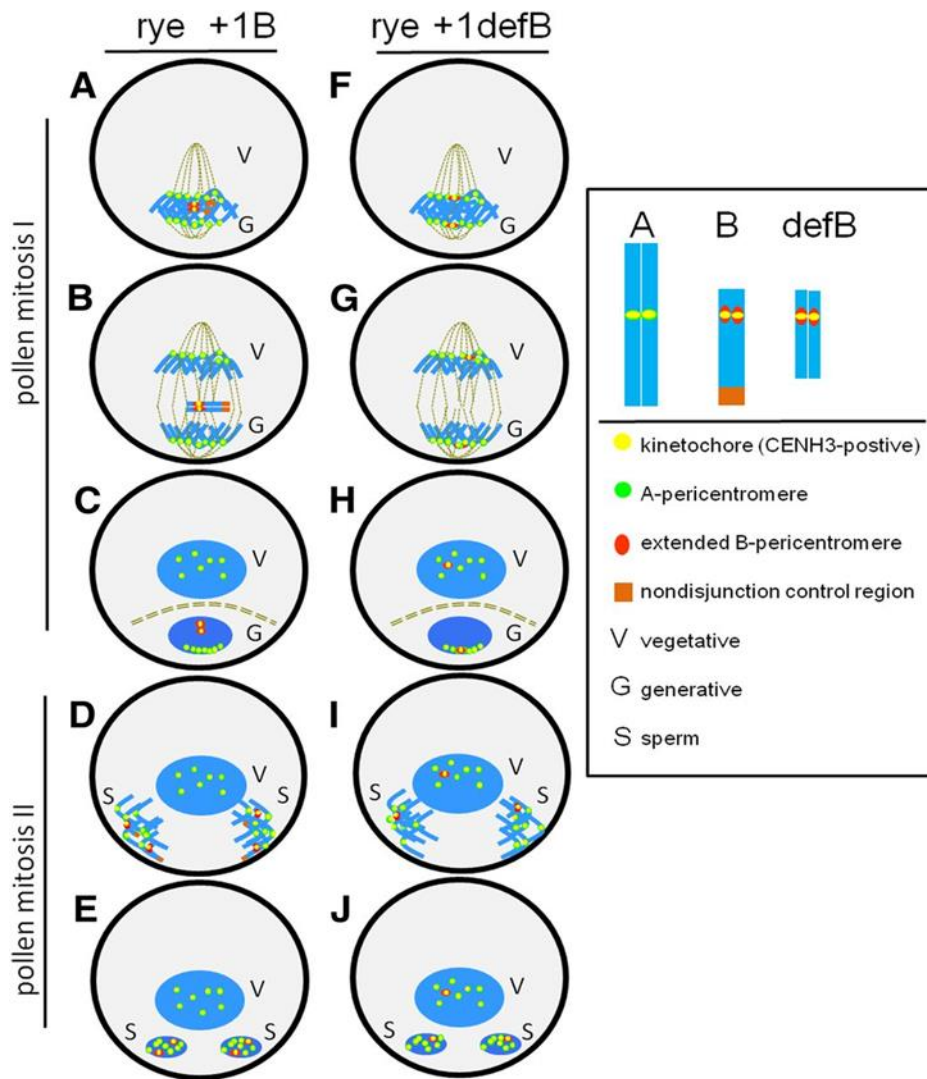


FIGURA 6. Modelo del mecanismo de acumulación del cromosoma B de centeno en la gametogénesis masculina (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012). defB = B deficitario del extremo distal del brazo largo.

Aunque la no disyunción se produce en las regiones pericentroméricas, el control genético de este mecanismo reside en un bloque heterocromático localizado en la parte distal del brazo largo del B. Los Bs que carecen de esta zona no experimentan no disyunción (FIGURA 6F), pero cuando un B estándar está presente en la misma célula provee la función en *trans* necesaria para que se dé la no disyunción. Por tanto, este proceso está controlado por factores que se localizan o proceden de la región distal del brazo largo (Lima de Faria, 1962). Se desconoce la identidad de los factores de la región heterocromática distal del brazo largo del B que controlan este proceso. Esta región tiene una peculiaridad, y es que tiene un ciclo de condensación diferente al resto de regiones heterocromáticas, descondensándose en interfase. Además, presenta tanto las

modificaciones de histonas específicas de heterocromatina (H3K27me2 y H3K27me3), como la modificación específica de eucromatina (H3K4me3) (Carchilan *et al.*, 2007). A nivel de secuencia, dicha región distal está compuesta mayoritariamente por dos familias de secuencias repetidas específicas del B: *D1100* (Sandery *et al.*, 1990) y *E3900* (Blunden *et al.*, 1993). Ambas secuencias se transcriben en ARNs no codificantes principalmente en anteras (Carchilan *et al.*, 2007).

Transcripción en el cromosoma B de centeno

Al igual que en cromosomas B de otros organismos, en el cromosoma B de centeno se ha observado también cierta actividad transcripcional. Los satélites distales mencionados anteriormente, de los que provienen la mayoría de los transcritos del B, carecen de marcos de lectura abiertos (ORFs) y se supone que se transcriben a partir de ORFs de retroelementos que están intercalados en esta región distal con los satélites. Producen transcritos con tamaños heterogéneos, lo que evidencia que estos ARNs ejercerían su función a nivel estructural o catalítico y no codificarían para proteínas. Por todo ello, se ha sugerido que estos ARNs producidos a partir de satélites distales serían los factores responsables del mecanismo de la no disyunción en la región pericentromérica (Carchilan *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que este mecanismo este controlado por algún pseudogén embebido entre las familias de satélites distales, ya que se ha encontrado que alrededor de un 15% de los pseudogenes presentes en el B de centeno se transcriben (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013). Recientemente se han descubierto nuevos transcritos procedentes de pseudogenes y un transcrito que da lugar a una proteína implicada en el silenciamiento génico, similar a Argonauta, que además posee una actividad *in vitro* muy similar a la producida por los cromosomas A (Ma *et al.*, 2017). Estos resultados, evidencian que los cromosomas B pueden tener una cierta importancia en la regulación génica o en otros procesos celulares (Navarro-Domínguez *et al.*, 2017).

Transmisión del cromosoma B de centeno (poblaciones)

Los cromosomas B están ampliamente distribuidos en las poblaciones de centeno. Las frecuencias de transmisión más altas de cromosomas B se encuentran en las variedades procedentes de Japón (JNK), que tienen frecuencias de transmisión superiores al 90% (Kishikawa, 1965). Las poblaciones coreanas tienen una menor tasa de transmisión de cromosomas B que las poblaciones japonesas, pero poseen porcentajes de transmisión mayores que el resto de poblaciones. La presencia de Bs en estas poblaciones coreanas fue descrita por Müntzing (1954; 1957a, b) y Lee y Min (1965). Dentro de las diferentes poblaciones, se han encontrado variaciones en la frecuencia de los cromosomas B, apreciándose que esta variación no estaba relacionada con ninguna clina geográfica o ecológica (Lee 1963, 1966, 1976, 1981; Lee y Min 1965, 1966, 1968; Romera *et al.*, 1989).

Los cultivares más estudiados son Paldang, Puyo, Gumsan 3 y Gumsan 4, los cuales mantienen sus frecuencias de cromosomas B aun cambiando el ambiente de crecimiento, permitiendo observar un polimorfismo estable para los Bs a diferentes frecuencias independientemente del ambiente (Romera *et al.*, 1989). En el presente trabajo se utilizaron las variedades de Puyo y Paldang que poseen unas frecuencias de cromosomas B en torno al 55% y 20% respectivamente.

Otros estudios, como los realizados por Jiménez *et al.* (1997), permitieron seleccionar líneas con genotipos de alta (H) o baja (L) transmisión del B, basadas en el apareamiento de este cromosoma en metafase I, en líneas de centeno coreano. Observaron que los Bs de la línea L tenían una frecuencia de formación de bivalentes de los cromosomas accesorios de un 20% en metafase I, mientras que en la línea H era de más de un 90% (Jones *et al.*, 2008). Posteriormente, Puertas *et al.* (1998) afirman que a lo que se había denominado “genotipos” para la tasa de transmisión son en realidad lugares de formación de quiasmas, y proponen que el B de centeno modula su propia tasa de transmisión y, por tanto, su equilibrio en las poblaciones.

La meiosis del cromosoma B de centeno

Diversos estudios en varios organismos han analizado el comportamiento sináptico del cromosoma B durante la profase I, con el fin de visualizar el complejo sinaptonémico mediante microscopía electrónica de transmisión (Khazanehdari y Jones, 1996). En centeno, más concretamente en el cultivar coreano Puyo, Santos *et al.* (1993) han realizado múltiples estudios del cromosoma B en paquítina, analizando su comportamiento cuando estaba presente como univalente. Observando que la sinapsis comenzaba por las zonas distales del cromosoma y que, en algunas ocasiones, el B aparecía retrasado en el apareamiento con respecto a los cromosomas A; además describieron autoapareamiento del cromosoma B, adoptando este una serie de configuraciones en paquítina (FIGURA 7).



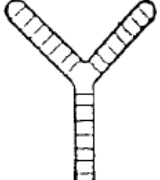
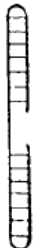
Plant	Frequencies of the different configuration types			
				
	A	B	C	D
1B1	5	1	1	3
1B2	6	1	1	2

FIGURA 7. Diferentes configuraciones de autoapareamiento del cromosoma B de centeno en paquítina (Santos *et al.*, 1993).

Estudios posteriores del mismo grupo analizaron el comportamiento de algunos derivados del cromosoma B durante la profase I y describieron sus respectivas configuraciones (Jiménez *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1995). Jiménez *et al.* (2000) y Puertas *et al.* (2000), también analizaron el comportamiento meiótico del B de Puyo durante la profase I utilizando las líneas H y L, relacionándolo con la formación de bivalentes en metafase I, la formación de micronúcleos en la primera metafase del polen y su transmisión a la siguiente generación. Las conclusiones que obtuvieron fueron que la asociación en profase I, la formación de bivalentes de cromosomas B en metafase I y la

pérdida de micronúcleos que portan Bs durante la maduración del polen, son los factores determinantes para la transmisión de este cromosoma a la descendencia.

Derivados del B de centeno

Además de la existencia de polimorfismos para el número de Bs (0-8 Bs), también se han descrito derivados del B de centeno que difieren de este en su estructura (Jones y Puertas, 1993). Estos derivados, implican variaciones de cantidad del material genético en el propio cromosoma B, ya que, al ser prescindible, las reordenaciones y deleciones que se dan en él, no afectarían a la planta que lo porta (Jones y Rees, 1982).

Dentro de los derivados del B de centeno estándar (FIGURA 8.1), podemos encontrar Bs de deleción donde el cromosoma B ha perdido parte del brazo largo. Müntzing (1948) observó uno de ellos, que había perdido la mitad distal del brazo largo, y esto le impedía aparear en meiosis (FIGURA 8.2).

Por otra parte, los derivados más comunes son los cromosomas B metacéntricos, también conocidos como isocromosomas B, los cuales poseen ambos brazos idénticos, por tanto, pueden ser isocromosomas para el brazo largo del B (Iso-BL) (FIGURA 8.3) o isocromosomas para el brazo corto (Iso-BS) (FIGURA 8.4). Al igual que en el caso del B estándar, también existen Iso-BL de deleción, los cuales carecen de una región idéntica en ambos brazos largos (Müntzing, 1948) (FIGURA 8.5).

Otros derivados son los cromosomas telocéntricos, que poseen el centrómero en uno de sus extremos al haber perdido uno de sus brazos. Al igual que ocurre en el caso del isocromosoma, puede haber telocéntricos tanto para el brazo largo (Telo-BL) (FIGURA 8.6), como para el corto (Telo-BS) (FIGURA 8.7) (Müntzing, 1944).

En caso de haber más de un isocromosoma o cromosoma telocéntrico, estos pueden aparear en meiosis. Los isocromosomas además pueden tener autoapareamiento y formar univalentes en anillo. Ambos derivados se originan en meiosis por una misdivisión del centrómero del B cuando está como univalente.

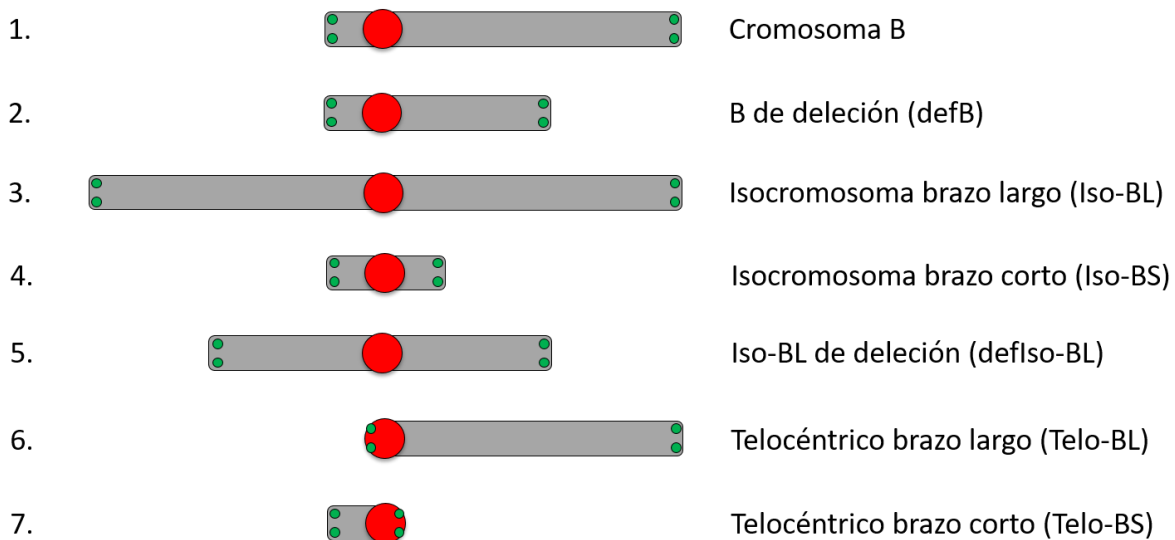


FIGURA 8. Esquemas de los diferentes derivados del cromosoma B de centeno.

La misdivisión es una rotura transversal del centrómero, producida debido a que haces de microtúbulos procedentes de polos opuestos se unen a distintas subunidades del cinetocoro de una o ambas cromátidas, y la tensión que ejercen en sentidos opuestos causa la rotura del centrómero (FIGURA 9; Vega y Feldman, 1998).

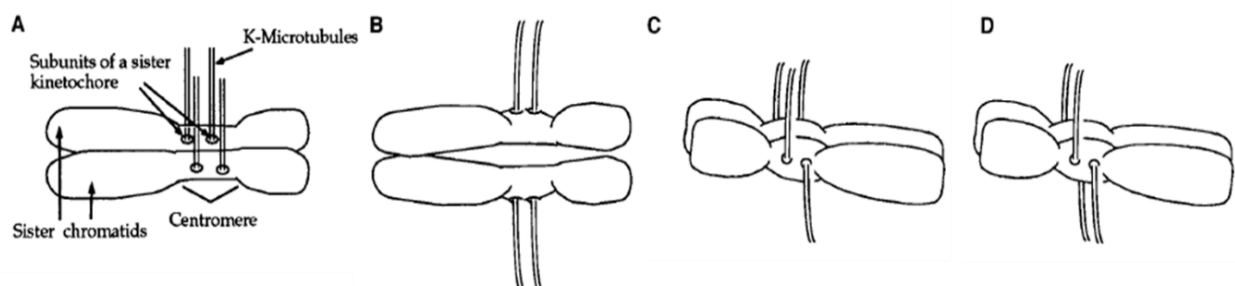


FIGURA 9. Diagrama de las posibles orientaciones de los cinetocoros de cromátidas hermanas en un univalente en la primera división meiótica. **(A)** Disposición de las subunidades cinetocóricas en metafase temprana. **(B)** Subunidades del cinetocoro de una cromátida interactúan con un polo, mientras que las subunidades cinetocóricas de la cromátida hermana interactúan con el polo opuesto. **(C)** Subunidades cinetocóricas de una de las cromátidas interactúan con microtúbulos de polos opuestos. **(D)** Las subunidades cinetocóricas de ambas cromátidas hermanas interactúan con microtúbulos procedentes de ambos polos. (Vega y Feldman, 1998).

Las vías de reparación que pueden dar lugar a una estabilización del cromosoma después de una misdivisión son principalmente dos (FIGURA 10): si se fusionan los extremos rotos de las cromátidas hermanas, se producirá un isocromosoma, ya sea para el brazo largo o para el brazo corto. Por el contrario, si se produce la adición de

secuencias teloméricas a los extremos rotos, se originan cromosomas telocéntricos (Kaszás y Birchler, 1996) (FIGURA 10).

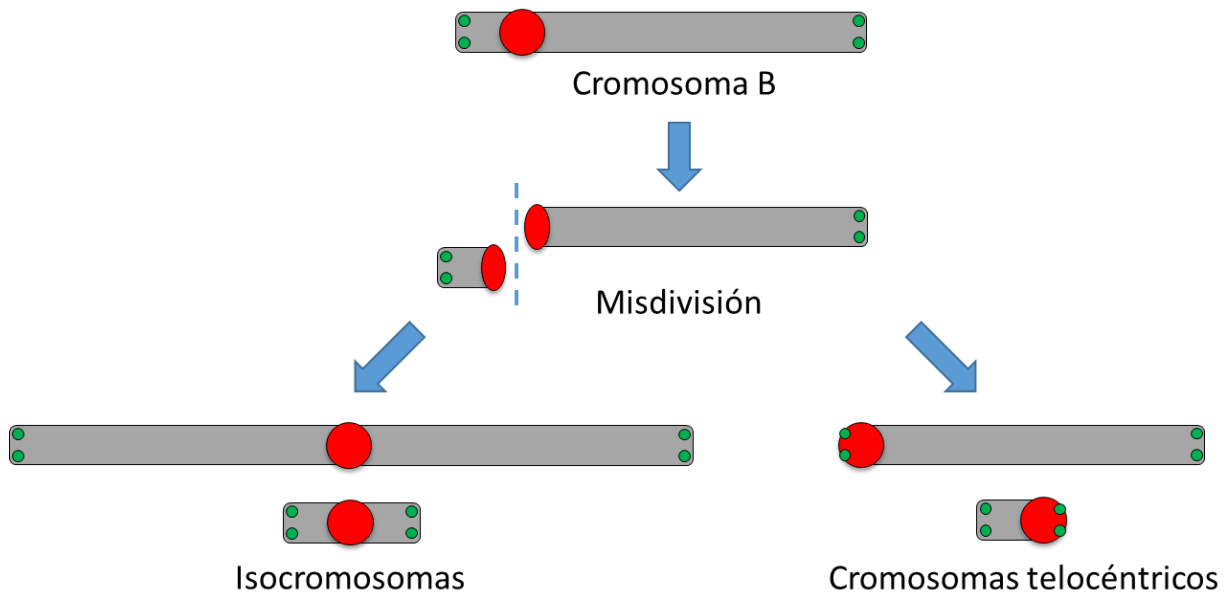


FIGURA 10. Vías de reparación del centrómero del cromosoma B después de sufrir una misdivisión. En el primero de los casos (izquierda), después de la rotura se fusionan los extremos rotos de cromátidas hermanas dando lugar a isocromosomas. En el segundo caso (derecha), se añaden telómeros a los extremos rotos originando cromosomas telocéntricos.

MINICROMOSOMAS

Por definición, los minicromosomas son cromosomas con un tamaño menor a un tercio del tamaño del cromosoma más pequeño de una especie en concreto (Schubert, 2001; Murata, 2014). Se caracterizan por poseer los elementos esenciales para su replicación y existencia en una célula (Gaeta y Krishnaswamy, 2011). Se tiene constancia de la existencia de minicromosomas desde que McClintock (1931) encontró en maíz unos pequeños cromosomas que se comportaban de manera anómala en un estudio realizado con rayos X para ver alteraciones cromosómicas. Posteriormente McClintock (1938) observó que estos pequeños cromosomas mostraban separación de cromátidas en anafase I en vez de en anafase II, y que aun habiendo dos en la misma planta no exhibían apareamiento homólogo.

La formación de minicromosomas puede tener diferente origen, ya que estos se pueden originar de manera natural, como resultado de reorganizaciones de los cromosomas normales, o de manera artificial. En plantas la mayoría de los minicromosomas han sido obtenidos por medio de truncamientos utilizando rayos X (Schubert, 2001), por medio de genes gametocidas presentes en determinadas especies de cereales (Endo *et al.*, 2008), y mediante el ciclo puente-rotura-fusión (BFB) (Mette y Houben, 2015). El BFB implica la obtención previa de un cromosoma dicéntrico en el que al migrar cada uno de los centrómeros a polos opuestos en anafase se producen puentes de cromatina, que posteriormente se rompen obteniéndose cromosomas truncados. Utilizando el BFB se ha obtenido una colección de minicromosomas para el cromosoma B de maíz partiendo de una translocación de dicho cromosoma con el autosoma 9 (FIGURA 11 A; Kato *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007). Recientemente se han desarrollado en plantas métodos más eficientes para inducir truncamientos, como es el basado en la utilización de transgenes con secuencias teloméricas (FIGURA 11 B) (Birchler, 2014). Dichos transgenes truncan el cromosoma en el lugar donde se integran, lo que conlleva la formación de un minicromosoma con nuevos telómeros, y un fragmento acéntrico distal que se pierde. Con este método se han obtenido minicromosomas en maíz (Yu *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* (Teo *et al.*, 2011), cebada (Kapusi *et al.*, 2012) y arroz (Xu *et al.*, 2012).

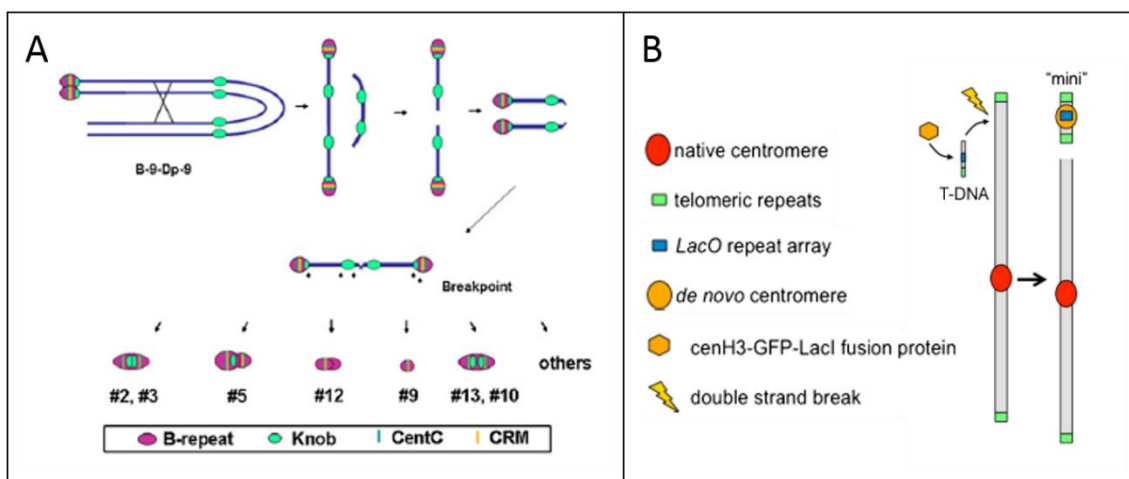


FIGURA 11. (A) Esquema de los minicromosomas producidos por el ciclo BFB en maíz (Han *et al.*, 2007). **(B)** Modelo de truncamiento por medio de inserción de T-DNA (Mette y Houben, 2015).

Los minicromosomas que conservan íntegro el centrómero del cromosoma del que derivan, se transmiten bien en mitosis, pero dependiendo de su tamaño, pueden segregarse mal y perderse en meiosis. Los minicromosomas de tamaño muy reducido no aparean en paquítena (FIGURA 12 A), e independientemente de si aparean o no, suelen separar cromátidas hermanas en anafase I (FIGURA 12 B; Han *et al.*, 2007). Por tanto, como resultado de este apareamiento y segregación anormales, los minicromosomas no se incorporan en todos los gametos y tienen una tasa de transmisión reducida.

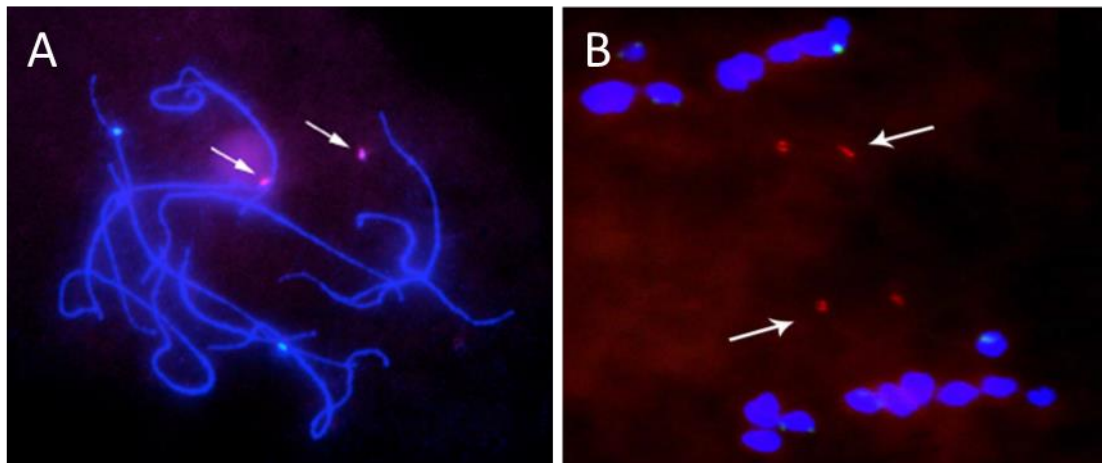


FIGURA 12. (A) Minicromosomas de maíz de tamaño muy reducido que no aparean en paquítena. **(B)** Minicromosomas de maíz separando cromátidas en anafase I (Han *et al.*, 2007).

En maíz, un minicromosoma obtenido a partir de un cromosoma A mediante truncamiento con secuencias teloméricas, se transmitió al 33% de los individuos de la descendencia por la autofecundación de un individuo monosómico para dicho minicromosoma A (Yu *et al.*, 2007). En otras especies donde se ha analizado la transmisión de minicromosomas A obtenidos por truncamiento con secuencias teloméricas, las frecuencias también son más bajas que las esperadas según las leyes de Mendel: del 52% al 72% en *A. thaliana* (Teo *et al.*, 2011) y 54% en cebada (Kapusi *et al.*, 2012).

Yu *et al.* (2007) obtuvieron varios minicromosomas a partir del B de maíz, que se transmitieron por vía paterna a la descendencia en porcentajes que oscilaron entre el 12% y el 50%, dependiendo del tamaño del minicromosoma. Otros experimentos como el de Kato *et al.* en 2005, donde obtuvieron minicromosomas B mediante el ciclo de puente-rotura-fusión (BFB) demostraron que la frecuencia de transmisión de

minicromosomas B de maíz es muy similar a la frecuencia obtenida mediante truncamiento.

APLICACIONES CROMOSOMAS B

Al contrario que los cromosomas A, los Bs son componentes dispensables del genoma, por lo que la comparación de ambos permite analizar la evolución de cromosomas y secuencias de ADN que se encuentran bajo distinta presión de selección. El cromosoma B de maíz se ha utilizado como modelo para estudiar los diferentes componentes estructurales del centrómero. Con este fin, se han realizado estudios de cómo cromosomas B con diferentes tamaños de centrómero se comportan durante la meiosis (Han *et al.*, 2018). También se han realizado diversos estudios que han analizado una colección de cromosomas telocéntricos e isocromosomas del B que fueron obtenidos por misdivisión cuando el B se encuentra como univalente en anafase I (Kaszás y Birchler 1996; Jin *et al.*, 2005).

Existen algunas especies como *Hypochoeris maculata* (Parker, Ainsworth y Taylor, 1978) o *Eyprepocnemis plorans* (Riera *et al.*, 2004) donde la presencia de cromosomas B afecta a la formación de bivalentes, frecuencia y distribución de los quiasmas en los As, los cuales podrían ser utilizados para estudios básicos y aplicados en recombinación.

Por otro lado, los cromosomas B son buenos candidatos para el desarrollo de cromosomas artificiales: vectores autónomos que pueden usarse como plataformas de transformación de transgenes en biotecnología (Liu *et al.*, 2013). Las ventajas que ofrecen los Bs como cromosomas artificiales son que no aparean ni recombinan con los cromosomas A, carecen de efecto fenotípico mayor y poseen mecanismos de acumulación que podrían permitir el aumento de la dosis génica de los transgenes que porten. En plantas, los cromosomas artificiales ofrecerían la oportunidad de añadir múltiples transgenes independientes del resto del genoma, o añadir complejos multigénicos o rutas bioquímicas completas con el objetivo de cambiar sus características agronómicas. En maíz, se ha demostrado que es posible la expresión de transgenes insertados en el B (Yu *et al.*, 2007). En estos experimentos se observó

expresión del transgén GUS en todos los tejidos analizados, incluyendo el embrión y el endospermo de los granos de maíz.

Por otra parte, también podrían tener aplicaciones los diferentes derivados de cromosomas B. En maíz, se han usado cromosomas B truncados, que conservan porciones sustanciales del brazo largo, y exhiben apareamiento normal entre homólogos y cohesión entre cromátidas hermanas en meiosis I (Han *et al.*, 2007), de manera que también servirían como modelo para el estudio del desarrollo de la meiosis. Los minicromosomas se utilizan como modelo para definir los componentes estructurales esenciales para la transmisión cromosómica. Existe un gran interés en convertir a los minicromosomas en cromosomas artificiales o vectores autónomos que puedan transmitir cantidades grandes de ADN. Sin embargo, para poder utilizarlos a nivel biotecnológico sería necesario mejorar la transmisión de estos. Para ello se podría colocar un gen de selección gametofítica en el minicromosoma, tal y como sugirieron Birchler y Han (2013), combinándolo con un sistema citoplasmático de esterilidad masculina S (*cms-S*) que hace que el polen no tenga viabilidad. Si se introduce en el minicromosoma el restaurador de la fertilidad (*Rf3*), los granos de polen con el minicromosoma sobrevivirían, mientras que los que carecieran de él no. De esta manera, cruzando un parental masculino con *Rf3* con un parental femenino que porte el sistema *cms-S*, se podría conseguir una completa representación del minicromosoma en la siguiente generación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

El cromosoma B de centeno, es uno de los modelos de estudio de Bs más utilizado. Por ese motivo, en la presente tesis se decidió hacer un análisis detallado de su estructura y de la localización de las diversas secuencias que lo forman, mediante FISH en paquitena, ya que los cromosomas no se encuentran totalmente condensados en este estadio meiótico. Esta información permitiría conocer la organización centromérica y pericentromérica del B, así como de la región distal del brazo largo, ambas implicadas en el mecanismo de no disyunción, que facilita al B mantenerse en las poblaciones. También permitiría la identificación de reorganizaciones estructurales del B, y aumentar el conocimiento sobre la influencia de la estructura cromosómica en la sinapsis y el apareamiento, así como en la posterior transmisión del B.

OBJETIVOS

- Determinar la localización en el cromosoma B de centeno, de las secuencias centroméricas y pericentroméricas de esta especie, así como de las secuencias localizadas en los brazos del B, con el fin de obtener un mapa físico de alta resolución de este cromosoma en paquitena.
- Análisis estructural y funcional de la región centromérica del B en metafase I.
- Estudio de la distribución de la histona centromérica CENH3 en el B.
- Caracterización estructural y estudio del posible origen de nuevos derivados cromosómicos del B.
- Análisis y comparación del apareamiento y la sinapsis del cromosoma B y derivados desde profase I hasta metafase I.
- Análisis y comparación de la segregación del cromosoma B y derivados en diadas y tétradas.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIALES

En la presente tesis, se utilizaron plantas de centeno portadoras de 2Bs y 4Bs de los cultivares coreanos Paldang y Puyo (*Secale cereale L.*, $2n = 14$), cuya frecuencia de Bs es de aproximadamente 20% y 60%, respectivamente (Romera *et al.*, 1989). También se emplearon las plantas portadoras de cromosomas derivados del B que se detallan en cada apartado específico de resultados.

MÉTODOS

Germinación y cultivo

Las semillas de centeno seleccionadas, se esterilizaron mediante un lavado de 12 minutos en hipoclorito sódico al 3,75%, seguido de tres lavados de 5 min con agua destilada estéril. Se introdujeron las semillas en placas Petri o bandejas con una doble capa de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, se rotularon, se sellaron con parafilm o film y se dejaron a temperatura ambiente hasta que las semillas germinadas tenían unas raíces de una longitud de 2 a 3 centímetros (aproximadamente 72 horas). Una vez se cortaron los meristemas radiculares para su posterior fijación, las plántulas se sembraron en macetas con tierra. La siembra se realizó entre los meses de noviembre y diciembre. Cada año todas las plantas crecieron bajo similares condiciones de temperatura, luz y humedad en los invernaderos del Real Jardín Botánico Alfonso XIII de la Universidad Complutense de Madrid. En el mes de marzo las plantas se transfirieron a la Escuela de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, instalaciones facilitadas por la profesora Elena Benavente, donde las plantas crecieron en unas zonas sombreadas fuera de los invernaderos hasta el momento de la cosecha.

Obtención y fijación de raíces

Cuando las semillas germinaron y las raíces habían alcanzado una longitud de entre 2 y 3 cm se cortó el centímetro apical de 2 o 3 raíces de cada planta, y se

introdujeron en tubos *Eppendorf* con agua destilada. Si se iba a realizar inmunolocalización, los tubos se introdujeron en hielo hasta el momento de su uso para la realización de preparaciones. Si las raíces se querían fijar para ser usadas posteriormente, se colocaron los tubos en hielo durante aproximadamente 48 horas, con el fin de obtener un mayor número de células en metafase mitótica; a continuación, se sacaron los tubos con las raíces del hielo, se retiró el agua del interior de los tubos y se sustituyó por una solución fría de etanol y ácido acético en una proporción de 3:1 (v/v). Las raíces fijadas se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso.

Obtención y fijación de anteras

A partir del mes de abril se procedió a la recolección de las espigas que se encontrasen en meiosis. Si se necesitaban espigas para realizar inmunolocalización, se procedió al chequeo de las espigas en fresco, diseccionando las flores y tomando de cada una de ellas una antera, que fue teñida por medio de carmín acético para conocer el estadio meiótico en el que se encontraba la flor. Una vez identificadas las flores con las anteras en los estadios deseados, se procedió a fijar las anteras hermanas en tubos *Eppendorf* tal y como se especifica en el protocolo de inmunolocalización.

Para la realización de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH), las espigas recolectadas se introdujeron en tubos Falcon de 15 ml; se etiquetaron y se les añadió una solución de etanol, cloroformo y ácido acético en una proporción 3:2:1 (Fijador de Carnoy), se introdujeron en una campana de vacío y se dejaron con un vacío moderado durante 10 minutos con el fin de que el aire presente en las espiguillas fuera sustituido por el fijador. A continuación, se guardaron a 4°C durante 48 horas y después se cambió el fijador por etanol con ácido acético 3:1 y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

Extracción ADN genómico

Se utilizaron plantas jóvenes con dos cromosomas B del cultivar coreano Paldang. Se cortaron 100 mg de hoja y se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se introdujeron dentro de un *Eppendorf* pre-enfriado en nitrógeno

líquido. En este tubo se introdujeron, junto con la hoja troceada, 2 bolas metálicas, de manera que la hoja quedó entre ambas bolas para una mejor disgregación del tejido. A continuación, se tomaron los adaptadores para tubos del *TissueLyser* (Quiagen), que se encontraban pre-enfriados a -80°C, se introdujeron los tubos preparados previamente y se realizó en este aparato una agitación de 1 minuto en torno a 1500 rpm. Una vez realizada, se dejaron reposar brevemente y de nuevo se dio otra agitación de 1 minuto a las mismas revoluciones. Tras realizar la disgregación se procedió a realizar la extracción de ADN usando el kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Obtención de sondas de ADN, secuenciación y alineamiento

Las sondas de ADN *Sc63-2.FGA* y *Sc55-3.FGA* se obtuvieron mediante PCR con el programa: 94°C-5 min, 40 ciclos de 94°C-2 min, 55°C-1 min y 72°C-1 min 30 seg, y un paso final de 72°C-5 min. Se utilizó Taq polimerasa de Qiagen y ADN genómico de plantas con Bs como molde. Los cebadores usados fueron los siguientes: *Sc63-2.FGA-F* 5'-TACTTGGAACCATGTTGTGGAT-3'; *Sc63-2.FGA-R* 5'-GCTTCGTAATAATCGTGCTTCC-3'; *Sc55-3.FGA-F* 5'-TATGCGAAGCTGGAAGATGAG-3'; *Sc55-3.FGA-R* 5'-CTTCCACGGTGTCCATCC-3'. Una fracción del producto de PCR obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% para comprobar que se hubiera obtenido una única banda del tamaño esperado. Los ADNs de las sondas *Sc63-2.FGA* y *Sc55-3.FGA* se enviaron al C.A.I de Genómica y Proteómica de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, para su secuenciación por el método de SANGER. Una vez obtenidas las secuencias, se identificaron los cebadores, se alinearon las secuencias y se obtuvieron las secuencias consenso, utilizando el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) por medio de un alineamiento múltiple de *Clustal-Wallis*. Las secuencias están disponibles en *GenBank* con los siguientes *accession numbers*: MK394993 para *Sc63-2.FGA* y MK394992 para *Sc55-3.FGA*.

CRRye es una sonda que se obtuvo previamente en nuestro laboratorio (González-García, 2011). Todas las sondas con el prefijo *Sc* y los BACs con ADN de orgánulos fueron provistos por el Dr. Andreas Houben (IPK, Gatersleben, Alemania) y se encuentran reflejadas en la TABLA 1.

Nombre de la Secuencia	Tamaño de la secuencia	Identidad de la secuencia	Bibliografía
<i>Bilby</i>	1250 pb	GAG, Integrasa	Francki 2001
<i>ScCL11-1/Sc11c32</i>	1120 pb	<i>Copia</i> del B de centeno	Banaei-Moghaddam <i>et al.</i> , 2012 Klemme <i>et al.</i> , 2013
<i>CRRye</i>	1000 pb	Transcriptasa inversa, RNAsa H, Integrasa	González-García, 2011
<i>ScCCS1</i>	408 pb	LTR	Banaei-Moghaddam <i>et al.</i> , 2012
<i>Sc192pb</i>	1454 pb	LTR	Banaei-Moghaddam <i>et al.</i> , 2012
<i>ScCRW2</i>	1605 pb	GAG	Banaei-Moghaddam <i>et al.</i> , 2012
<i>pBs301-1</i>	250 pb	GAG	Cheng y Murata 2003
<i>Sc6C6-3</i>	1952 pb	Transcriptasa inversa, RNAsa H	Banaei-Moghaddam <i>et al.</i> , 2012
<i>E3900</i>	3984 pb	Satélite específico del B de centeno	Blunden <i>et al.</i> , 1993
<i>D1100</i>	1100 pb	Satélite específico del B de centeno	Sandery <i>et al.</i> , 1990
<i>pAtT4</i>	403 pb	Repetición telomérica de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Richards y Ausubel 1988
<i>Sc9c130</i>	521 pb	Satélite del B de centeno	Klemme <i>et al.</i> , 2013
<i>Sc21c67</i>	1491 pb	Satélite del B de centeno	Klemme <i>et al.</i> , 2013
<i>Sc26c38</i>	604 pb	Satélite del B de centeno	Klemme <i>et al.</i> , 2013
<i>Sc55-3.FGA</i>	469 pb	Satélite del B de centeno	-
<i>Sc63-2.FGA</i>	1057 pb	Satélite del B de centeno	-
<i>BAC clone MnHB 0205G01 Mitochondrial BAC</i>	-	ADN mitocondrial de cebada	Banaei-Moghaddam <i>et al.</i> , 2012
<i>BAC clone ChHB 100G01 Chloroplast BAC</i>	-	ADN de cloroplasto de cebada	Martis <i>et al.</i> , 2012 Klemme <i>et al.</i> , 2013

TABLA 1. Sondas utilizadas, tamaño, identidad y referencia bibliográfica.

Identidad de las secuencias

Las diferentes sondas centroméricas que se utilizaron, son secuencias que se corresponden con diferentes regiones del CRW (retrotransposón centromérico de trigo). Sin embargo, también producen señales de FISH en centrómeros de centeno, por lo que Banaei-Moghaddam *et al.* (2012) diseñaron cebadores en dichas secuencias y, utilizando ADN genómico de centeno, aislaron y clonaron las secuencias homólogas de centeno; las denominaron con el mismo nombre, pero con las iniciales **Sc** delante. Todas estas secuencias están representadas según su posición en el retrotransposón en la FIGURA 13.

ScCCS1, secuencia de 408 pb homóloga a **CCS1** (Aragón-Alcaide *et al.*, 1996), que es una secuencia de 260 pb aislada del clon Hi-10 de *Brachypodium sylvaticum* (Abbo *et al.*, 1995). Mediante FISH se ha visto que **CCS1** marca la región centromérica en centeno, trigo, *Aegilops comosa*, cebada, maíz y arroz, siendo en trigo y centeno donde las señales son de mayor intensidad.

Sc192pb, secuencia de 1454 pb homóloga a **192pb** (Ito *et al.*, 2004), que es una secuencia con dos repeticiones de 192pb obtenida a partir de ADN genómico de trigo utilizando cebadores de la integrasa de *cereba* (retrotransposon centromérico de cebada). El clon aislado era homólogo a las LTR de retrotransposones tipo *Ty3/gypsy*. Mediante FISH, se ha visto que **192pb** marca los centrómeros tanto de trigo como de centeno, pero no produce señales en cebada.

Sc6C6-3, secuencia de 1952 pb homóloga a **6C6-3** (Zhang *et al.*, 2004), que es una secuencia obtenida a partir de una biblioteca de BACs de *Aegilops tauschii*. **6C6-3** hibrida mediante FISH en las regiones centroméricas de trigo y centeno, y con menor intensidad en cebada y maíz, pero no produce señales en arroz.

ScCRW2 es una secuencia de 1605 pb homóloga a la sonda **CRW2**. A partir de BACs de *Triticum boeoticum* se aislaron dos clones con localización centromérica (Liu *et al.*, 2008). Cuando fueron secuenciados se vio que contenían retrotransposones tipo *Ty3/gypsy*, tipo *Ty1/copia* y tipo *Athila*. Los elementos tipo *Ty3/gypsy* fueron denominados **CRW** (*Centromeric Retrotransposon of Wheat*). Los dos clones secuenciados contenían copias tanto de elementos intactos como truncados o secuencias parciales. El elemento **CRW2** se encontró completo en ambos clones, con

LTR de 919±1 pb, y un ORF con los dominios gag, transcriptasa inversa e integrasa. Distintas zonas de este retrotransposón se utilizaron como sonda en FISH en distintas especies, y se vio que hibridaban en los centrómeros de las triticíneas diploides, tetraploides y hexaploides y en centeno. La sonda utilizada, es un fragmento de 770 pb correspondiente a la gag-poliproteína.

pBs301-1 (Cheng y Murata, 2003) es una secuencia de unos 250 pb que se obtuvo a partir de *Aegilops speltoides*. Procede de la secuencia *pBs301* pero tiene un menor número de copias del microsatélite CAA que ella. Al utilizarla como sondas en FISH se vio que hibridaba con la zona centromérica de *T. aestivum*, *T. durum*, *Ae. speltoides* y centeno.

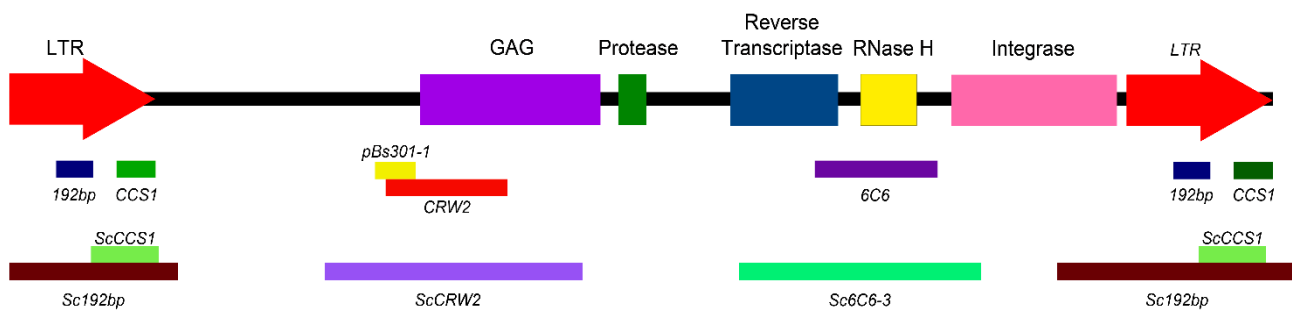


FIGURA 13. Esquema del retrotransposón CRW donde se puede apreciar cada una de sus regiones y el lugar donde se localizan cada una de las secuencias utilizadas en la presente tesis y sus homólogos de trigo.

Bilby (Francki, 2001) es una secuencia aislada a partir de un minicromosoma de centeno denominado *midget* (Nakata *et al.*, 1986). En ella se identificaron los genes correspondientes a la gag, la integrasa y la RNasaH de los retrotransposones autónomos en este orden, por lo que se la relacionó con los retrotransposones tipo *Ty1/copia*. La sonda empleada tiene un tamaño de 1250 pb (también se denomina *pAWRC.1*) y en FISH marca los centrómeros de todos los cromosomas de centeno mientras que no muestra ninguna señal en trigo.

CRRye (González-García, 2011) es un fragmento de 1000 pb que forma parte del Retrotransposón Centromérico de Centeno. Corresponde a la transcriptasa inversa, RNasaH y parte de la integrasa de dicho CR. Se obtuvo a partir de ADN de centeno inmunoprecipitado mediante CHIP con el anticuerpo anti-CENH3 de arroz. En FISH marca específicamente los centrómeros de centeno y no los de trigo.

ScCL11-1/ Sc11c32 (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012; Klemme *et al.*, 2013) es una secuencia de 1120 pb obtenida a partir de un cóntigo localizado en la región pericentromérica del B de centeno, que contenía secuencias específicas del cromosoma B. La secuenciación permitió conocer que *ScCL11-1/Sc11c32* mostraba similitud con retrotransposones tipo *Copia*. Al utilizarla como sonda en FISH también produjo señales dispersas en los cromosomas de *Secale strictum* y *Secale sylvestre*.

E3900 (Blunden *et al.*, 1993) es una secuencia de 3984 pb que forma parte de una familia de secuencias altamente repetidas identificadas en el cromosoma B de centeno. No da señales de FISH en los cromosomas A, ni en ninguna otra especie de gramínea

D1100 (Sandery *et al.*, 1990) es una secuencia de 1100 pb que, al igual que *E3900*, forma parte de una familia de secuencias altamente repetidas identificadas en el B de centeno. No da señales de FISH en los As y tiene una cierta heterogeneidad entre cromosomas B de diferentes especies de centeno.

pAtT4 (Richards y Ausubel, 1988) es una secuencia de 403 pb formada por la repetición en tándem de la secuencia telomérica de plantas 5'-TTTAGGG-3', obtenida a partir de *Arabidopsis thaliana*.

Sc9c130 (Klemme *et al.*, 2013) es una repetición en tándem de 521 pb del cromosoma B de centeno, que también produce señales de FISH muy débiles y dispersas en cromosomas de *S. strictum*.

Sc21c67 (Klemme *et al.*, 2013) es una repetición en tándem de 1491 pb del B de centeno, que se ha observado que en ocasiones produce señales pequeñas y débiles en los cromosomas A, coincidentes con *pSc200*, sonda que marca exclusivamente heterocromatina subtelomérica.

Sc26c38 (Klemme *et al.*, 2013) es una repetición en tándem de 604 pb, que también origina señales de FISH en la región terminal de los cromosomas de *S. strictum* y cerca del centrómero en un par de cromosomas de *Secale sylvestre*.

Sc55-3.FGA es una secuencia repetida de 469 pb obtenida en esta tesis mediante PCR con los cebadores de la secuencia *Sc55c1* (Klemme *et al.*, 2013), la cual es la primera repetición subterminal que se observó tanto en As como en Bs. Esta secuencia produce alguna señal dispersa de FISH en As y en cromosomas de *S. strictum*.

Sc63-2.FGA es una secuencia repetida de 1057 pb obtenida en la presente tesis con los cebadores de la secuencia *Sc63c34* (Klemme *et al.*, 2013), que en FISH produce alguna señal dispersa en los cromosomas A y señales muy dispersas a lo largo de los cromosomas de *S. strictum*.

Las sondas obtenidas por klemme *et al.* (2013) fueron obtenidas *in silico* utilizando gráficos de clusters de lecturas de secuenciaciones 454.

Los **ADNs Mitocondrial** y de **Cloroplasto** (*BAC clone MnHB 0205G01 Mitochondrial BAC* y *BAC clone ChHB 100G01 Chloroplast BAC*) fueron los usados por Banaei-Moghaddam *et al.* 2012, Martis *et al.* 2012 y Klemme *et al.* 2013, obtenidos de BACs de cebada que contienen regiones de 120 kb del ADN de estos orgánulos.

Clonaje de sondas de ADN

Una vez obtenida la banda esperada en la PCR de las sondas *Sc63-2.FGA* y *Sc55-3.FGA* se procedió a introducir el ADN en un plásmido, para ello se utilizó el TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. Este kit usa el plásmido pCR4-TOPO (FIGURA 14).

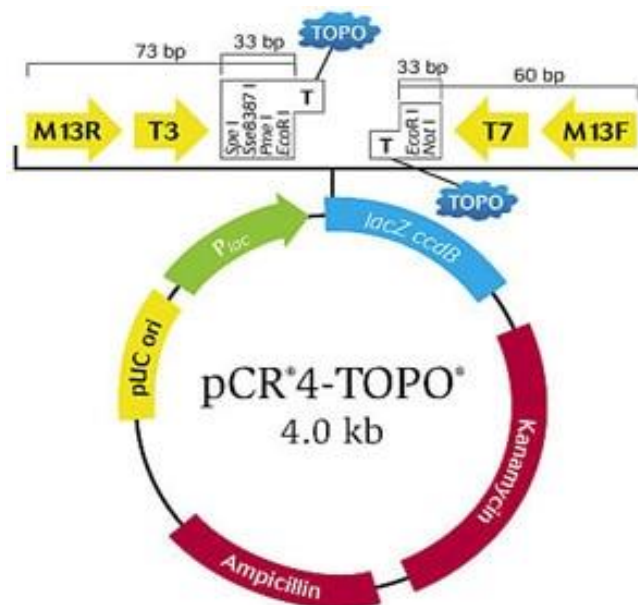


FIGURA 14. Vector pCR4-TOPO utilizado para la clonación de las sondas *Sc63-2.FGA* y *Sc55-3.FGA*.

A partir de los plásmidos obtenidos con el inserto de *Sc63-2.FGA* y *Sc55-3.FGA* o de otros plásmidos almacenados, se realizó una electroporación; para ello se usaron bacterias *One Shot TOP10 Electrocomp E. coli* (Invitrogen). Se tomaron 2µl del plásmido, se añadieron al vial con las bacterias y se agitó suavemente. La muestra se tomó con una pipeta Pasteur estéril y se depositó en el fondo de una cubeta de electroporación. Se introdujo la cubeta en el electroporador MicroPulser™ Electroporator (BioRad) y se dio un pulso. Después, se resuspendió la mezcla en 250µl de medio SOC (Sigma-Aldrich), se pasó a un tubo de 15 ml y se incubó durante 1 hora a 37°C, con una agitación de 200 rpm, que permitió a las células recuperarse y expresar los genes de resistencia a antibióticos del plásmido. A continuación, se colocaron 30µl de cada mezcla en placas Petri previamente preparadas de LB (Luria-Bertani) con agar, antibiótico (kanamicina o ampicilina) y 40µl de X-gal (para la selección de las colonias por color) y se incubaron toda la noche a 37°C. Para la extracción del ADN plasmídico, se tomó una única colonia blanca de bacterias del cultivo en agar y se inoculó en 4 ml de medio LB líquido con antibiótico dejándola crecer durante una noche a 37°C con una agitación de 200 rpm. La extracción del plásmido se hizo tal y como se explica en el siguiente apartado.

Almacenamiento y conservación sondas

Para la realización de reservas permanentes de los cultivos que han sido transformados, se tomaron 900 µl del cultivo descrito en el apartado anterior y se les añadieron otros 900 µl de glicerol estéril al 50%, se congelaron a -20°C durante unas horas y posteriormente se transfirieron a un arcón de -80°C donde se conservaron hasta una nueva utilización.

Para la extracción del plásmido, el resto del cultivo se centrifugó y, a partir del precipitado, se extrajo el ADN plasmídico con el kit *Zyppy™ Plasmid Miniprep* (Zymo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la extracción, se procedió a realizar una cuantificación del ADN por medio de un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop technologies). Tras su valoración, el ADN que tenía unas condiciones óptimas se almacenó en un congelador a -20°C hasta el momento de su utilización.

Marcaje de sondas

El ADN obtenido y cuantificado de la miniprep se marcó con digoxigenina-11-dUTP y/o biotina-16-dUTP (Roche), usando el *Nick Translation Mix* (Roche) o el *Nick translation DNA labeling system* (Enzo) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparaciones por técnica de Spreading

Este protocolo es una adaptación de Zhong *et al.* (1996). Se seleccionaron de las espigas fijadas en etanol-ácido acético (3:1) las anteras que estaban en los estadios deseados, y se les realizaron 3 lavados de 5 minutos en agua destilada seguidos de otros 3 en buffer citrato (10 mM) pH 7. A continuación se maceraron en una mezcla enzimática formada por celulasa, pectoliasa y citohelicasa al 0,1% cada una (Sigma-Aldrich) en buffer citrato (10 mM), pH 7 a 37°C durante 35 minutos. Posteriormente, se realizaron 2 lavados en tampón citrato y otros 2 en agua destilada de 5 minutos cada uno. Se colocó una antera sobre un portaobjetos y se le añadieron 7µl de ácido acético al 60%, se disgregó con una aguja, se añadieron otros 7µl de ácido acético al 60% y se dejó reposar durante 2 minutos. A continuación, se añadieron otros 7µl de ácido acético al 60% y se procedió a la mezcla del material con la punta de la aguja. El portaobjetos se depositó en una placa térmica a 40°C y durante 2 minutos, con la punta de la aguja por medio de tensión superficial, se movió la gota por la superficie del portaobjetos, con el fin de obtener un mayor número de células fijadas. Una vez finalizado este proceso, se añadieron 200µl de etanol:ácido acético 3:1 a 4°C. Seguidamente, durante 10 minutos, las preparaciones se dejaron en un pocillo con ácido acético al 60%. Finalmente, las preparaciones se lavaron en etanol 100%, se dejaron secar al aire y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para chequear la calidad de las preparaciones y confirmar el estadio meiótico antes de usarlas, se observaron en un microscopio de contraste de fase.

Preparaciones por Squash

Para este protocolo se usaron las raíces previamente fijadas en etanol con ácido acético (3:1). En primer lugar, se tomó un ápice radicular y se colocó encima de un

portaobjetos limpio y rotulado, se añadió una gota de ácido acético al 45% y se cortó el meristemo, desechando el resto de la raíz. A continuación, se tomaron dos cubreobjetos, uno se colocó adyacente a la gota de acético con la raíz, y el otro se colocó encima de ella, de modo que una esquina quede montada sobre el portaobjetos adyacente. Se golpeó suavemente el cubre con una aguja enmangada, disgregando ligeramente el material. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos que hacía de soporte y se siguió disgregando el material para extender más la muestra. Una vez realizado este proceso, se sumergió la preparación en nitrógeno líquido, se retiró el cubreobjetos con un bisturí y se introdujo la preparación en etanol absoluto durante unos segundos. Finalmente, se dejó secar al aire la preparación. Una vez secas, las preparaciones se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso. Para chequear la calidad de las preparaciones antes de usarlas, se observaron en un microscopio de contraste de fase.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La técnica se realizó de manera similar a la descrita por Manzanero *et al.* (2002) con modificaciones significativas. En las preparaciones en las que se utilizó ADN de orgánulos, se realizó previamente un lavado en ARNasa A 10mg/ml (Roche) durante aproximadamente 1 hora a una temperatura de 37°C, seguido de 2 lavados en 2xSSC (*Buffer* citrato sódico: 0,3M NaCl; 0,03 M citrato sódico, pH 7) a temperatura ambiente. El protocolo de FISH comenzó con un lavado en 2xSSC de 5 minutos, seguido por una digestión en pepsina 0,1% (Sigma) en HCl 20 mM a 37°C durante 9 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguidos de otro lavado con 2xSSC de 5 minutos. A continuación, el material se postfijó 10 minutos en paraformaldehído al 4% (Merck), pH 8 a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 5 minutos en 2xSSC. Después, se realizó una deshidratación en una serie creciente de alcoholes (70%, 95%, 100%, 3 minutos cada uno). Tras dejarlas secar, a cada preparación se le añadieron 20µl de la mezcla de hibridación (4µl de sondas marcadas, 2µl de 20xSSC, 4µl de sulfato de dextrano al 50% y 10µl de formamida desionizada), previamente desnaturalizada mediante inmersión en agua hirviendo durante 10 minutos. Una vez se añadió la mezcla de hibridación a las preparaciones, se desnaturalizaron a 68°C, durante 2 minutos sobre una placa

calefactora y se dejaron hibridando en cámara húmeda toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados en 2xSSC (5, 10 y 15 minutos), seguidos de otros dos en 1xSSC (5 y 30 minutos). A continuación, se realizó un bloqueo en 4B (0,5% p/v leche desnatada en polvo comercial en 4xSSC) a 37°C durante 35 minutos. Se añadieron a cada preparación 40µl de una mezcla de 4B con anticuerpos antidigoxigenina-Fluoresceína (10ng/µl) (Roche) (se observará de color verde por microscopia), y avidina-Cy3 (15ng/µl) (Roche) (se observará de color rojo por microscopia). Las preparaciones se cubrieron con un cubreobjetos de parafilm y se incubaron 1h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en *Detection Buffer* (Tween-20 al 0,2% (v/v) en 4xSSC): los dos primeros a 37°C y el último a temperatura ambiente. Por último, a las preparaciones se les añadió DAPI (4.6-diamidino-2-fenilindol-dihidroclorohidrato) con Vectashield (Vector) y se colocó un cubreobjetos. Las preparaciones se guardaron a 4º en oscuridad hasta su visualización en el microscopio de epifluorescencia.

Inmunolocalización y FISH

Se realizó de forma similar a Manzanero *et al.* (2000) con modificaciones. Se fijaron las anteras previamente seleccionadas en paraformaldehído al 4% en 1xPBS mediante tres pulsos de vacío de 1 minuto separados por 5 minutos de reposo. Tras un tratamiento enzimático con celulasa, citohelicasa y pectoliasa al 1% (Sigma-Aldrich) en 1xPBS, de 10-15 minutos a 37°C, se hicieron tres lavados de 15 minutos en 1xPBS en hielo. Posteriormente se situaron las anteras en portaobjetos recubiertos con polilisisina (Thermo) con una gota de 1xPBS. Se colocó un cubreobjetos sobre el material y se presionó la preparación. Se congeló en nitrógeno líquido, se retiró el cubreobjetos con la ayuda de un bisturí y se introdujo en 1xPBS hasta su utilización.

Para comenzar la inmunolocalización se realizaron tres lavados de 5 minutos en 1xPBS. A continuación, se añadieron 30 µl por preparación de la solución de bloqueo (BSA al 4% en 1xPBS), y se incubó 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Se añadieron 30 µl por preparación del anticuerpo primario diluido 1:200 en BSA al 1% en 1xPBS. El anticuerpo primario utilizado fue el diseñado contra la proteína CENH3 de arroz (Nagaki *et al.*, 2004), obtenido en conejo y donado por el Dr. Andreas Houben (IPK, Gatersleben,

Alemania) y que marca específicamente los centrómeros de diferentes especies de gramíneas como trigo, maíz y avena (Jin *et al.*, 2004). Se incubaron las preparaciones toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente se hicieron tres lavados de 5 minutos en 1xPBS con agitación. Se añadieron 30µl del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con rodamina (Millipore) (se observará de color rojo por microscopia) diluido 1:200 en 1xBSA y se incubó 1 hora y 45 min a RT en una cámara húmeda. Se hicieron tres lavados de 5 minutos en 1xPBS y se montaron las preparaciones en Vectashield con DAPI (Vector). Se guardaron las preparaciones a 4°C en oscuridad hasta su observación.

Una vez tomadas las fotos de la inmunolocalización de CENH3, se realizó FISH modificada. Se lavaron las preparaciones en 1xPBS hasta que cayeron los cubres. Después se hizo un lavado de 5 minutos en 2xSSC, seguido de una postfijación en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. El resto de pasos son iguales al protocolo de FISH anteriormente citado.

Microscopía

Previamente a su utilización en FISH o inmunofluorescencia se chequearon todas las preparaciones en un microscopio de contraste de fase Olympus.

La observación de las preparaciones de FISH e inmunolocalización se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 junto con una cámara fotográfica digital CCD acoplada (Olympus DP70) y, con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 junto con una cámara fotográfica digital CCD acoplada (Olympus DP71). En un grupo concreto de preparaciones se utilizó un microscopio de fluorescencia de super resolución SIM (Structured Illumination Microscopy) Elyra PS.1 con un objetivo C-Apo 63x/1.2W Korr y el software ZEN (Zeiss) perteneciente al IPK (Gatersleben, Alemania).

El brillo y contraste de las imágenes tomadas se ajustaron por medio del programa Adobe Photoshop CS5.

Estadística y análisis de datos

Las mediciones del área de CENH3 de los centrómeros de As y Bs se realizó mediante el programa ImageJ - FIJI y los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante Statgraphics Plus 5.1. La significación de los resultados se comprobó mediante pruebas de t de Student y chi-cuadrado (χ^2) de homogeneidad.

RESULTADOS



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CROMOSOMA B

Estudio región centromérica y pericentromérica del cromosoma B de centeno

Este análisis se llevó a cabo en plantas de centeno pertenecientes al cultivar coreano Paldang portadoras de 2Bs. El cromosoma B de centeno es subtelocéntrico, siendo el brazo largo 5 veces mayor que el brazo corto. Estudios previos han demostrado la localización de algunas secuencias en metafase mitótica, cigotena y paquitena (Klemme *et al.*, 2013) pero sin realizar un mapeo detallado en estas dos últimas fases. En la presente tesis, los estadios meióticos utilizados fueron cigotena y paquitena puesto que, en ellos, los cromosomas se encuentran menos condensados que en metafase I y que en metafase mitótica, pudiéndose apreciar mejor la estructura heterocromática del cromosoma accesorio. La novedad principal es que los mapeos se han realizado acorde a los 6 bloques heterocromáticos que se han identificado en el brazo largo del B en paquitena (FIGURA 15 A y 15 B), la distribución de dichos bloques heterocromáticos es muy similar al patrón de cromómeros descrito por Lima-de-Faria (1963) (FIGURA 15 C).

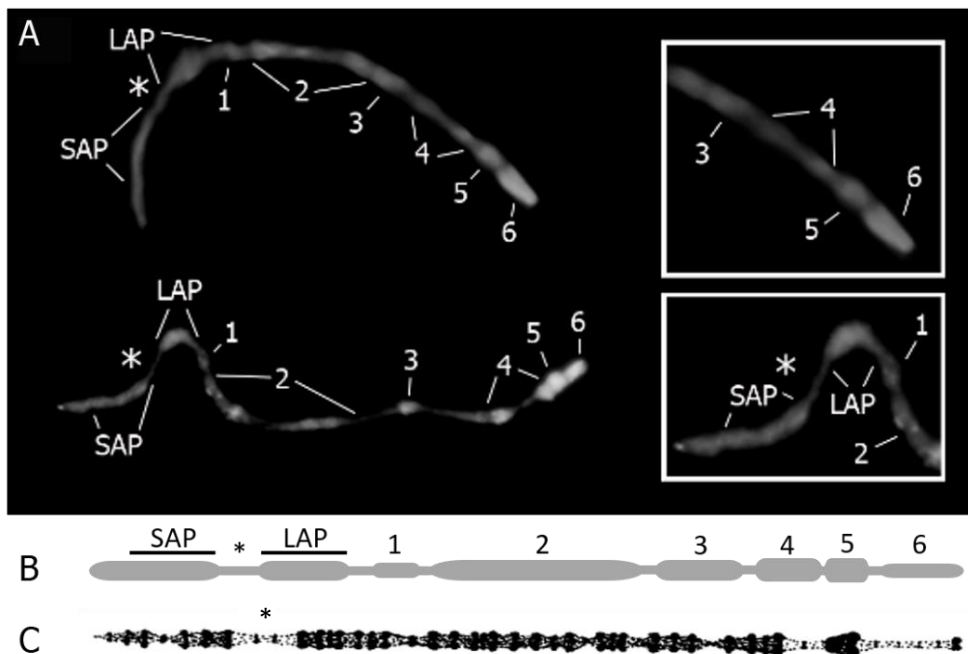


FIGURA 15. (A) Cromosomas B de centeno en paquitena teñidos con DAPI. Los diferentes bloques heterocromáticos del brazo largo están numerados, el centrómero está indicado con un asterisco y las regiones pericentroméricas están indicadas como SAP (Short Arm Pericentromere) y LAP (Long Arm Pericentromere). (B) Esquema del cromosoma B de centeno basado en la distribución de los bloques heterocromáticos observados en la presente tesis. (C) Patrón de cromómeros descrito por Lima-de-Faria (1963).

La localización de las sondas descritas en este trabajo se realizará en función a su disposición en dichos bloques heterocromáticos.

El análisis de las regiones centromérica y pericentroméricas del B se realizó mediante FISH usando las siguientes secuencias: *Bilby*, retrotransposón centromérico específico de centeno (Francki, 2001); *ScCL11-1*, retrotransposón tipo *Copia* específico del B de centeno (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012; Klemme *et al.*, 2013); *CRRye*, retrotransposón centromérico CR específico de centeno (González-García, 2011); *ScCCS1*, *Sc192pb*, *ScCRW2*, *pBs301-1* y *Sc6C6-3* que son secuencias de centeno con homología a distintas regiones del retrotransposón centromérico detrito CRW (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012) (TABLA 1).

Bilby, es una secuencia repetida que se localiza en el centrómero del B y las regiones adyacentes al mismo, este hecho confirma las observaciones previas realizadas por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012). Se encuentra tanto en la región pericentromérica del brazo largo como en la del brazo corto (siendo la señal del brazo corto ligeramente más grande), en el centrómero y en la zona media del brazo largo. En paquitena se pudieron identificar señales en el brazo largo, demostrando que corresponden con la zona distal del bloque 2 y la proximal del bloque 3 (FIGURA 16). Se pudo apreciar que la señal de *Bilby* es menos intensa en la región centromérica (viéndose un marcado estrechamiento), que en las regiones pericentroméricas del B. Además, es menos intensa en los cromosomas B que en los cromosomas A, en estos últimos la señal de *Bilby* no muestra un estrechamiento en el centrómero y no se aprecian señales intersticiales en los brazos.

ScCL11-1 (*ScCL11*) es una secuencia repetida específica del B de centeno, que se localiza en las regiones centromérica y pericentroméricas del B, las cuales delimita, así como en varios bloques heterocromáticos del brazo largo. En las regiones pericentroméricas aparece colocalizando a nivel citológico con *Bilby* en distintos puntos, mientras que en el propio centrómero ambas secuencias aparecen alternadas, ocupando *Bilby* la posición central (FIGURA 16). Al igual que ocurre con *Bilby*, se aprecia un estrechamiento de la señal de *ScCL11* en la región central del centrómero (FIGURA 16); este estrechamiento se puede observar también en la tinción con DAPI, permitiendo conocer que existe una diferencia estructural del centrómero con respecto a los cromosomas A. En cuanto a los brazos, se han podido apreciar cinco señales de *ScCL11*,

tres de estas señales se encuentran en el bloque heterocromático 2, las dos primeras aparecen muy juntas (y en muchas ocasiones pueden tomarse como una única señal), la tercera señal es más distal y se encuentra casi al final de dicho bloque. Otra señal se localiza en el bloque 3, ocupando la mayor parte de este. Por último, se apreció una señal muy tenue y puntiforme en la región proximal del bloque heterocromático 4 (FIGURA 16). En ocasiones se puede apreciar una señal muy débil en el bloque heterocromático 6 que solo se observa en algunas células donde ha habido una hibridación de muy buena calidad; de esta señal se hablará más adelante en la presente tesis. Cabe recalcar que no se apreciaron señales de *ScCL11* en los As.

Debido a las múltiples señales que muestra en los diferentes bloques heterocromáticos del brazo largo del B, se decidió usar *ScCL11*, además de *Bilby*, como sonda de referencia para poder identificar la localización del resto de secuencias.

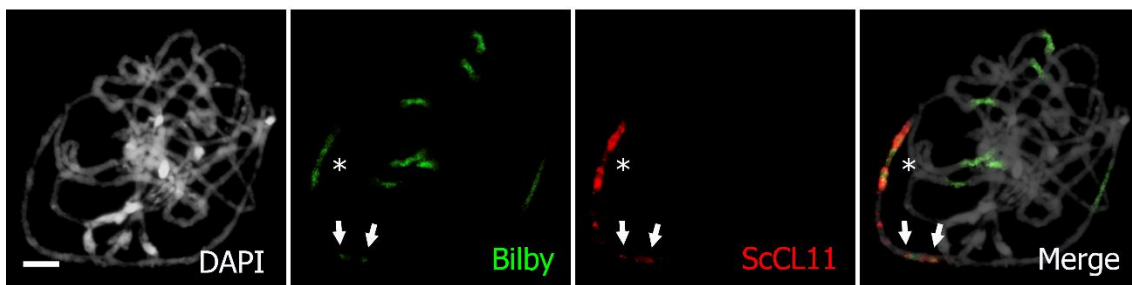


FIGURA 16. Meiocito de centeno en paquitena portador de 2Bs. FISH con *Bilby* y *ScCL11* colocalizando a nivel citológico en regiones centroméricas y pericentroméricas y en los bloques 2 y 3 del brazo largo del B. Se indican con flechas los bloques heterocromáticos donde colocalizan. El centrómero de los Bs está indicado con un asterisco. Barra 10 μ m.

CRRye se encuentra principalmente en las regiones centromérica y pericentroméricas del B, donde colocaliza a nivel citológico con *Bilby* (FIGURA 17 A). La señal es muy similar en las regiones pericentroméricas de ambos brazos, pudiéndose apreciar en ambos una pequeña señal adyacente a la región pericentromérica. Por otro lado, en el brazo largo se observaron dos señales que se localizan en la zona distal del bloque heterocromático 2 y en la zona proximal del bloque 3, colocalizando a nivel citológico con *ScCL11*. (FIGURA 17 B). Con respecto a la intensidad de la señal, es similar tanto en los As como en los Bs.

ScCCS1 se encuentra en las regiones centromérica y pericentroméricas del B, colocalizando con *Bilby* (FIGURA 17C). En el centrómero, la señal de *ScCCS1* es continua

pero muy tenue, siendo más abundante *Bilby* en la región central, sin embargo, la señal de *ScCCS1* en las regiones pericentroméricas es más intensa que *Bilby*. En los cromosomas A, la señal de *ScCCS1* es similar en todos ellos, siendo de tamaño similar en las regiones pericentroméricas de ambos brazos. Sin embargo, en los Bs se puede apreciar que las señales de las regiones pericentroméricas no son iguales, siendo la señal del brazo corto ligeramente más grande. La intensidad de las señales de *ScCCS1* es mayor en los Bs que en los As (FIGURA 17 C). Además, se pudieron observar dos señales muy débiles en el brazo largo del cromosoma B, localizadas en la región distal del bloque heterocromático 2 y región proximal del bloque 3 (FIGURA 17 D).

Sc192pb es una secuencia que se localiza en las regiones centromérica y pericentroméricas del cromosoma B. En estas regiones posee una señal continua, siendo más intensa en las regiones pericentroméricas, de similar intensidad en ambos brazos, y más débil y estrecha en la región centromérica (FIGURA 17E). Dentro de la región centromérica, en las regiones donde la señal *Sc192pb* es más débil aparece con mayor intensidad la señal de *Bilby*. La intensidad de las señales en los As y los Bs son similares (FIGURA 17 E). Por otro lado, al compararla con *ScCL11* se pudo apreciar que *Sc192pb* posee dos señales en el brazo largo del B, encontrándose estas de manera continua desde la zona distal del bloque 2 hasta la zona próxima del bloque 3, incluyendo la región de eucromatina entre ambos bloques (FIGURA 17 F).

ScCRW2 es una secuencia que aparece de manera continua a lo largo de las regiones centromérica y pericentroméricas del B, se localiza de manera muy similar a *Bilby*, pero *ScCRW2* es más intensa en las zonas pericentroméricas que en la región centromérica, donde, al igual que el resto de secuencias, aparece más estrecha (FIGURA 17 G). Con respecto a los cromosomas A, marca las regiones centromérica y pericentroméricas con similar intensidad a la de los Bs, también marca alguna región de los brazos de los As. En el B, al igual que ocurre con *Sc192pb*, aparecen señales en la zona distal del bloque 2 y zona proximal del bloque 3, incluyendo la región de eucromatina entre ambos (FIGURA 17 H).

pBs301-1 se localiza a lo largo de las regiones centromérica y pericentroméricas del B donde colocaliza con *Bilby*, sin embargo, *pBs301-1* es principalmente pericentromérica, teniendo una señal centromérica mucho más débil que *Bilby*, que predomina en dicha región. Por otro lado, la intensidad es muy similar entre los A y los

Bs (FIGURA 17 I). No se observa ninguna señal de *pBs301-1* en el brazo largo del cromosoma B (FIGURA 17 J).

Sc6C6-3 es una secuencia que se localiza en las regiones centromérica y pericentroméricas del cromosoma B de centeno. Al igual que en el caso de *Sc192pb*, las señales son más intensas en la región pericentromérica y menos intensas y más estrechas en la región centromérica, donde *Sc6C6-3* aparece intercalada con *Bilby*, que se aprecia de manera mayoritaria en dicha región. Por otro lado, la intensidad de *Sc6C6-3* es similar tanto en As como en Bs (FIGURA 17 K). Con respecto al brazo largo del B, no se pudo apreciar ninguna señal de *Sc6C6-3* (FIGURA 17 L).

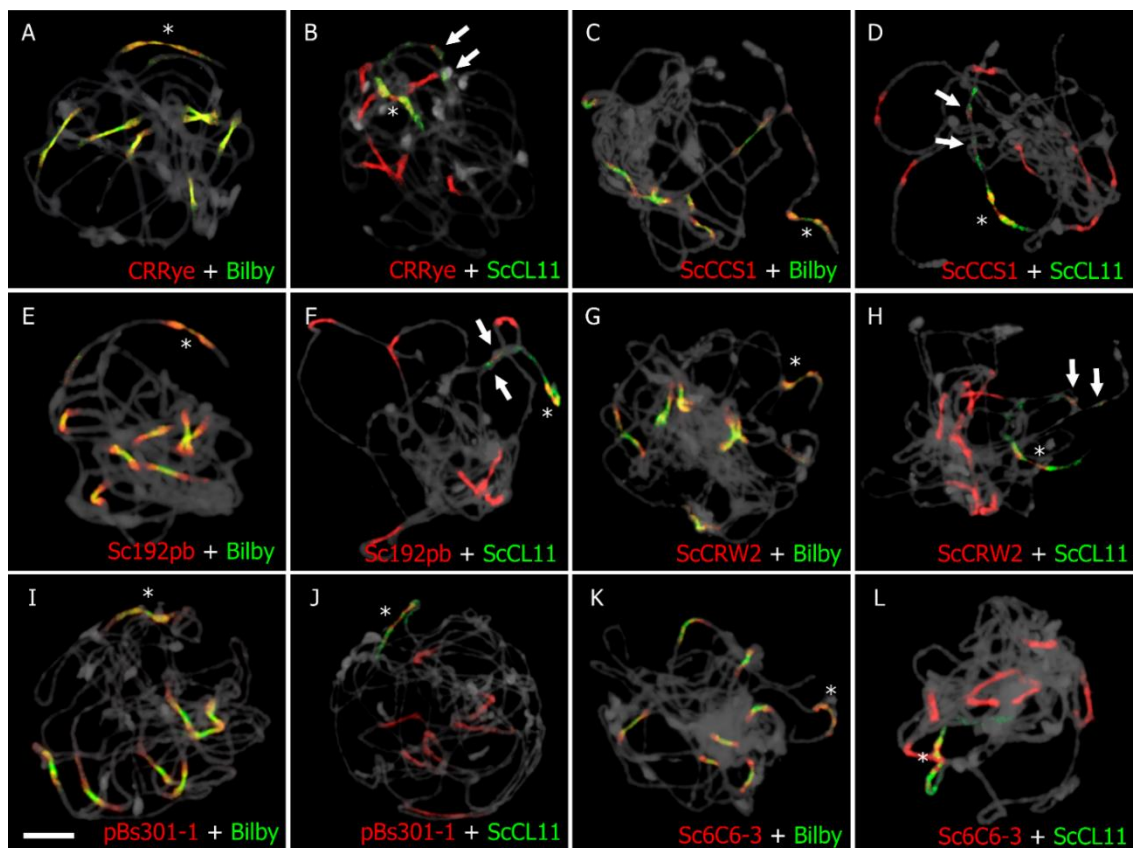


FIGURA 17. Meiocitos de centeno en cigotena/paquitena con 2Bs. **(A y B)** FISH de *CRRye* junto con *Bilby* y *ScCL11*, donde se aprecia que *CRRye* se encuentra de manera continua en el centrómero y se localiza en los bloques 2 y 3. **(C y D)** FISH de *ScCCS1* con *Bilby* y *ScCL11*, donde se aprecia que *ScCCS1* tiene una mayor longitud en la región pericentromérica del brazo corto, además se encuentra en los bloques 2 y 3. **(E y F)** FISH de *Sc192pb* con *Bilby* y *ScCL11*. *Sc192pb* se encuentra en las regiones centromérica y pericentroméricas y en los bloques 2 y 3. **(G y H)** FISH de *ScCRW2* combinada con *Bilby* y *ScCL11*, siendo *ScCRW2* muy similar a *Bilby* en la región centromérica del B, y al igual que en los casos anteriores se encuentra en los bloques heterocromáticos 2 y 3. **(I y J)** FISH de *pBs301-1* con *Bilby* y *ScCL11*. Esta sonda es centromérica y pericentromérica en el B, siendo en los As más pericentromérica, no da señales en los brazos del B. **(K y L)** FISH de *Sc6C6-3* con *Bilby* y *ScCL11*. *Sc6C6-3* se encuentra en las regiones centromérica y pericentroméricas del B, pero no en sus brazos cromosómicos. Las flechas indican los bloques heterocromáticos donde colocalizan las sondas. La región centromérica de los 2Bs está indicada con un asterisco. Barra 10 μ m.

Análisis funcional del centrómero del cromosoma B de centeno en metafase I

Estudios previos fueron realizados en los cromosomas A de plantas de trigo y centeno sin Bs, con las secuencias de ADN propias del trigo (González-García, 2011). Sin embargo, la presente tesis se llevó a cabo en plantas de centeno portadoras de 4 cromosomas B (pertenecientes al cultivar coreano Paldang) con secuencias de ADN obtenidas de centeno como sondas. El estadio meiótico utilizado fue metafase I, ya que en esta fase los centrómeros de los cromosomas se encuentran coorientando hacia los polos celulares. Al estar unidos al huso meiótico, se produce un estiramiento de la región central del centrómero, donde interacciona con los microtúbulos, de manera que se considera a esta zona la región funcional del centrómero. Por tanto, las secuencias centroméricas que se localicen en esta región más estirada se considerarán como funcionales a nivel centromérico. Esto puede observarse tanto en los cromosomas B como en los As. En el presente estudio, se ha podido comprobar que el estiramiento del centrómero del B es menos pronunciado que el de los As, siendo la forma que adquieren los As más apuntada hacia los polos, mientras que la forma que adquiere el B en la región centromérica es más roma y menos estirada.

El análisis funcional de la región centromérica del B se realizó mediante FISH y, al igual que en apartado anterior, se usaron las sondas: *Bilby*, *ScCL11*, *CRRye*, *ScCCS1*, *Sc192pb*, *ScCRW2*, *pBs301-1* y *Sc6C6-3*. Se usó *Bilby* como secuencia de referencia debido a que en el análisis en cigotena y paquitena, era la secuencia que se situaba en la región central del centrómero del B. Además, en estudios previos (González-García, 2011) se ha demostrado que era una de las secuencias que lideraba el estiramiento hacia los polos.

Bilby, por lo general, se encuentra más estirada en el centrómero de los cromosomas A que el resto de secuencias, salvo *CRRye* y *ScCCS1* que se estiran de manera similar. Por otro lado, en el centrómero de los cromosomas B, *Bilby* está menos estirada que en los centrómeros de los As (FIGURA 18).

ScCL11, en la mayoría de los casos analizados, se interna más hacia el brazo cromosómico y aparece menos estirada que *Bilby* en el centrómero del cromosoma B, sin embargo, hay un cierto número de casos en los que *ScCL11* parece que se estira más hacia los polos (FIGURA 18).

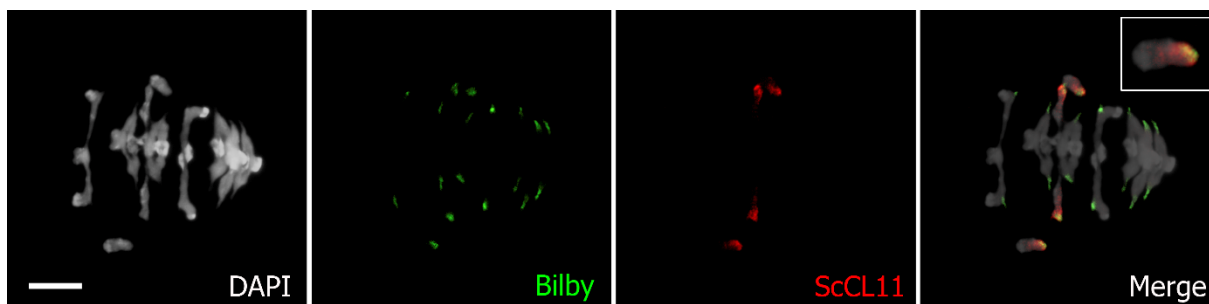


FIGURA 18. Meiocito de centeno en metafase I con 4Bs. FISH con *Bilby* y *ScCL11*, ambas colocalizando a nivel citológico en regiones centroméricas y pericentroméricas. En la ampliación se puede observar como *ScCL11* se interna más en los brazos cromosómicos que *Bilby*. Barra 10 μm .

CRRye se estira de manera similar a *Bilby* tanto en los cromosomas A como en los Bs, colocalizando con ella a nivel citológico y, por tanto, ocupando las mismas regiones (FIGURA 19 A).

ScCCS1 se estira de manera similar a *Bilby* tanto en los cromosomas A como en los Bs, en los cromosomas A aparecen pequeñas señales puntuadas de *ScCCS1* en la zona más estirada, donde está mayoritariamente *Bilby*. Por otro lado, *ScCCS1* ocupa en los Bs una mayor región que *Bilby*, tiene una intensidad mayor y se estira por igual (FIGURA 19 B).

Sc192pb se localiza junto con *Bilby* en la región centromérica de los cromosomas A; sin embargo, aunque ambas estén en la misma región, *Sc192pb* está claramente menos estirada que *Bilby*. Por otra parte, *Sc192pb* predomina en las regiones pericentroméricas de los As. En los Bs, *Sc192pb* se estira de manera muy similar a *Bilby* y colocalizan en la mayor parte de las regiones centromérica y pericentroméricas (FIGURA 19 C).

ScCRW2 se localiza en la región centromérica junto a *Bilby*, sin embargo, al igual que ocurre con *Sc192pb* se estira claramente menos que *Bilby* en los cromosomas A. Además, es más abundante en las regiones pericentroméricas. En los cromosomas B, el estiramiento de *ScCRW2* y *Bilby* es similar y no existe tanta diferencia de localización entre ambas sondas, aunque sigue predominando *ScCRW2* en la zona pericentromérica (FIGURA 19 D).

pBs301-1 está menos estirada que *Bilby* en el centrómero de los cromosomas A, y es más abundante que *Bilby* en la zona pericentromérica. En los cromosomas B, ambas señales se estiran de manera similar, y ambas sondas aparecen colocalizando en la mayor parte de las regiones centromérica y pericentroméricas (FIGURA 19 E).

Sc6C6-3 en los A está menos estirada que *Bilby* en la zona central del centrómero. Ambas colocalizan parcialmente, pero la señal de *Sc6C6-3* es más intensa en las regiones pericentroméricas. En el cromosoma B ambas señales se disponen de manera similar, colocalizando en la mayor parte de la región centromérica y pericentromérica (FIGURA 19 F).

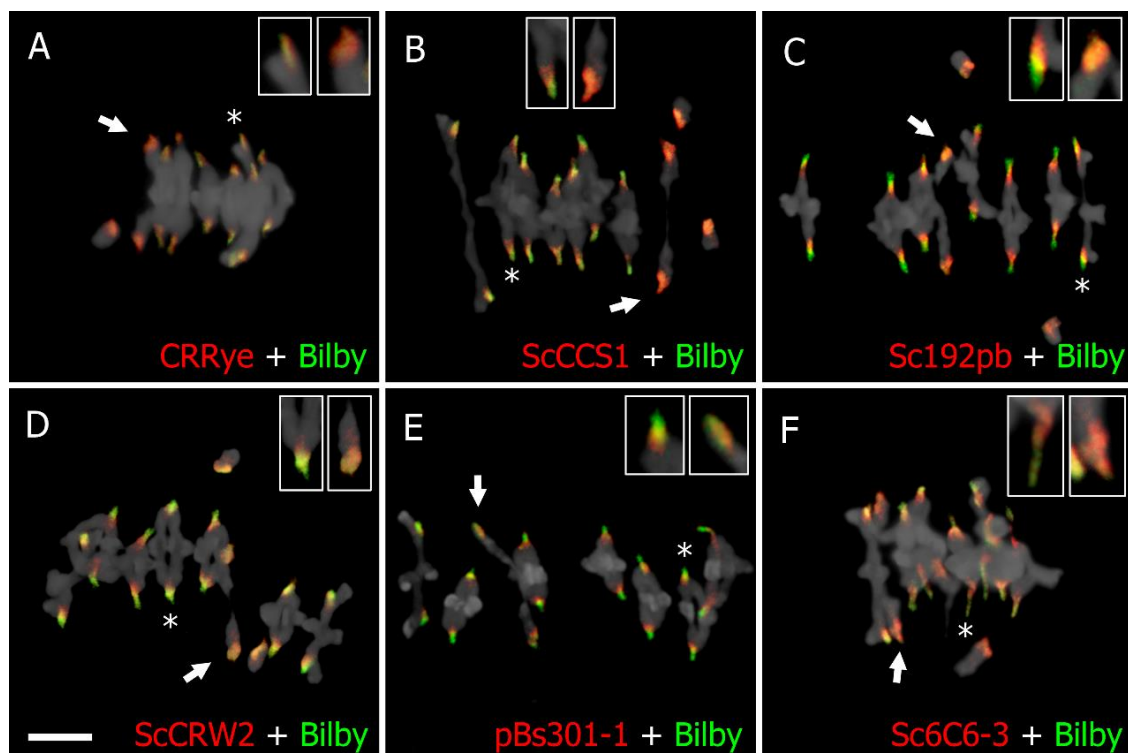


FIGURA 19. Células en metafase I de plantas de centeno portadoras de 4 cromosomas B. **(A)** FISH con las sondas *Bilby* y *CRRye*. *CRRye* se estira de manera muy similar a *Bilby* tanto en As como en Bs ocupando regiones similares. **(B)** FISH con *Bilby* y *ScCCS1*. En los As, *Bilby* es más intensa en la región del estiramiento, mientras que en los Bs la intensidad de ambas sondas es similar. **(C)** FISH con *Bilby* y *Sc192pb*, siendo esta última más abundante en la zona pericentromérica de los As y colocalizando en con *Bilby* en los Bs. **(D)** FISH de *Bilby* con *ScCRW2*. En los As abunda *ScCRW2* en la región pericentromérica, mientras que en los Bs colocalizan ambas sondas. **(E)** FISH con las sondas *Bilby* y *pBs301-1*, donde *pBs301-1* predomina en las regiones pericentroméricas de As y Bs, mientras que en la zona del estiramiento lo hace *Bilby*. **(F)** FISH de *Bilby* con *Sc6C6-3*. Tanto en As como en Bs colocalizan, predominando *Bilby* en el estiramiento de los centrómeros de los As. La combinación de sondas se indica en cada fotografía. En cada imagen se identifica con un asterisco el centrómero del cromosoma A de la ampliación (recuadro izquierdo) y con una flecha el centrómero del cromosoma B de la ampliación (recuadro derecho). Barra 10 μ m.

Distribución y organización de satélites en la región distal del cromosoma B

El análisis se llevó a cabo en plantas de centeno con 2 cromosomas B pertenecientes al cultivar Paldang. Algunas de las secuencias utilizadas en este estudio se han empleado previamente para estudiar su localización en metafase mitótica y en algunas fases de la meiosis (Klemme *et al.*, 2013). En la presente tesis, para una mayor resolución, se estudiaron las fases de cigotena y paquitena, ya que en estos estadios meióticos los cromosomas están menos condensados, lo cual ha permitido realizar un mapeo físico de las secuencias respecto a los 6 bloques de heterocromatina que forman el brazo largo del cromosoma B de centeno (FIGURA 15 B). El análisis se realizó mediante la técnica de FISH usando las siguientes secuencias: los satélites específicos del B de centeno *E3900* (Blunden *et al.*, 1993) y *D1100* (Sandery *et al.*, 1990); las secuencias específicas del brazo largo del B de centeno *Sc9c130*, *Sc21c67*, *Sc26c38* (Klemme *et al.*, 2013) *Sc55-3.FGA* y *Sc63-2.FGA*; *pAtT4* que es la secuencia telomérica de *Arabidopsis thaliana* (Richards y Ausubel, 1988) y *ScCL11* (FIGURA 16) que se usará como secuencia de referencia por sus múltiples señales en diferentes bloques heterocromáticos.

E3900 es un satélite específico de la región terminal del brazo largo del cromosoma B de centeno (Blunden *et al.*, 1993). Al compararla con *ScCL11*, se pudo observar que se localiza en la zona subteloamérica del brazo largo del B, concretamente en el bloque heterocromático 6, salvo en su extremo más distal (FIGURA 20 A). Por otro lado, *E3900* colocaliza totalmente a nivel citológico en el bloque 6 con *D1100* (FIGURA 20 B).

D1100 es un satélite específico de la región distal del cromosoma B de centeno (Sandery *et al.*, 1990). La presente tesis ha permitido demostrar que esta secuencia produce 3 señales, y que cada una de ellas corresponde a un bloque heterocromático diferente de la zona distal del brazo largo del cromosoma B. Más concretamente, la primera señal se corresponde con la mitad distal del bloque heterocromático 4, y las otras dos señales con los bloques heterocromáticos 5 y 6. El bloque 5 está marcado casi en su totalidad por *D1100*, mientras que el bloque 6 está marcado entero salvo el extremo más distal. Colocaliza a nivel citológico con *E3900* en el bloque heterocromático 6. (FIGURA 20 B).

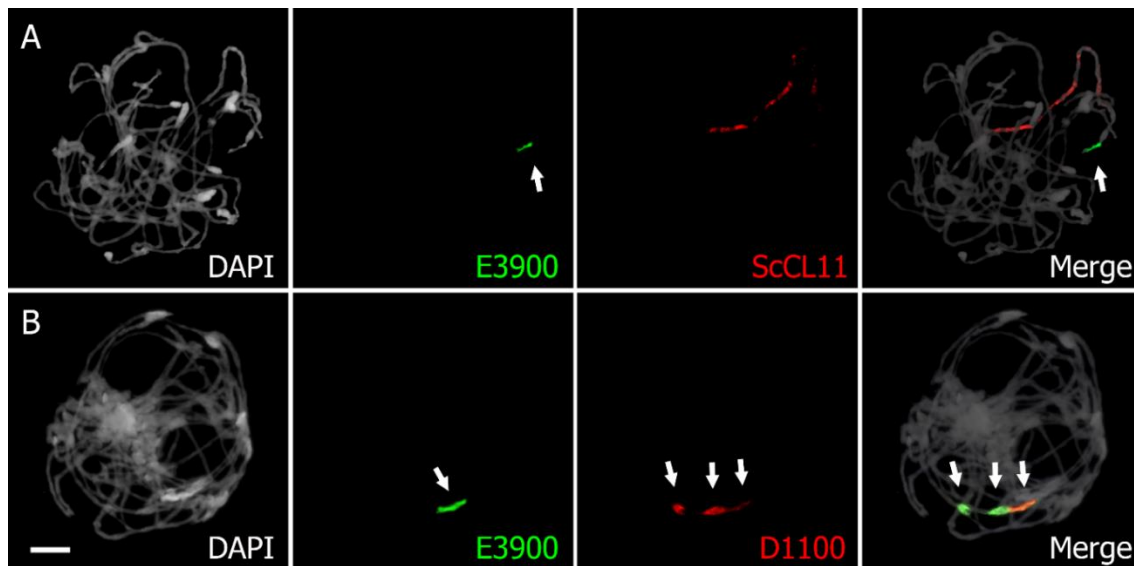


FIGURA 20. Meiocitos de centeno en cigotena/paquitena con 2Bs. **(A)** FISH con *E3900* junto con *ScCL11*, donde se aprecia que *E3900* se encuentra de manera continua en el bloque 6, salvo en su región distal. **(B)** FISH con *E3900* y *D1100*, donde se aprecia que *D1100* colocaliza en el bloque 6 con *E3900*, además se localiza en bloque 5 y en la mitad distal del bloque 4. Las flechas indican los bloques heterocromáticos que ocupan las sondas. Barra 10 μm .

El uso de *ScCL11* para mapear *E3900* y *D1100*, nos ha permitido incorporar estas dos sondas como sondas de referencia para la región subtelomérica del cromosoma B de centeno. Por este motivo, el resto de los análisis secuencias repetidas localizadas en la región distal se harán en referencia a *E3900*, *D1100* y *ScCL11*.

***Sc9c130* (*Sc9*)** es una secuencia repetida en tándem que localiza en el extremo distal del brazo largo del cromosoma B, mostrando una señal subtelomérica puntiforme al final del bloque 6, que se aprecia justo a continuación de la sonda *E3900* (FIGURA 21 A). También se hibridó junto con *ScCL11* y se pudo apreciar que se encuentra en la región distal del brazo largo, alejada de la señal del bloque 4 de *ScCL11* (FIGURA 21 B). Además, se realizó un estudio comparativo de la sonda *Sc9* junto con la sonda telomérica de *Arabidopsis thaliana pAtT4*, pudiendo comprobar que la sonda *Sc9* se encuentra al final del bloque 6 (FIGURA 21 C), pero no es totalmente distal, ya que en los núcleos interfásicos se puede apreciar un pequeño espacio entre dichas sondas. (FIGURA 21 D).

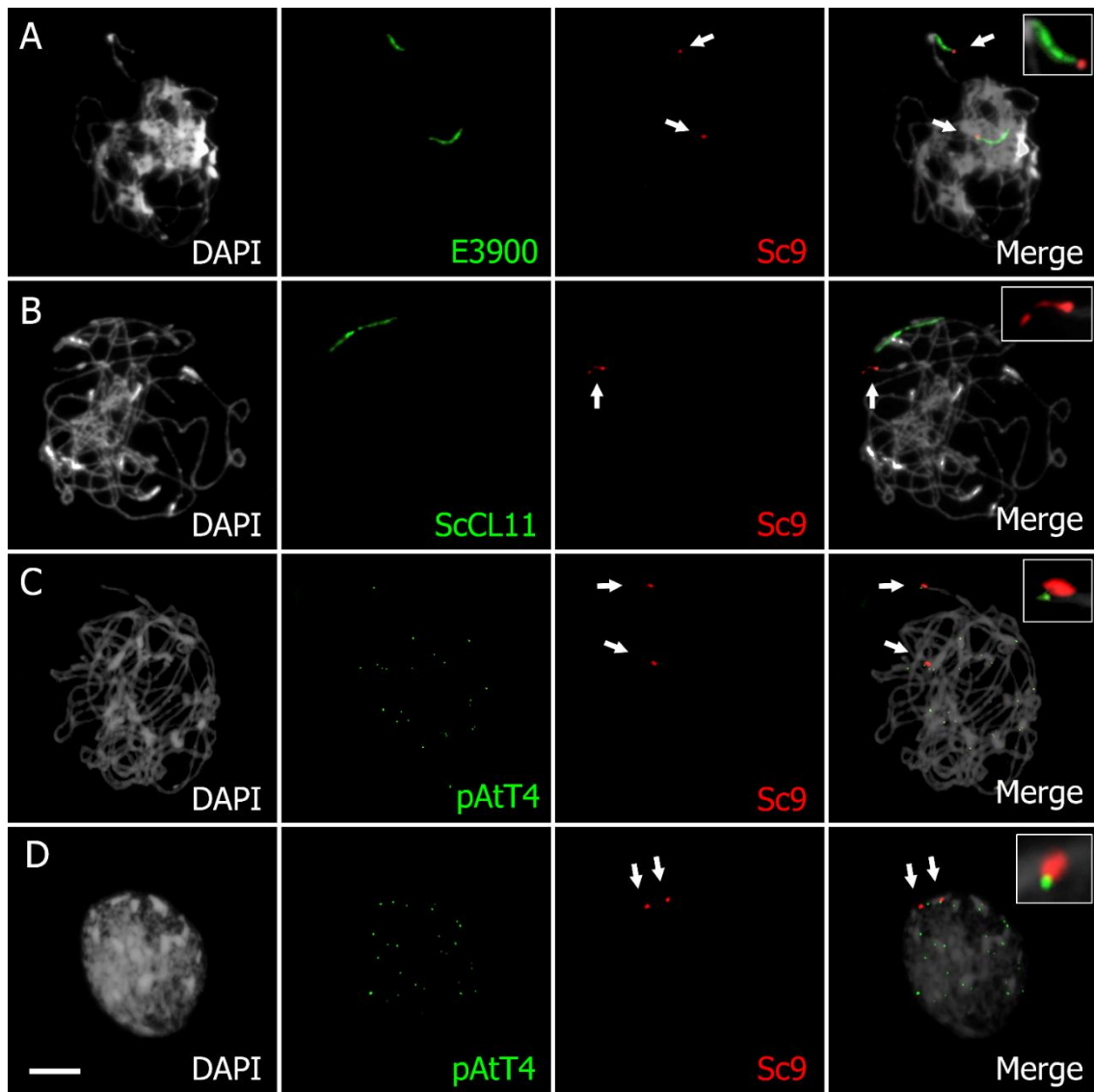


FIGURA 21. Meiocitos de centeno con 2Bs. **(A)** Cigotena/paquitena donde *Sc9* se localiza exactamente en el extremo distal del brazo largo del B, a continuación de la sonda *E3900* que marca la región subtelmérica. **(B)** Cigotena/paquitena en la que *Sc9* se encuentra en extremo distal del brazo largo y *ScCL11* marcando la región pericentromérica del cromosoma B. **(C)** Paquitena en la que se aprecia como *Sc9* se localiza adyacente a la región telomérica marcada por *pAtT4*. **(D)** Núcleo interfásico en el cual *Sc9* se encuentra cerca de *pAtT4* pero sin llegar a solapar. Las sondas empleadas en FISH se encuentran indicadas en cada fotografía. Las flechas indican la localización de *Sc9*. Barra 10 μm .

***Sc21c67* (*Sc21*)** es una secuencia repetida que se localiza en la región subtelmérica del brazo largo del cromosoma B, en la zona correspondiente al bloque 6. A nivel citológico colocaliza parcialmente con la sonda *E3900*, pudiéndose apreciar pequeñas regiones donde abunda más una de las dos sondas (FIGURA 22 A). Se comprobó también su localización comparándola con la sonda *ScCL11*, y pudo observarse que *Sc21* está en la región distal del brazo largo correspondiente al bloque 6 (FIGURA 22 B).

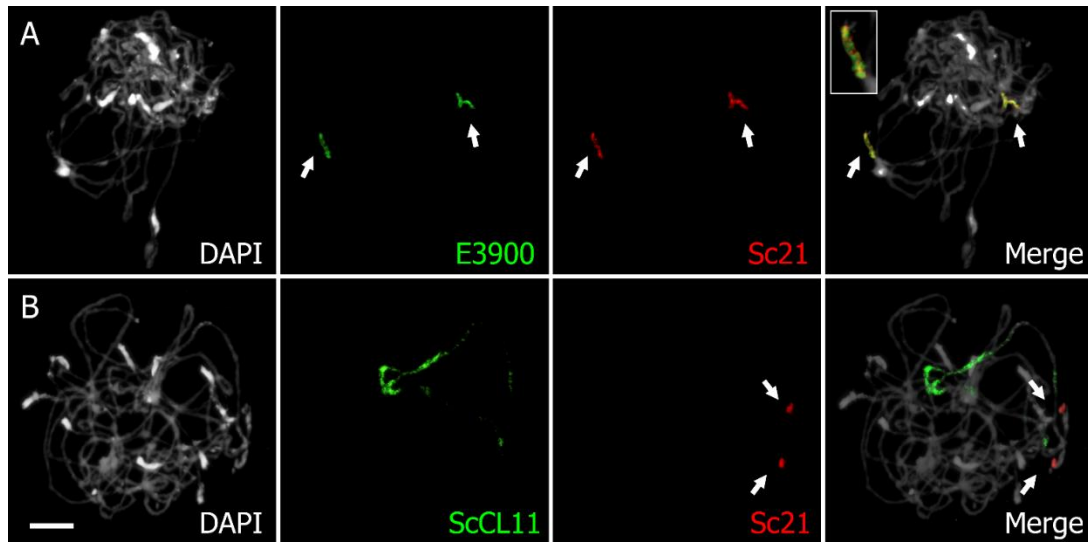


FIGURA 22. Meiocitos de centeno con 2 cromosomas B. **(A)** Cigotena/paquitena en la cual *Sc21* colocaliza a nivel citológico parcialmente con la sonda *E3900*, pudiéndose apreciar pequeñas regiones donde abunda más una de las dos sondas. **(B)** Cigotena/paquitena donde *Sc21* localiza en la zona subtelomérica mientras que *ScCL11* localiza principalmente en la región pericentromérica. Las flechas indican la localización de *Sc21* y *E3900*. La combinación de sondas empleada se encuentra indicada en cada fotografía. Barra 10 μm .

***Sc26c38* (*Sc26*)** es una secuencia que muestra dos señales en el brazo largo del cromosoma B. Al hibridarla junto con *E3900* se identifica que marca las regiones correspondientes a los bloques 4 y 5 de heterocromatina del cromosoma B (FIGURA 23 A). La señal correspondiente al bloque 4 se encuentra a continuación de la de *D1100* y marca la parte distal de dicho bloque. Esta señal es de menor tamaño que la del bloque 5, donde *Sc26* se encuentra en la zona central, estando flanqueada por *D1100* con la que colocaliza en las zonas adyacentes (FIGURA 23 B). También se comprobó la localización de la sonda *Sc26* con respecto a la sonda pericentromérica *ScCL11*, pudiéndose apreciar como en la parte proximal del bloque 4 hay una señal de *ScCL11* y al final del mismo se encuentra la señal de *Sc26* (FIGURA 23 C). Ambas sondas se encuentran separadas una de otra, sin colocalizar.

***Sc55-3.FGA* (*Sc55*)** es un satélite situado en el brazo largo del cromosoma B, concretamente en la región distal del bloque heterocromático 2 y en la región proximal del bloque 4. La señal correspondiente al bloque 2 es la más intensa de las dos y está flanqueada por las señales de *ScCL11* en este mismo bloque, mientras que la señal del bloque 4, es más tenue y colocaliza a nivel citológico con *ScCL11* (FIGURA 24 A). Con respecto a *D1100*, podemos ver como *Sc55* ocupa la zona proximal del bloque 4 y *D1100*

ocupa la región más distal, estando ambas señales muy cercanas, pero sin llegar a colocalizar (FIGURA 24 B).

Sc63-2.FGA (*Sc63*) es una secuencia repetida que ocupa una región similar a *Sc55*, por ese motivo se comparó con ella además de con *ScCL11* y *D1100*. *Sc63* se localiza en la región distal del bloque heterocromático 2 y en la mitad proximal del bloque 4. La señal del bloque 2 es más tenue y que la del bloque 4 (al revés que *Sc55*), y en ambos bloques colocaliza con *ScCL11* (FIGURA 24 C). Con respecto a *D1100*, se puede observar como *Sc63* marca la mitad proximal del bloque 4, mientras que *D1100* marca la mitad distal del mismo. Ambas son consecutivas, pero no llegan a colocalizar (FIGURA 24 D). Por último, con respecto a su comparación con *Sc55*: en el bloque 2, la señal de *Sc63* es más grande y aparece flanqueando la señal de *Sc55*, aunque ambas colocalizan. En el bloque 4, *Sc55* localiza en la zona proximal mientras que *Sc63* en la primera mitad del bloque y ambas colocalizan en la zona media (FIGURA 24 E).

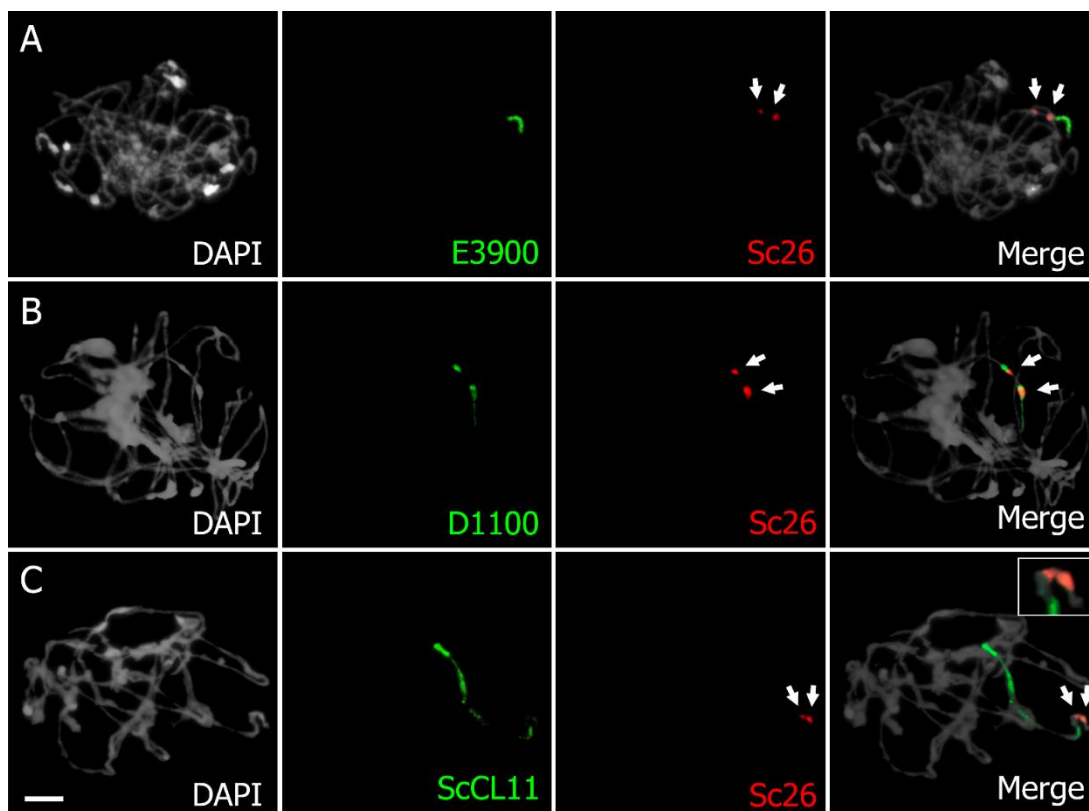


FIGURA 23. Meiocitos de centeno con 2Bs. **(A)** Cigotena/paquitena en las que se puede apreciar como *Sc26* se localiza en los bloques heterocromáticos 4 y 5 del B de centeno, anteriores al bloque 6 en el cual se localiza *E3900*. **(B)** Paquitena donde se puede apreciar como *Sc26* colocaliza a nivel citológico con *D1100* en los bloques 4 y 5. **(C)** Paquitena en la que se muestra que el bloque 4 comienza con una pequeña señal de *ScCL11* y de cómo la señal de *Sc26* marca la mitad más distal de este. La combinación de sondas empleada en FISH se encuentra indicada en cada fotografía. Barra 10 μm .

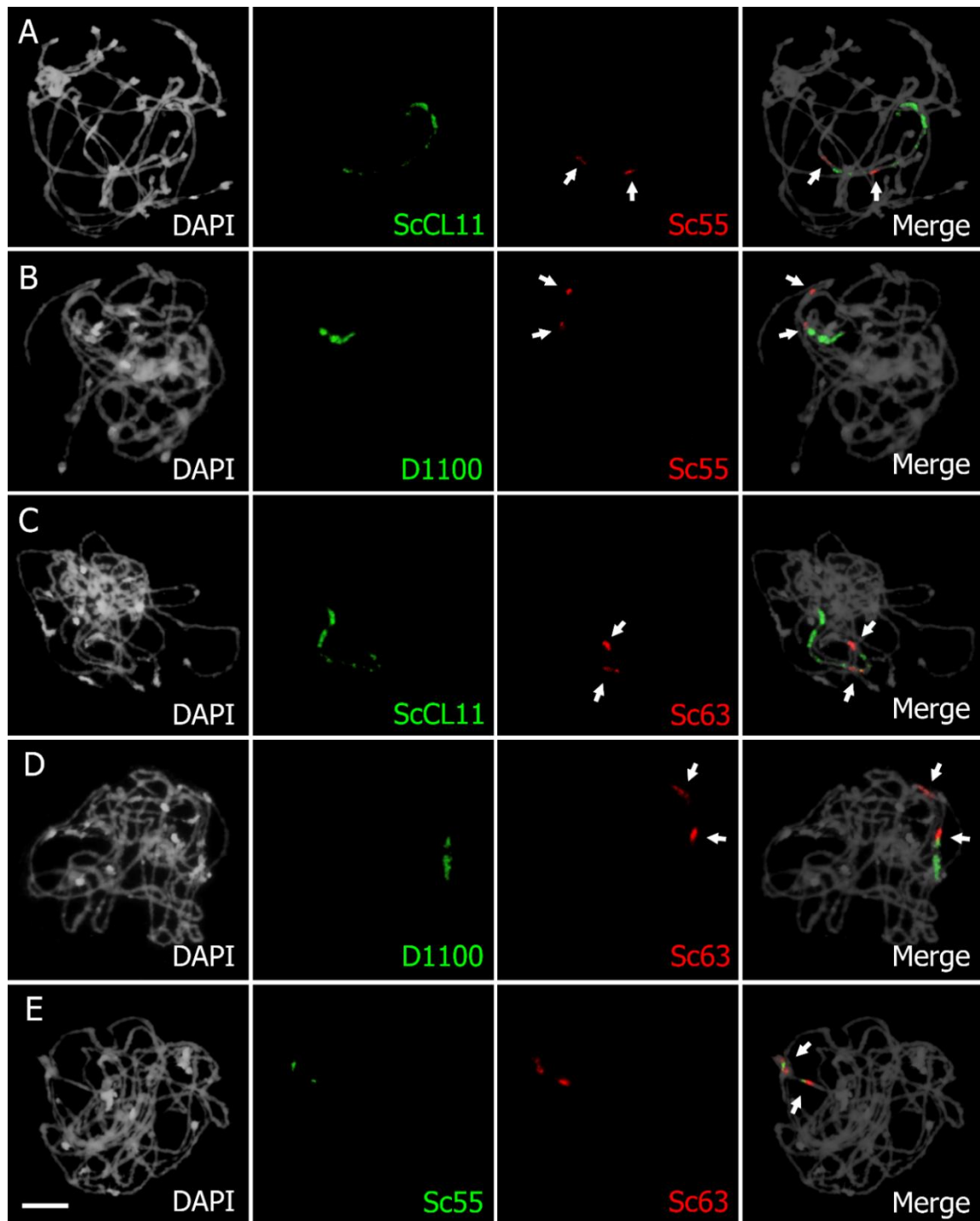


FIGURA 24. Meiocitos de centeno con 2Bs. **(A)** FISH de *ScCL11* y *Sc55* en paquitena donde se puede apreciar que *Sc55* se localiza en la región final del bloque heterocromático 2 y en la zona región proximal del bloque 4. **(B)** FISH de *D1100* y *Sc55* en paquitena donde, *Sc55* localiza en la zona inicial del bloque 4, *D1100* en la zona distal del mismo bloque. **(C)** FISH de *ScCL11* y *Sc63* en paquitena, en la que se demuestra que *Sc63* se localiza en la zona final del bloque 2 y en la región media del bloque 4. **(D)** Paquitena donde se han hibridado *D1100* y *Sc63*, en la que se aprecia como ambas sondas están adyacentes en la zona media del bloque 4. **(E)** Paquitena hibridada con *Sc55* y *Sc63* donde se aprecia como ambas sondas aparecen intercaladas en la zona distal del bloque 2 y de manera contigua en el bloque 4. Las sondas empleadas en FISH se encuentran indicadas en cada fotografía. Barra 10 μm .

Localización subtelomérica de *ScCL11*

Como resultado del mapeo de las secuencias se pudo apreciar que *ScCL11* además de hibridar en la región pericentromérica, también localiza en varios lugares intersticiales del brazo largo del cromosoma B correspondientes a los bloques heterocromáticos 2, 3 y 4 (FIGURA 16). Esta secuencia es la única específica del B que ocupa la zona pericentromérica donde se produce la no disyunción, por tanto, era de gran interés comprobar si *ScCL11* ocupa también la porción distal, que controla la no disyunción. Para ello se comparó mediante FISH el marcaje de *ScCL11* con el resto de sondas, y se pudo observar que esta secuencia colocalizaba a nivel citológico con *E3900* en la zona subtelomérica del brazo largo del B correspondiente al bloque heterocromático 6 (FIGURA 25). Este fenómeno se vio en cigotena/paquitena y diplotena tanto en Puyo como Paldang, en varias plantas para cada variedad (8 de Puyo y 5 de Paldang, pertenecientes a diferentes generaciones de los años 2011, 2012 y 2013). Además, pudieron apreciarse diferencias entre las dos variedades en la señal encontrada en paquitena, siendo la de Paldang mas alargada y con una pequeña constricción (FIGURA 25 A), mientras que en la paquitena de Puyo la señal era pequeña y puntiforme (FIGURA 25 C). Con respecto a la diplotena, tanto en Paldang (FIGURA 25 B) como en Puyo (FIGURA 25 D) la señal es muy similar, no apreciándose diferencias significativas.

La colocalización citológica de *ScCL11* y *E3900* fue estudiada por medio del microscopio de super resolución Elyra PS.1 (IPK, Gatersleben, Alemania) en el cultivar Paldang, observándose como, en paquitena, ambas sondas aparecen intercaladas en la región perteneciente al bloque 6 del cromosoma B (FIGURA 26 A y 26 C). En alta resolución las señales de *E3900* son continuas, mientras que las de *ScCL11* aparecen discontinuas o punteadas, como se puede apreciar en las ampliaciones (FIGURA 26 B y FIGURA 26 D). De esta manera, la señal que producen las sondas está indicando una menor cantidad de *ScCL11* que de *E3900* en la región distal del cromosoma B de centeno.

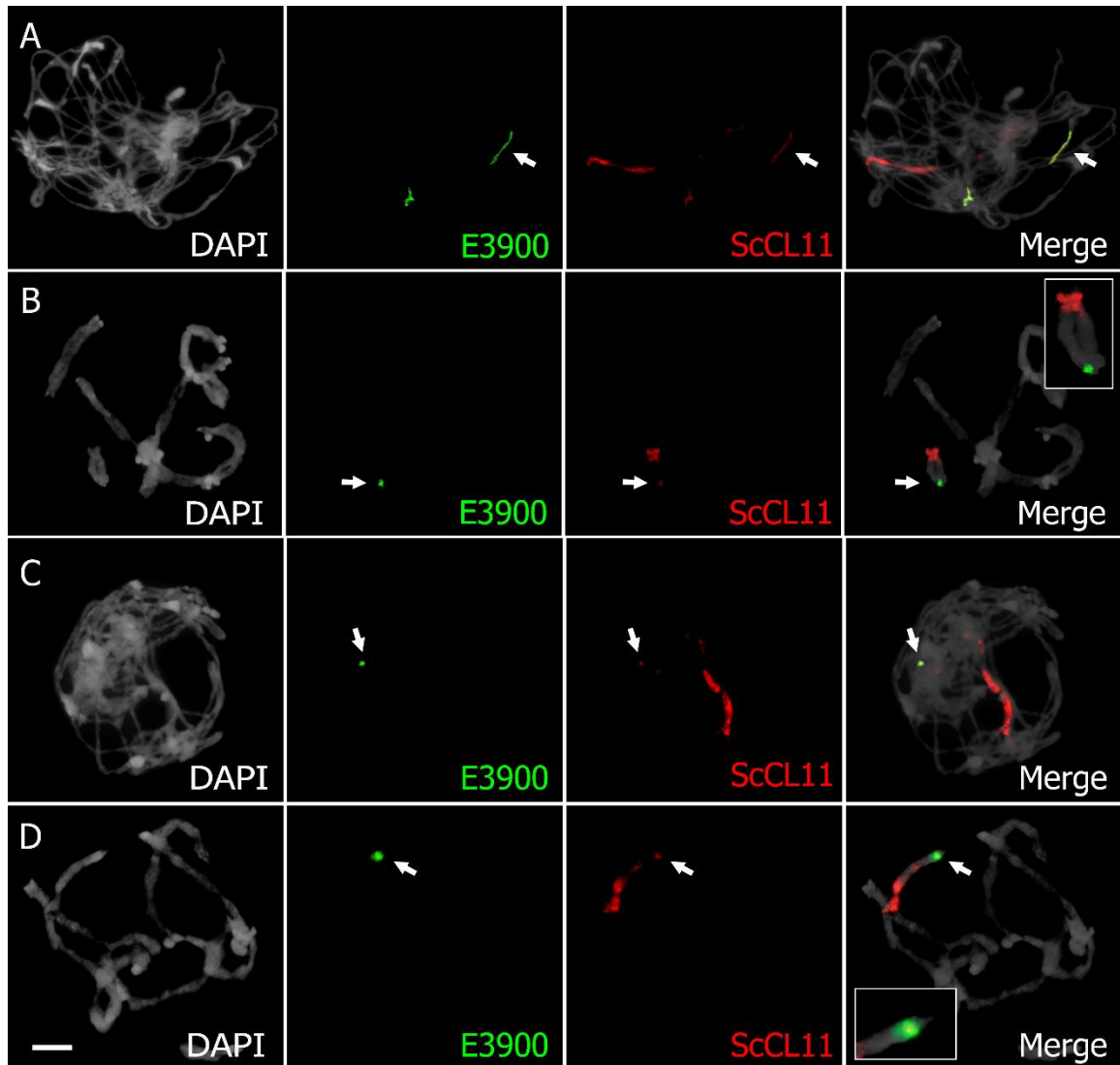


FIGURA 25. Meiocitos de centeno con 2Bs. **(A y B)** Cigotena y diplotena de Paldang 11pal 8 y 12IJ2-2-3 respectivamente, donde *E3900* colocaliza a nivel citológico con *ScCL11* en la zona subtelomérica. En imagen **A** la señal es alargada con una constricción. **(C y D)** Paquitena y diplotena de Puyo (11pu) donde *E3900* colocaliza a nivel citológico con *ScCL11* en la zona subtelomérica. En este caso, en la imagen **C** la señal es puntiforme. La combinación de sondas empleada se encuentra indicada en cada fotografía y en la superposición se muestra aumentada la región subtelomérica. Barra 10 μm .

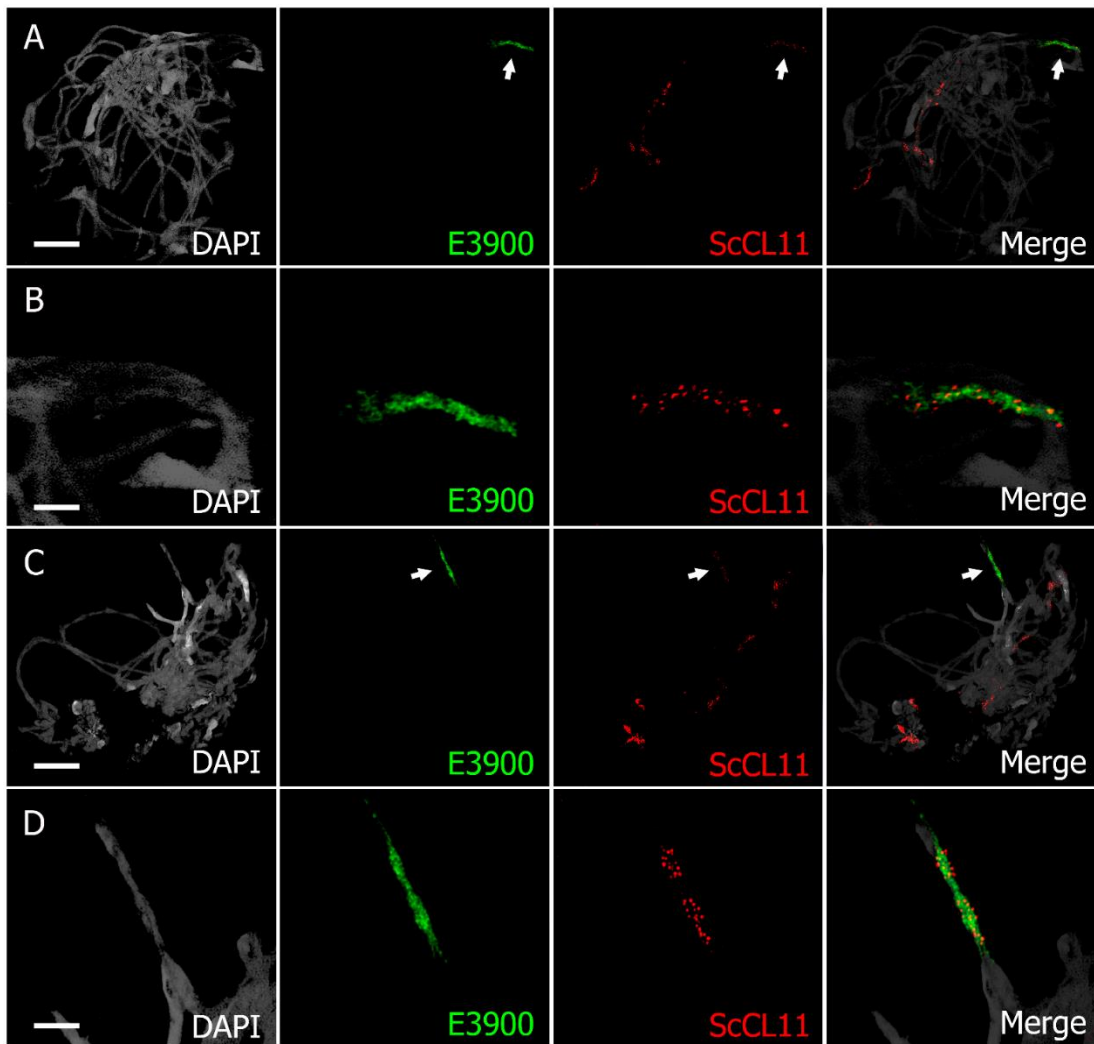


FIGURA 26. Meiocitos de centeno de Paldang con 2Bs en paquitena fotografiados con el microscopio Elyra PS.1. **(A y C)** *E3900* aparece con señales de hibridación continuas mientras que *ScCL11* muestra señales discontinuas o punteadas en la zona subtelomérica. **(B y D)** Ampliación de la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma B. La combinación de sondas empleada se encuentra indicada en cada fotografía. Barra 10 μm para imágenes **(A y C)** y barra 3 μm para imágenes **(B y D)**.

Inmunolocalización de CENH3 en el B de centeno

En el mapeo de las secuencias del cromosoma B de centeno en paquitena, se pudo apreciar como muchas de las secuencias centroméricas usadas, no eran únicamente centroméricas, sino que también se localizaban en las regiones pericentroméricas y en algunos casos en los brazos cromosómicos, marcando muchas de ellas los bloques 2 y 3. Por ello se decidió realizar una inmuno-FISH en plantas del cultivar Paldang portadoras de 2 cromosomas B, en los estadios de cigotena/paquitena, diacinesis y metafase I. Esta técnica consistió en una inmunolocalización de la histona

centromérica CENH3, seguida de una FISH con las sondas *ScCL11* y *E3900*, ambas específicas del B, con el fin de identificar el centrómero y el extremo distal del mismo, para determinar si hay secuencias centroméricas capaces de reclutar nucleosomas centroméricos en lugares diferentes al centrómero.

Se observó que la histona centromérica CENH3 únicamente aparecía intercalada, y sin solapar, con las señales de *ScCL11* de la región centromérica, tanto en paquitena (FIGURA 27 A) y diacinesis (FIGURA 27 B), como en metafase I (FIGURA 27 C). Nunca se vió señal de CENH3 en el brazo largo del B ni se vió que la señal de la histona centromérica se adentrase en la heterocromatina pericentromérica de dicho cromosoma. Además, se realizaron mediciones de las áreas de los centrómeros de un total de 69 cromosomas A y B. Con estos datos se realizó una prueba de t de Student, y se pudo determinar que no había diferencias significativas ni de tamaño ni de intensidad entre las señales de CENH3 de los centrómeros de los As y el centrómero del B ($t = -2,128$, P valor = 0,1004; $n = 10$ Bs y 59 As).

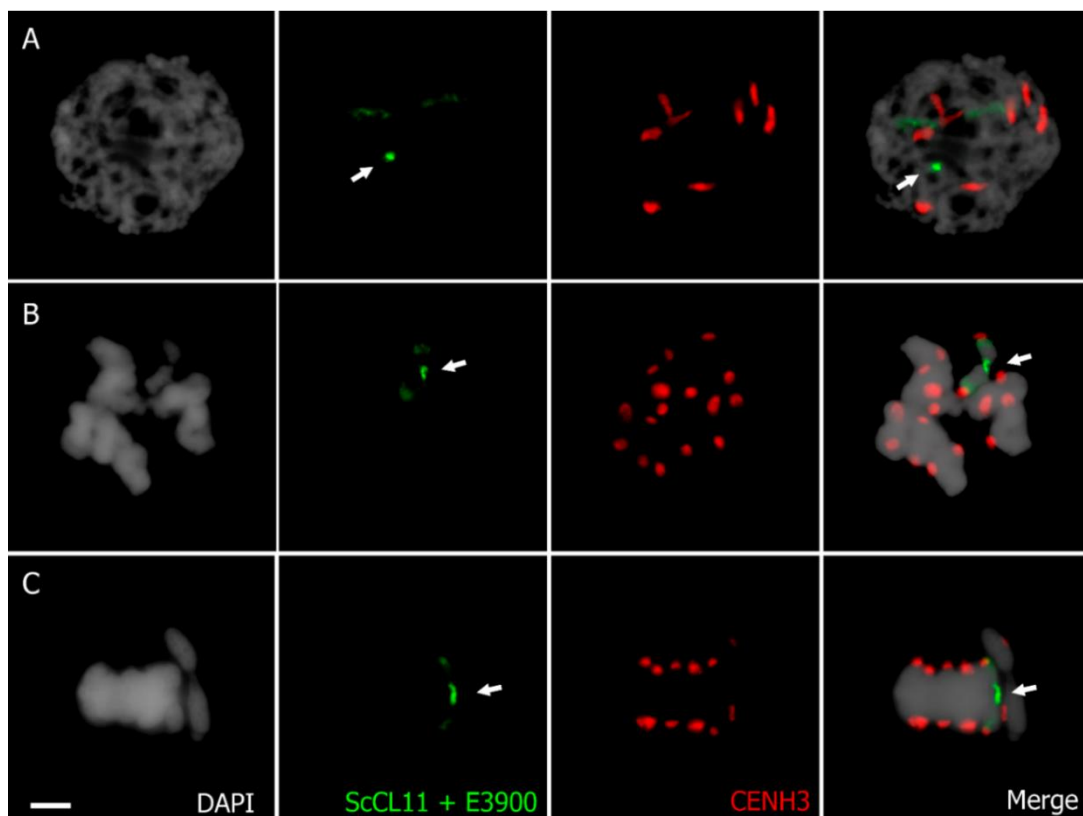


FIGURA 27. Inmuno-FISH de CENH3 con las sondas *ScCL11* y *E3900* en meiocitos de centeno portadores de 2Bs. **(A)** Paquitena, **(B)** Diacinesis, y **(C)** Metafase I. Las flechas marcan la localización de la sonda *E3900*. La señal de CENH3 de los B es similar a la señal de los A y en el cromosoma B únicamente se marca con CENH3 la región centromérica donde se encuentra *ScCL11*, con la cual no colocaliza. Barra 10 μm .

Análisis de la localización del ADN de orgánulos

El ADN de orgánulos se había localizado previamente en el B de centeno por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012) (ADN mitocondrial), Martis *et al.* (2012) y Klemme *et al.* (2013) (ADN cloroplasto), en metafase mitótica, donde los cromosomas están muy condensados. Por ello, para obtener una localización con mayor resolución, en la presente tesis se ha recurrido nuevamente a los cromosomas menos condensados de cigotena y paquitena. El mapeo físico del ADN de los orgánulos en el cromosoma B de centeno se ha realizado respecto a los 6 bloques de heterocromatina del brazo largo. El análisis se realizó por medio de FISH usando las secuencias de ADN mitocondrial y ADN del cloroplasto comparando su localización con la sonda de referencia *ScCL11*.

Las señales del **ADN mitocondrial**, se encuentran a lo largo de todo el cromosoma B de centeno, ocupando regiones en el brazo corto, en el centrómero y en el brazo largo. En el brazo corto pueden apreciarse tres señales diferentes, la primera, de mayor tamaño e intensidad, se encuentra fuera de la región pericentromérica marcada por *ScCL11*, más concretamente en la región subtelomérica. Las otras dos señales se encuentran en la región pericentromérica colocalizando con *ScCL11*; la más débil se encuentra en la zona media del brazo, y la más intensa (de similar intensidad a la señal subtelomérica) se encuentra adyacente al centrómero, el cual también está marcado en su mayor parte por el ADN mitocondrial, pero con una intensidad menor a la de las regiones pericentroméricas. En el brazo largo se pueden apreciar cinco señales, una en la región pericentromérica y cuatro en los bloques heterocromáticos. La señal que se encuentra en la región pericentromérica colocaliza con *ScCL11* y es colindante al centrómero y, junto con la señal pericentromérica del brazo corto, delimita el centrómero. La primera señal de los bloques heterocromáticos se encuentran en el bloque 1 marcándolo en su totalidad, siendo esta señal de similar intensidad a la señal pericentromérica. A continuación, se encuentra una señal más pequeña que marca únicamente el extremo proximal del bloque 2. Otra señal de pequeño tamaño, muy débil y dispersa se encuentra en el extremo distal del bloque 3, adyacente a una señal más intensa, similar a las señales pericentroméricas, que marca el tercio proximal del bloque heterocromático 4. Tanto la señal del bloque 3 como la del bloque 4 colocalizan parcialmente con *ScCL11*. También se observa un punteado del ADN mitocondrial entre

algunos bloques de heterocromatina del cromosoma B (FIGURA 28 A), así como en algunos de los cromosomas A si se aumenta mucho el tiempo exposición.

Las señales del **ADN del Cloroplasto** se encuentran tanto en la región pericentromérica del cromosoma B de centeno como en varios de los bloques heterocromáticos que conforman el brazo largo del mismo. Las señales pericentroméricas localizan tanto en el brazo corto como en el largo. La del brazo corto es tenue y colindante a la región centromérica, mientras que en el brazo largo hay dos localizaciones, una más débil (de similar intensidad a la del brazo corto) cercana al centrómero y otra muy intensa en una zona más distal de la región pericentromérica, que colocaliza con *ScCL11*. Además, hay 4 señales intersticiales en el brazo largo, que localizan en los bloques heterocromáticos 1, 2, 3 y 4. La señal del bloque 1 es tenue y localiza en la zona central de este. Las señales de los bloques 2 y 3 son más intensas y se encuentran en la zona distal del bloque 2 y proximal del bloque 3. En este último se encuentra intercalada con *ScCL11*. Por último, la señal del bloque 4 es más tenue y difusa que las dos anteriores y se encuentra en el extremo proximal de dicho bloque (FIGURA 28 B). En ocasiones también se pueden apreciar pequeñas señales del ADN de cloroplasto en los As cuando se aumenta el tiempo de exposición.

Para finalizar se realizó una FISH utilizando las sondas de ADN de ambos orgánulos al mismo tiempo, pudiéndose apreciar que ambos colocalizan a nivel citológico en las regiones pericentroméricas adyacentes al centrómero, en el bloque heterocromático 1 y en la zona distal del bloque 3 y en la zona proximal del 4 (FIGURA 28 C).

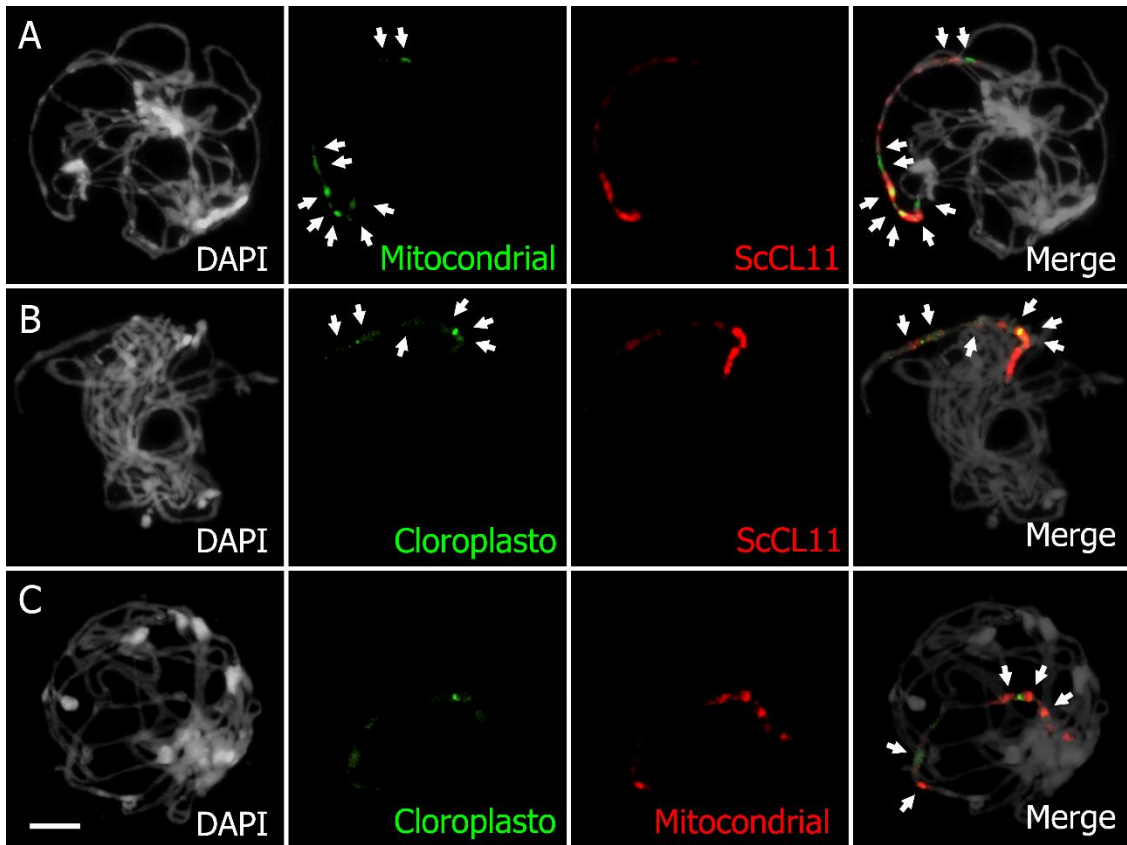


FIGURA 28. Meiocitos de centeno con 2Bs. **(A)** Cigotena/paquitena donde se compara el ADN mitocondrial (indicado con flechas) con la sonda *ScCL11*. **(B)** Paquitena donde se compara el ADN del cloroplasto (indicado con flechas) con *ScCL11*. **(C)** Paquitena en la que se puede apreciar la hibridación conjunta de las sondas procedentes de orgánulos y cómo estas colocalizan a nivel citológico en los lugares marcados por las flechas. La combinación de sondas empleada en FISH se encuentra indicada en cada fotografía. Barra 10 µm.

Todas las sondas identificadas y localizadas en centrómero, regiones pericentroméricas y los diferentes bloques heterocromáticos que forman el brazo largo del B, fueron representadas y esquematizadas en función de la FIGURA 15 B, obteniendo un mapa completo de secuencias representado en la FIGURA 29.

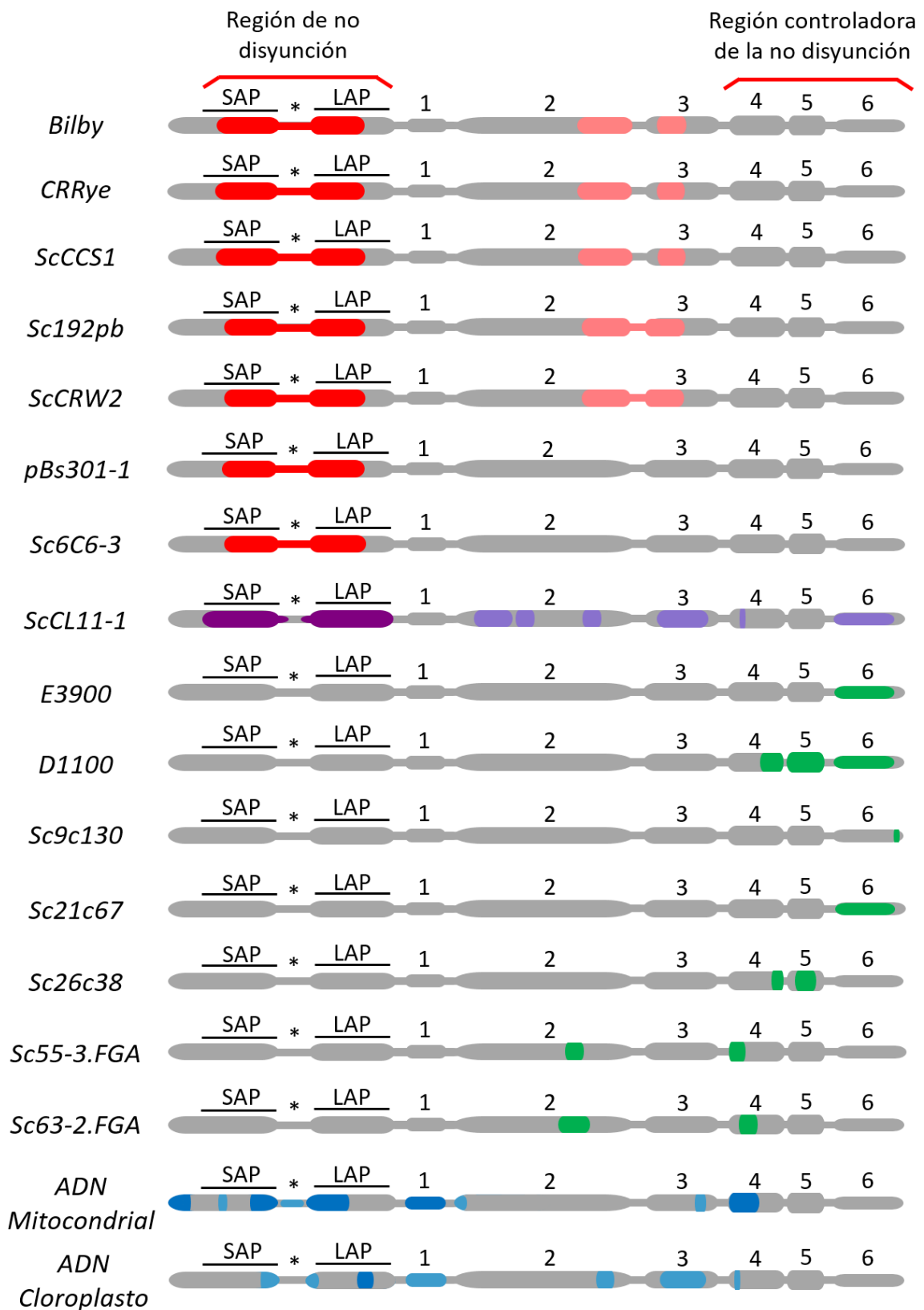


FIGURA 29. Representación esquemática del cromosoma B, con la localización de las secuencias de ADN utilizadas. Los bloques heterocromáticos del brazo largo están marcados con números, los pericentromeros están señalados como SAP (*Short Arm Pericentromere*) y LAP (*Long Arm Pericentromere*), el centrómero está indicado por un asterisco y las regiones donde se produce y controla la no disyunción esta indicadas en la parte superior.

MINICROMOSOMA B

Durante el transcurso de los análisis estructurales del cromosoma B, en la descendencia de plantas del cultivar Paldang, se descubrió un nuevo derivado del cromosoma accesorio, de menor tamaño, cuyo estudio podía resultar de gran interés. En este apartado se ha realizado un análisis sobre el origen de este nuevo derivado por medio del estudio de su genealogía; además de un estudio de su transmisión por medio de diferentes cruzamientos, un análisis estructural por medio de FISH con sondas específicas del cromosoma B de centeno, y un estudio de su comportamiento tanto mitótico como meiótico mediante FISH e inmunolocalización de CENH3.

Origen del minicromosoma B

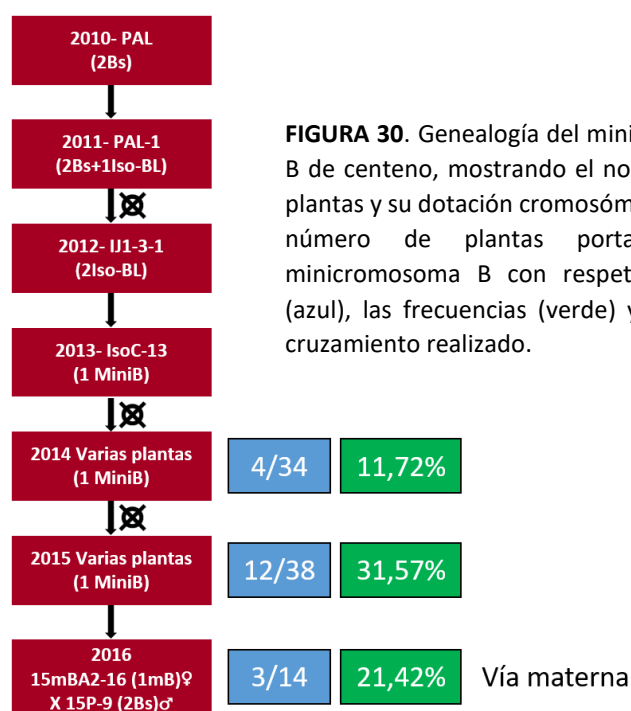
En el año 2013, comprobando la dotación cromosómica de las plantas sembradas, se encontró una planta (2013-IsoC-13) que portaba un cromosoma B de muy pequeño tamaño. Al tratarse de un cromosoma accesorio de tamaño inferior a un tercio del menor de los cromosomas A, se le denominó minicromosoma B (miniB).

Esta planta descendía de la planta 2012-IJ1-3-1 por polinización abierta, la cual era portadora de 2 isocromosomas para el brazo largo del B (Iso-BL), y que a su vez procedía de la autofecundación de la planta 2011-Pal-1 que era portadora de 2Bs y un Iso-BL. Esta última planta procedía por polinización abierta de otra (2010-Pal) portadora de 2Bs (FIGURA 30).

La planta portadora del miniB (2013-IsoC-13) se autofecundó en 2013, dando lugar a 34 descendientes, de los cuales únicamente 4 eran portadores del miniB (11,72% de la descendencia). En el año 2014, se seleccionó una de estas plantas (2014-IsoC-13A-3) y se autofecundó nuevamente, obteniéndose en el año 2015 una descendencia de 38 plantas, de las cuales únicamente 12 eran portadoras del miniB (31,57%) (FIGURA 30).

En el año 2016, para profundizar en el estudio de la transmisión del miniB, se analizó la descendencia de diez cruzamientos diferentes, siendo dos de ellos autofecundaciones y el resto, cruzamientos dirigidos con plantas con Bs en ambas direcciones (ejerciendo la planta con el miniB tanto de parental masculino como femenino) (TABLA 2). El resultado fue que el miniB, se transmitió sólo en uno de los

cruzamientos (15mBA2-16 (1mB) ♀ X 15P-9 (2Bs) ♂), encontrándose en esta descendencia tres individuos portadores del miniB y cuatro con el B estándar, pero ninguno con ambos tipos de cromosomas. En este cruzamiento, la transmisión del miniB fue por vía materna, puesto que el parental femenino era el único portador (TABLA 2). En la descendencia de este cruzamiento se observaron miniBs en 3 de las 14 plantas, por tanto se estimó que la transmisión por vía materna del miniB es del 21,42% (FIGURA 30) (TABLA 2).



Cruzamiento	MiniB	OBs	1Bs	2Bs	4Bs	N
15mBA2-16 (1miniB) X 15mBA2-16 (1miniB)	0	13	0	0	0	13
15mBA2-16 (1miniB) ♀ X 15P-9 (2Bs) ♂	3	7	0	4	0	14
15mBA2-16 (1miniB) ♂ X 15P-9 (2B) ♀ X 15mBA2-17 (1mB) ♂	0	4	1	1	0	6
15mBA2-16 (1miniB) X 15P-9 (2Bs) ♀	0	1	0	2	0	3
15mBA2-16 (1miniB) X 15mBA2-17 (1mB) ♂ X 15P-8 (3Bs) ♀	0	8	0	1	1	10
15mBA2-17 (1mB) X 15mBA2-17 (1mB)	0	9	0	0	0	9
15mBA2-17 (1mB) ♀ X 15P-9 (2Bs) ♂	0	1	0	5	0	6
15mBA2-17 (1mB) ♂ X 15P-9 (2Bs) ♀	0	5	0	7	0	12
15mBA2-17 (1mB) ♂ X 15P-9 (2Bs) ♀	0	2	0	1	0	3
15mBA2-5 (1mB) ♂ X 15mBC1-4 (2Bs) ♀	0	5	0	1	0	6
Total	3	55	1	22	1	82

TABLA 2. Cruzamientos realizados en el año 2016. Las plantas portadoras de minicromosoma B usadas en los cruzamientos fueron 3 en total y aparecen coloreadas en diferentes colores. La dotación cromosómica de cada planta se muestra entre paréntesis. El símbolo de masculino o femenino muestra el papel ejercido por la planta en el cruzamiento y a la derecha aparecen las dotaciones cromosómicas de los descendientes obtenidos de cada cruzamiento y el número de cada tipo.

Análisis estructural del minicromosoma B de centeno

Tal como se puede apreciar en la descendencia y en los cruzamientos realizados, el miniB se transmite en muy baja frecuencia. Por ello, se decidió continuar el estudio analizando su estructura, tanto en mitosis como en meiosis. El estudio comenzó en mitosis, y posteriormente, se empleó el estadio meiótico de paquitena, debido a que, en esta fase, los cromosomas se encuentran menos condensados que en metafase I y se puede apreciar mejor la estructura heterocromática del B. Los estudios tanto mitóticos como meióticos se llevaron a cabo en varias plantas tanto del año 2014 como del año 2015 portadoras de 1 miniB (2014-IsoC-13A-3, 2015mB-A2-13 y 2015mB-A2-16); la técnica utilizada ha sido FISH, usando como referencia las sondas *Bilby*, *ScCL11-1*, la secuencia telomérica *pAtT4* (secuencia telomérica de *Arabidopsis thaliana*) y ADN mitocondrial.

La **estructura mitótica** se estudió mediante FISH empleando *Bilby* y *ScCL11* en metafases obtenidas de la planta 2014-IsoC-13A-3 (portadora de 1 miniB). Se pudo observar que el miniB era de un tamaño mucho menor que un B de centeno normal, y que estaba compuesto mayoritariamente por secuencias centroméricas (*Bilby*) y pericentroméricas del B (*ScCL11*) (FIGURA 31). Con el fin de constatar los límites y la estructura de este cromosoma, se realizó una hibridación de *Bilby* junto con *pAtT4* en las plantas 2015mB-A2-13 y 2015mB-A2-16. Se observaron 4 señales de *pAtT4* adyacentes a las regiones centromérica y pericentroméricas, que correspondían con cada uno de los extremos de las dos cromátidas. Este hecho, permitió confirmar que el miniB es un cromosoma lineal y que sus brazos cromosómicos no se extienden más allá de las regiones pericentroméricas (FIGURA 32 A y B).

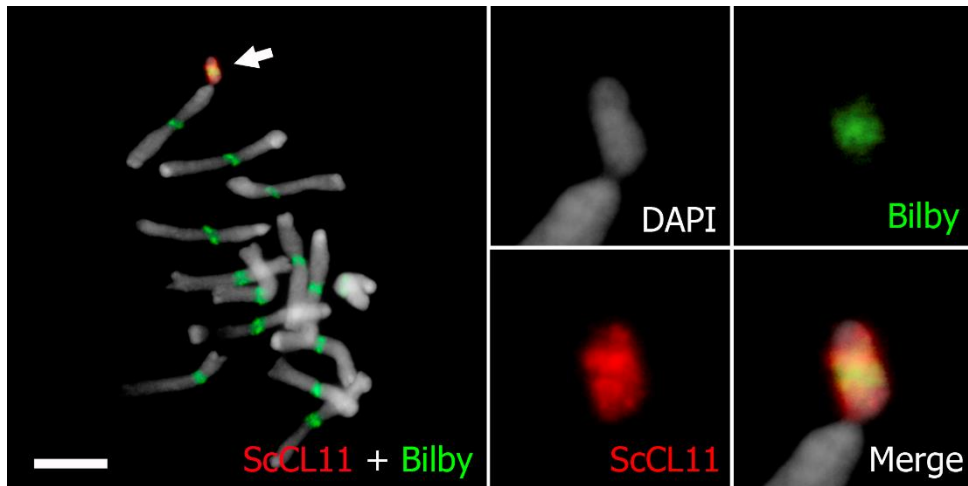


FIGURA 31. Metafase mitótica obtenida del meristemo apical radicular de la planta 2014-IsoC-13A-3, hibridada con *Bilby* y *ScCL11*. En las ampliaciones del miniB se puede apreciar que esta mayormente compuesto por secuencias centroméricas y pericentroméricas del B. La flecha indica la posición del miniB. Barra 10µm.

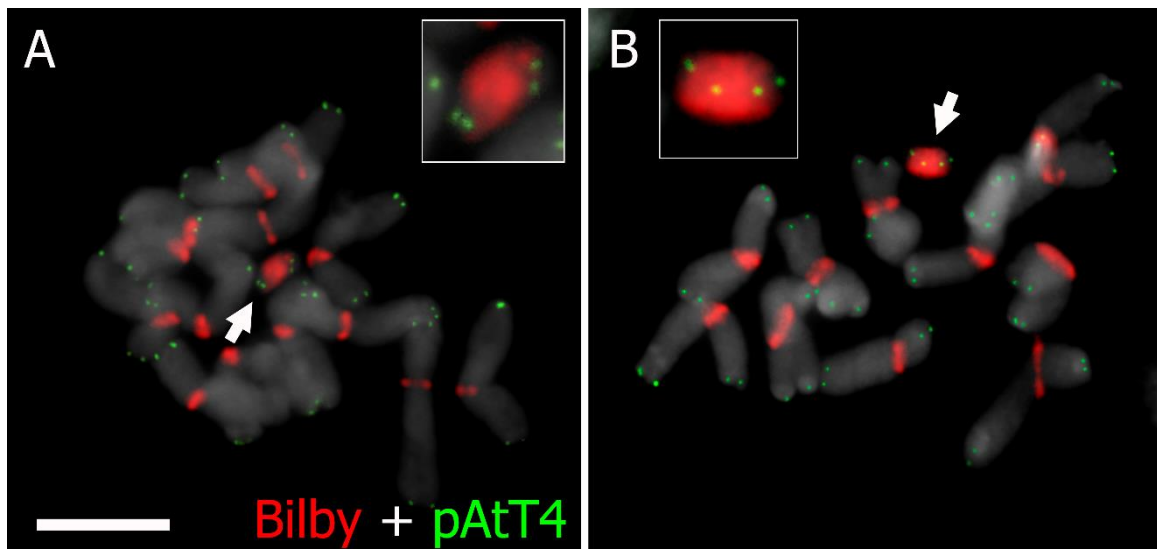


FIGURA 32. Metafases mitóticas de raíz de plantas de centeno portadoras de un miniB. **(A)** FISH de la planta 2015mB-A2-13 con las sondas *ScCL11* y *pAtT4*. **(B)** FISH de la planta 2015mB-A2-16 con las sondas *ScCL11* y *pAtT4*. En ambas imágenes se aprecia como el miniB está compuesto mayoritariamente por las regiones centromérica y pericentroméricas del B, puesto que las señales teloméricas se encuentran adyacentes a ellas. Las flechas indican la localización de miniB. Barra 10µm.

La **estructura meiótica** del miniB se estudió mediante FISH en el estadio de paquitena en la planta 2014-IsoC-13A-3. Para ello se utilizaron las secuencias *ScCL11* y ADN mitocondrial como sondas. Debido a que la sonda del ADN mitocondrial produce varias señales en la región pericentromérica del B, se pudo observar que la estructura del miniB no era simétrica, ya que *ScCL11* es la sonda más distal en uno de sus brazos mientras que en el otro la más distal es la sonda mitocondrial (FIGURA 33). Esta

información nos permite descartar que el miniB sea un isocromosoma para el brazo corto del B (Iso-BS), y confirmar que deriva de un Iso-BL, corroborando la información que se había obtenido de la genealogía. Si se tratara del brazo corto se apreciarían 3 señales del ADN mitocondrial, mientras que si se tratara del brazo largo únicamente se apreciaría una de mayor tamaño, como es el presente caso (FIGURA 34; FIGURA 29). Por tanto, el miniB debió surgir de un Iso-BL a partir de roturas asimétricas en ambos brazos, manteniendo únicamente las regiones pericentroméricas (FIGURA 34).

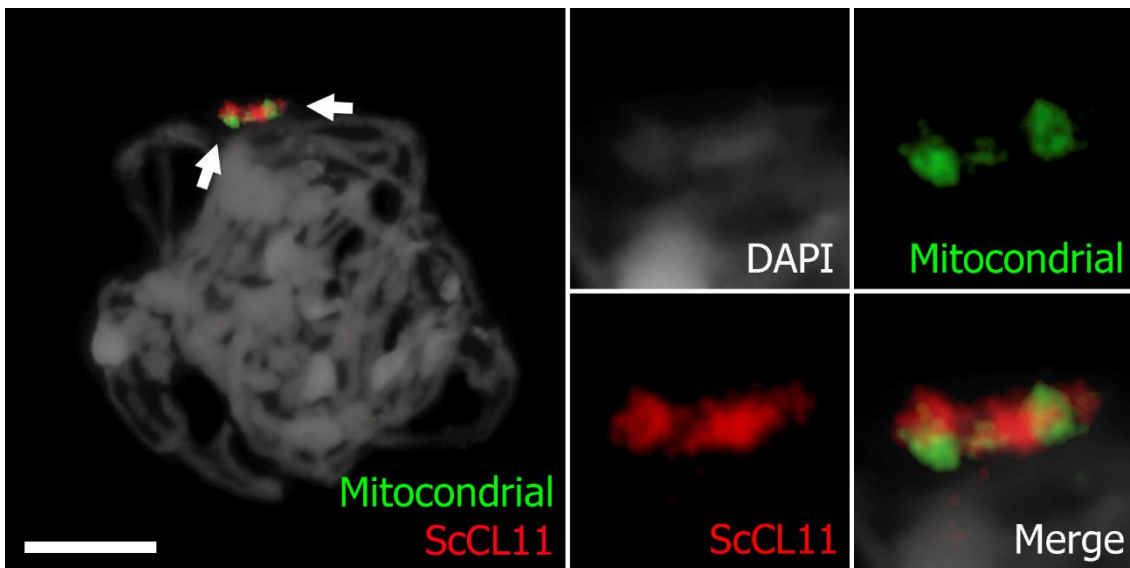


FIGURA 33. Meiocito de centeno en paquítina portador de un minicromosoma B, hibridado con la sonda pericentromérica *ScCL11* (en rojo) y con el ADN mitocondrial (en verde). Se observa como el miniB está compuesto por las regiones pericentroméricas del brazo largo y es asimétrico, teniendo en uno de sus extremos *ScCL11*, mientras que en el otro se encuentra el ADN mitocondrial. Las flechas indican los extremos distales del miniB. Barra 10 μ m.

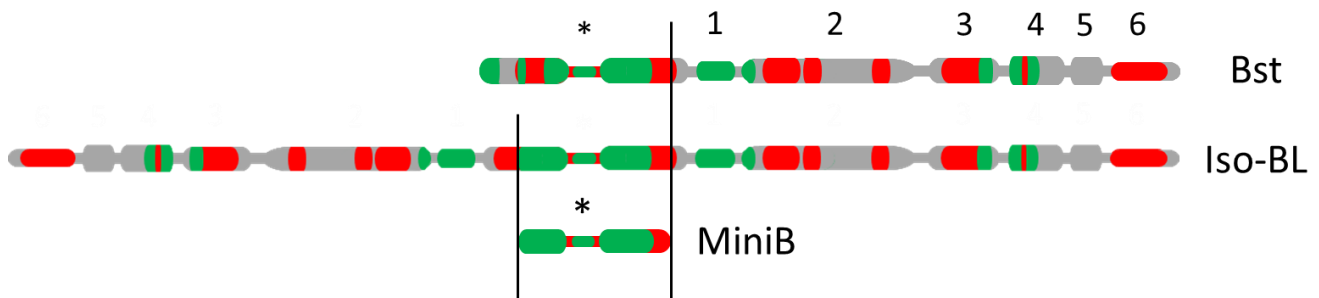


FIGURA 34. Esquemas de un cromosoma B estándar, un Iso-BL y un miniB. El color rojo representa las señales del *ScCL11*, el verde las del ADN mitocondrial y las líneas negras las zonas por las que tuvo que romperse el pericentrómero para que a partir de un Iso-BL se formara el miniB. Los bloques heterocromáticos están indicados y el centrómero está representado por un asterisco.

Análisis del comportamiento y segregación del minicromosoma B

Una vez conocida la estructura del miniB y su baja transmisión, se decidió analizar su comportamiento y su segregación tanto en mitosis como en meiosis. El estudio se llevó a cabo en la planta 2014-IsoC-13A-3, portadora de 1 miniB y descendiente de la planta original donde se observó el miniB por primera vez. El análisis en mitosis se realizó mediante FISH con las sondas *Bilby* y *ScCL11*, que son las que mejor permiten diferenciar el miniB de los As. Dicho análisis fue llevado a cabo tanto en células del meristemo apical radicular como en las mitosis que dan lugar a las células binucleadas del tapete en las anteras. En meiosis se realizó FISH con las sondas *ScCL11* y ADN mitocondrial, puesto que permiten una mejor diferenciación de los extremos del miniB cuando los cromosomas están menos condensados. Todas las células analizadas, tanto en mitosis como meiosis estaban lo suficientemente aisladas para no confundir la dotación de miniB de cada una.

El análisis **mitótico** llevado a cabo en las **raíces** permitió observar metafases con diferente dotación de miniBs. De un total de 32 células analizadas en metafase, se observaron 5 células (15,62%) que no tenían ningún miniB (FIGURA 35 A), 26 células (81,25%) que tenían 1 miniB (FIGURA 35 B) y 1 célula (3,13%) que tenía 2 miniBs (FIGURA 35 C) (TABLA 3). Estos datos sugieren inestabilidad mitótica del miniB. Para confirmar estos datos se realizó un estudio de los núcleos interfásicos. De un total de 159 núcleos interfásicos estudiados, 11 núcleos (6,92%) no poseían ningún miniB (FIGURA 35 D), 140 núcleos (88,05%) tenían un único miniB (FIGURA 35 E) y 8 núcleos (5,03%) eran portadores de 2 miniBs (FIGURA 35 F) (TABLA 3). Los resultados obtenidos tanto en metafases como en núcleos interfásicos, donde el 18,75% y 11,95% de las células respectivamente, tenían un número de miniBs diferente de uno, indican que el miniB sufre una inestabilidad mitótica en meristemo radicular.

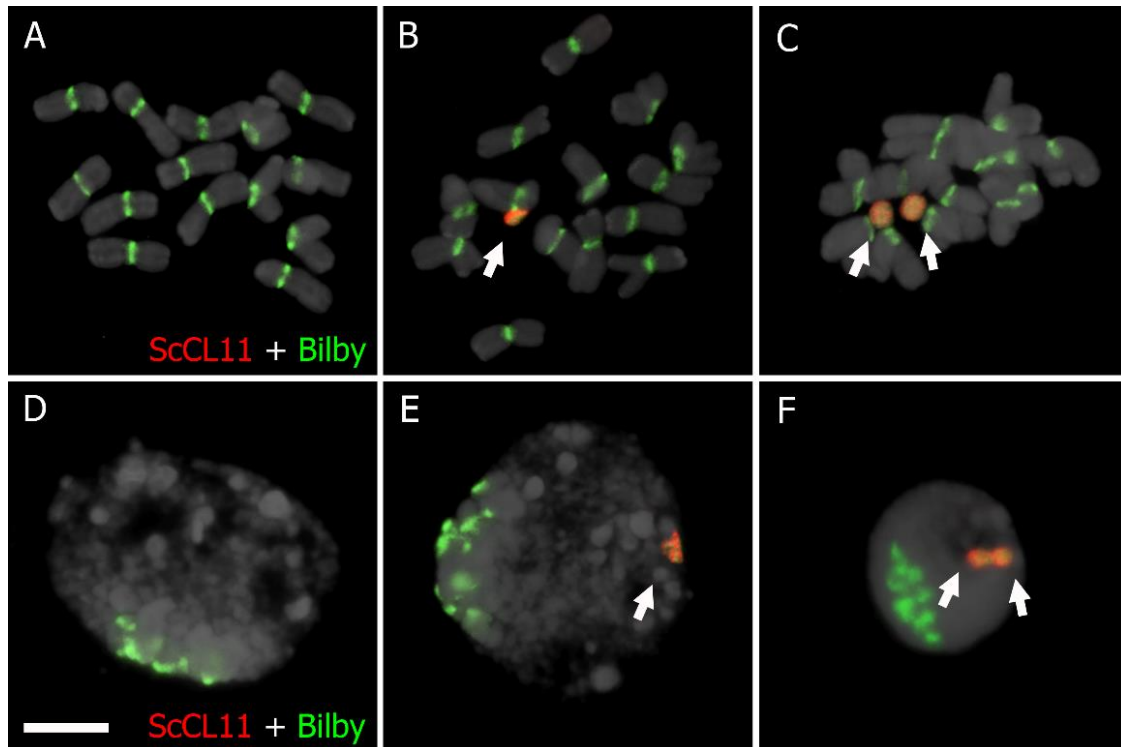


FIGURA 35. Células en metafase (A-C) e interfase (D-F) de meristemo apical radicular hibridadas mediante FISH con las sondas *ScCL11* y *Bilby*. (A) Metafase donde no se observa miniB. (B) Metafase donde se puede observar un miniB. (C) Metafase donde pueden apreciarse 2 miniBs. (D) Núcleo interfásico sin miniBs. (E) Núcleo interfásico con un miniB. (F) Núcleo interfásico con 2 miniBs. Las flechas indican la localización del miniB. Barra 10 μ m.

Número de miniBs en raíces (Mitosis)	0 miniBs	1 miniB	2 miniBs
Metafase	5	26	1
	32		
	15,62%	81,25%	3,13%
Interfase	11	140	8
	159		
	6,92%	88,05%	5,03%

TABLA 3. Número de miniBs observados en las células de las raíces de la planta 2014-IsoC-13A-3, tanto en metafase mitótica como en interfase. En cada apartado se puede observar el número de células con 0, 1 y 2 miniBs, el total y el porcentaje correspondiente a cada una de las categorías.

El análisis **mitótico** de las **células binucleadas** del tapete se llevó a cabo en las preparaciones de antera donde también se estudió la meiosis. De un total de 225 células binucleadas analizadas, solo en 117 de ellas (52%) el miniB había segregado correctamente, de manera que cada una de las cromátidas había migrado a núcleos opuestos (FIGURA 36 A) (TABLA 4). Por el contrario, en las 108 células restantes (48%)

se pudieron observar diversos tipos de segregaciones anómalas, tales como micronúcleos o diferente número de miniBs en un mismo núcleo (FIGURA 36 B-H) (TABLA 4).

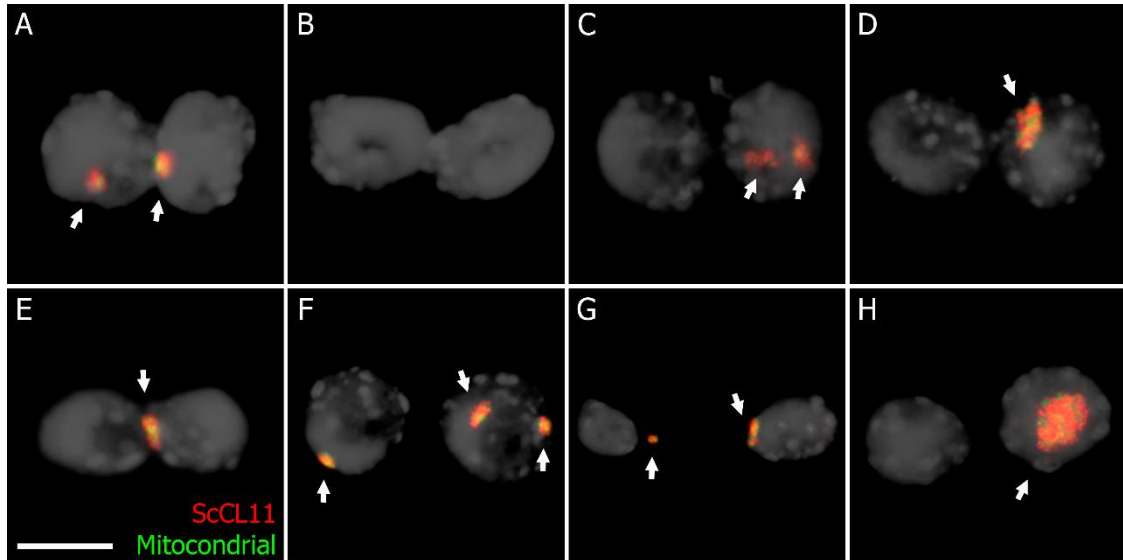


FIGURA 36. Células binucleadas del tapete hibridadas mediante FISH con *ScCL11* y ADN mitocondrial. **(A)** Célula binucleada donde el miniB ha segregado correctamente, migrando cromátidas a polos opuestos y quedando un miniB en cada núcleo. **(B-H)** Células binucleadas con diferentes segregaciones anómalas, donde la dotación de miniBs es diferente de uno. Barra 10µm.

Comportamiento MiniB	Segregación correcta	Segregación incorrecta
Células binucleadas del tapete	117	108
	225	
	52%	48%

TABLA M4. Segregación del minicromosoma B en las células binucleadas del tapete. En cada apartado se muestra el número y porcentaje de células binucleadas donde el miniB había segregado de manera correcta o incorrecta.

El análisis **meiótico** llevado a cabo en anteras permitió comprobar que, en algunas ocasiones, la segregación de este minicromosoma era la esperada, igual a la de un cromosoma B cuando se encuentra como univalente (FIGURA 37 A-F); es decir, en la primera división meiótica el cromosoma migraría con sus dos cromátidas a uno de los polos celulares, mientras que en la segunda división separaría cromátidas y migrarían cada una de ellas a polos opuestos. Sin embargo, en muchas otras ocasiones no se producía la segregación esperada. Por esta razón, se ha realizado un estudio en las fases

de la meiosis donde puede valorarse mejor los resultados de la segregación cromosómica: metafase I, anafase I, diadas y tétradas.

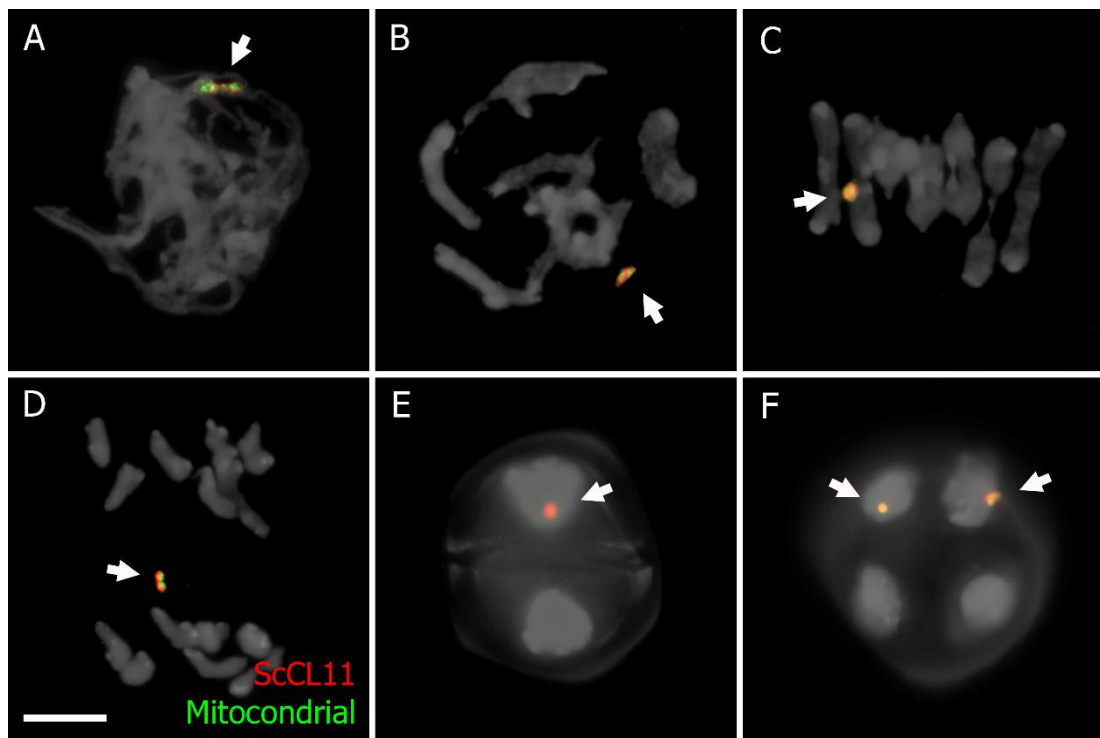


FIGURA 37. FISH con *ScCL11* y ADN mitocondrial en meiocitos de centeno portadores de un miniB, que se comporta de la manera esperada para un univalente. **(A)** Paquitena. **(B)** Diplotena. **(C)** Metafase I. **(D)** Anafase I. **(E)** Diada. **(F)** Tétrada. Las flechas indican la localización del miniB. Barra 10 μ m.

En **metafase I**, se observó que no todas las células tenían la misma dotación cromosómica de miniBs. De un total de 32 células contadas se observó que 4 células (12,50%) no tenían miniB (FIGURA 38 A), 23 células (71,87%) tenían 1 miniB (FIGURA 38 B), 4 células (12,50%) poseían 2 miniBs, los cuales se mantenían juntos formando una configuración similar a un bivalente (FIGURA 38 C) y 1 célula (3,13%) portaba 3 miniBs donde, de nuevo, dos de ellos se mantenían juntos en una configuración similar a un bivalente (FIGURA 38 D) (TABLA 5). Estos resultados apoyan los datos obtenidos en mitosis, confirmando que existe una inestabilidad mitótica también en la línea germinal, ya que esta variación en la dotación cromosómica procede de las divisiones mitóticas previas a la meiosis.

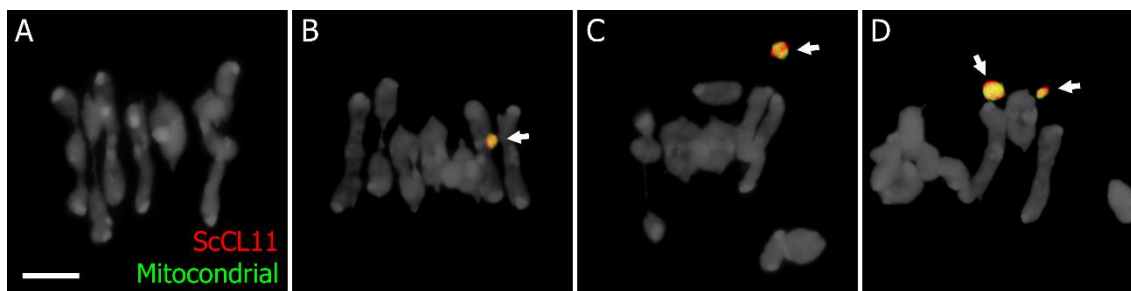


FIGURA 38. FISH de *ScCL11* y ADN mitocondrial de meiocitos en metafase I de la planta 2014-IsoC-13A-3. **(A)** Metafase I sin miniB. **(B)** Metafase I con 1 miniB. **(C)** Metafase I con 2 miniBs formando un bivalente. **(D)** Metafase I con 3 miniBs, estando 2 de ellos formando un bivalente. Las flechas indican la localización del miniB. Barra 10 μ m.

Número de miniBs	0 miniBs	1 miniBs	2 miniBs	3 miniBs
	4	23	4	1
Metafase I	32			
	12,50%	71,87%	12,50%	3,13%

TABLA 5. Número de miniBs observados en meiocitos en metafase I en las anteras de la planta 2014-IsoC-13A-3. En cada apartado se puede observar el número de células con 0, 1, 2 y 3 miniBs, el total y el porcentaje correspondiente a cada una de las categorías.

En **anafase I**, el miniB aparece frecuentemente como univalente retrasado respecto de los cromosomas A (FIGURA 39 A), además en algunas ocasiones divide ecuacionalmente separando sus cromátidas antes de lo esperado (FIGURA 39 B). En esta fase no se han realizado conteos puesto que, en muchas ocasiones los cromosomas que quedan retrasados acaban incorporándose correctamente a uno de los polos celulares y, en algunos casos, según lo avanzada que se encuentre la migración de los cromosomas, podría interpretarse erróneamente el número y tipo de segregación del MiniB.

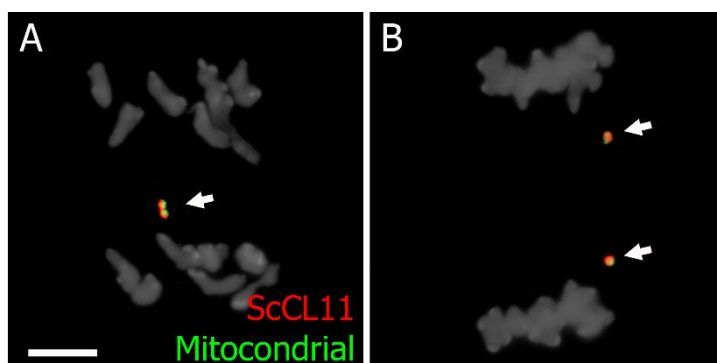


FIGURA 39. FISH con *ScCL11* y ADN mitocondrial en meiocitos en anafase I de la planta 2014-IsoC-13A-3 portadora de un miniB. **(A)** MiniB que no separa cromátidas y queda rezagado con respecto a los As. **(B)** MiniB que separa cromátidas y ambas quedan rezagadas con respecto a los As. Las flechas indican la localización del miniB o sus cromátidas. Barra 10 μ m.

En **diadas**, se puede observar el resultado de la segregación cromosómica de anafase I, por ese motivo se realizó un conteo del número de miniBs y su comportamiento. Se encontraron células con diferente dotación cromosómica de miniBs, por ese motivo las diadas han sido clasificadas según el número de miniBs que portaban. De un total de 81 diadas contadas, 14 no poseían ningún miniB (17,28%), 50 tenían 1 miniB, que sería lo esperado para esta planta (61,73%), y las 17 diadas restantes poseían 2 miniBs (20,99%) (TABLA 6). Entre las diadas que portaban 1 o 2 miniBs se han observado diferentes tipos de comportamiento, y se han clasificado según si el miniB separa cromátidas o cromosomas homólogos respectivamente.

Dentro de las 50 diadas que portan 1 miniB, se contabilizaron únicamente 4 (8%) en las que el miniB tenía el comportamiento esperado para un univalente, es decir, migrando sin separar cromátidas a uno de los polos celulares (FIGURA 40 A). En 34 diadas (68%) el miniB había separado cromátidas (FIGURA 40 B). En 2 diadas (4%) se observó que el miniB no había separado cromátidas, pero tampoco se había integrado en el núcleo, quedando como micronúcleo (FIGURA 40 C). Por último, en 10 diadas (20%) el miniB había separado cromátidas, pero al menos una de ellas había quedado retrasada formando un micronúcleo (FIGURA 40 D) (TABLA 6).

Con respecto a las células que portan 2 miniBs, se han contado 17 diadas, de las cuales solo en 1 diada (5,88%) tenían el comportamiento esperado para un bivalente, separando cromosomas homólogos a polos opuestos (FIGURA 40 E), en 3 diadas (17,65%) los miniBs homólogos no se habían separado, migrando juntos a un polo celular (FIGURA 40 F). Por otra parte, en 3 diadas (17,65%) se habían separado los miniBs homólogos, pero al menos uno de ellos quedo retrasado formando un micronúcleo (FIGURA 40 G). Por último, en 10 diadas (58,82%) los miniBs homólogos no se habían separado, y habían quedado rezagados formando un micronúcleo (FIGURA 40 H) (TABLA 6).

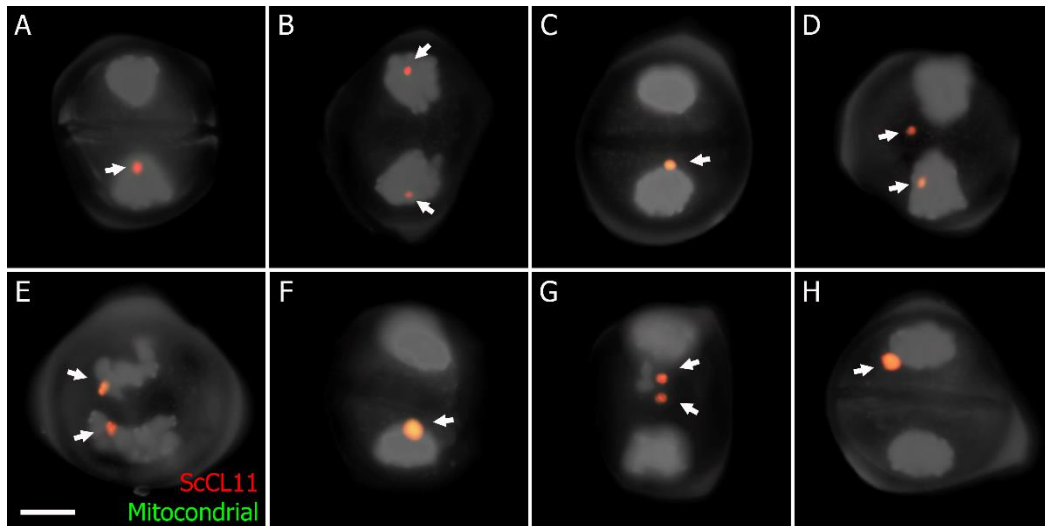


FIGURA 40. Comportamiento del miniB en diadas hibridadas mediante FISH con *ScCL11* y ADN mitocondrial. **(A)** Segregación esperada de 1 miniB, migrando con sus dos cromátidas a uno de los núcleos de la diada. **(B)** 1 miniB separando cromátidas. **(C)** 1 miniB que no separa cromátidas y queda como micronúcleo. **(D)** 1 miniB que separa cromátidas y al menos una queda como micronúcleo. **(E)** 2 miniBs homólogos que migran con sus dos cromátidas a polos celulares opuestos. **(F)** 2 miniBs unidos que migran juntos a un mismo núcleo de la diada. **(G)** 2 miniBs homólogos separados que quedan como micronúcleos. **(H)** 2 miniBs unidos que migran juntos y quedan como un micronúcleo. Las flechas indican la localización del miniB. Barra 10 μ m.

Diadas MiniB				
0 miniBs (17,28%)	14			
Comportamiento	No separa cromátidas	Separa cromátidas	No separa cromátidas y forma micronúcleos	Separa cromátidas Y forma micronúcleos
1 miniB (61,73%)	4	34	2	10
	50			
	8%	68%	4%	20%
Comportamiento	Se separan homólogos	No se separan homólogos	Se separan homólogos y se forman micronúcleos	No se separan homólogos y se forman micronúcleos
2 miniBs (20,99%)	1	3	3	10
	17			
	5,88%	17,65%	17,65%	58,82%

TABLA 6. Comportamiento del miniB observado en las diadas de la planta 2014-IsoC-13A-3. En cada apartado se muestra el número de células con 0, 1 y 2 miniBs, el comportamiento del miniB, el total y el porcentaje de miniBs correspondiente a cada una de las categorías.

En **tétradas**, podemos apreciar los resultados de la segregación cromosómica producida en anafase I y II, y al igual que ocurre en diadas, encontramos células con una dotación cromosómica de miniBs diferente. Esto es debido a la inestabilidad mitótica previa a la meiosis, y a la inestabilidad que el minicromosoma muestra a lo largo de todo el proceso. Las tétradas se clasificaron según el número de miniBs. De un total de 43

tétradas analizadas, 12 no poseían ningún miniB (27,91%), 23 poseían 1 miniB (53,49%) (FIGURA 41 A y B) y 8 poseían 2 miniBs (18,60%) (FIGURA 41 C, D, E y F). Dentro de las células que portaban 1 ó 2 miniBs se han observado diferentes tipos de comportamiento, clasificándose según si el miniB separa cromátidas o cromosomas homólogos respectivamente.

En las tétradas que portan 1 miniB, se contaron un total de 23 tétradas, de las cuales 12 (52,17%) tenían el comportamiento esperado, habiendo migrado cada una de las cromátidas del miniB a polos opuestos (FIGURA 41 A). Sin embargo, en las 11 tétradas restantes (47,83%) los miniBs también habían separado cromátidas, pero al menos una de ellas había quedado rezagada formándose un micronúcleo (FIGURA 41 B) (TABLA 7). Por otra parte, se han contado un total de 8 tétradas portadoras de 2 miniBs. En ninguna de ellas se observó el comportamiento esperado (separación de cromátidas); sin embargo, se observaron 2 tétradas (25%) en las que los cromosomas homólogos se habían separado integrándose en uno o dos núcleos (FIGURA 41 C). En 2 tétradas (25%) los miniBs homólogos no se habían separado y habían migrando juntos a un polo celular (FIGURA 41 D). En 1 tétrada (12,50%) se habían separado los homólogos, pero habían quedado como micronúcleos (FIGURA 41 E) y en 3 tétradas (37,50%) los cromosomas homólogos no se habían separado, quedando rezagados como micronúcleos (FIGURA 41 F) (TABLA 7).

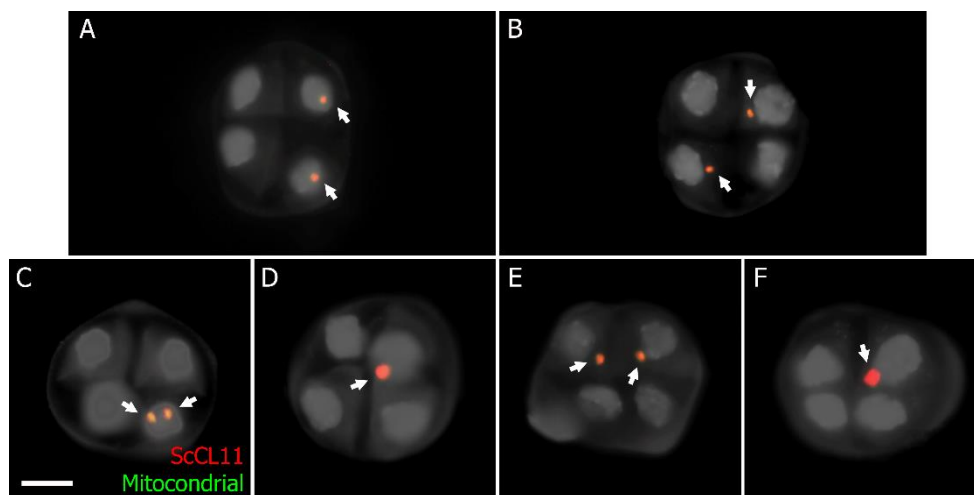


FIGURA 41. Comportamiento de 1 miniB (**A y B**) y 2 miniBs (**C-F**) en tétradas hibridadas mediante FISH con las sondas *ScCL11* y ADN mitocondrial. (**A**) Segregación esperada de 1 miniB en tétradas, separando cromátidas. (**B**) 1 miniB separando cromátidas quedando estas como micronúcleos. (**C**) 2 miniBs homólogos que se separan, quedando en el mismo núcleo. (**D**) 2 miniBs homólogos que no se separan. (**E**) 2 miniBs homólogos que se separan y quedan como micronúcleos. (**F**) 2 miniBs homólogos que no se separan y quedan como un micronúcleo. Las flechas indican la localización de los miniBs. Barra 10µm.

Tétradas MiniB				
0 miniBs (27,91%)	12			
Comportamiento	No separa cromátidas	Separa cromátidas	No separa cromátidas y forma micronúcleos	Separa cromátidas Y forma micronúcleos
1 miniB (53,49%)	0	12	0	11
	23			
	0%	52,17%	0%	47,83%
Comportamiento	Se separan homólogos	No se separan homólogos	Se separan homólogos y se forman micronúcleos	No se separan homólogos y se forman micronúcleos
2 miniBs (18,60%)	2	2	1	3
	8			
	25%	25%	12,50%	37,50%

TABLA 7. Comportamiento del miniB observado en las tétradas de la planta 2014-IsoC-13A-3. En cada apartado se muestra el número de células con 0, 1 y 2 miniBs, el comportamiento del miniB, el total y el porcentaje de miniBs correspondiente a cada una de las categorías.

Haciendo un recuento de la presencia o ausencia del miniB en diadas y tétradas, se pudo observar que, de un total de 162 núcleos de diada, 88 (54,32%) poseen al menos un miniB, mientras que los 74 núcleos restantes no poseen ningún miniB (45,68%) (FIGURA 42) (TABLA 8). A su vez, de un total de 172 núcleos de tétrada contados, 31 (18,02%) poseen al menos un miniB, mientras que los 141 núcleos restantes no poseen ningún miniB (81,98%) (FIGURA 42) (TABLA 8). Estos resultados permiten apreciar que a medida que avanza la meiosis el número de núcleos con miniB se reduce, y al final de la misma la mayoría de productos meióticos carecen del minicromosoma. Por tanto, además de la inestabilidad mitótica previa a la meiosis, también puede apreciarse una inestabilidad meiótica, lo cual podría ser el principal motivo para su baja transmisión.

Estadio	Núcleos que contienen al menos un miniB	Núcleos sin miniB
Diadas	88	74
	162	
	54,63%	45,68%
Tétradas	31	141
	172	
	18,01%	81,99%

TABLA 8. Comparación entre el número de núcleos de diada y tétrada que contienen al menos un miniB con respecto a los que no contienen miniB.

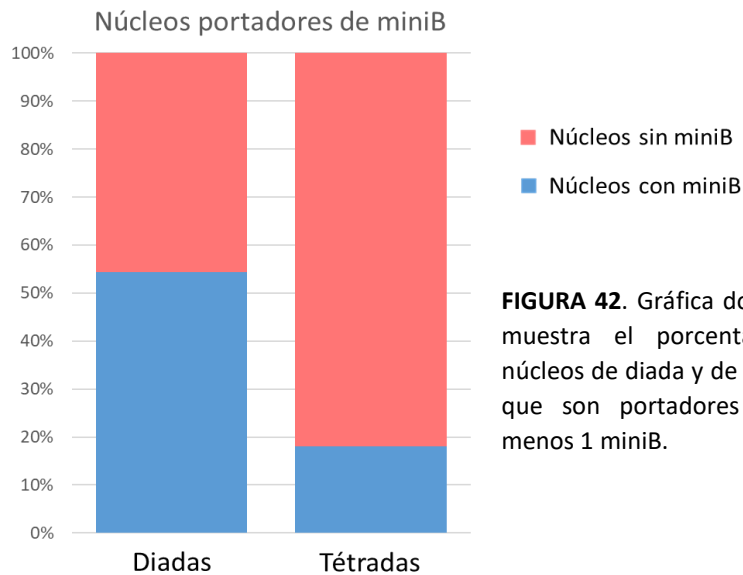


FIGURA 42. Gráfica donde se muestra el porcentaje de núcleos de diada y de tétrada que son portadores de al menos 1 miniB.

Inmulocalización de CENH3 en el minicromosoma B

A continuación, vista la baja tasa de transmisión y la inestabilidad tanto mitótica como meiótica del miniB, se decidió hacer un estudio de la funcionalidad del centrómero del miniB, tanto en mitosis como en meiosis, por medio de una inmulocalización de la histona CENH3, que es la marca epigenética del centrómero activo.

El estudio **mitótico** se llevó a cabo en las plantas portadoras de un miniB de la descendencia de la planta 2015mB-A2-16. Este análisis se realizó en células somáticas en interfase (FIGURA 43 A), metafase (FIGURA 43 B) y anafase (FIGURA 43 C) del meristemo apical radicular. Las mediciones de las áreas de las señales producidas por los anticuerpos en los centrómeros en las células interfase, permitieron confirmar que las señales de CENH3 del miniB son significativamente más pequeñas que las de los cromosomas A, y por tanto que la del B estándar ($t = -10,863$, P valor = 0,000036; $n = 7$ miniBs y 86 As). Por otra parte, en metafase y anafase se pudieron apreciar dos señales de CENH3 en el miniB, una por cada cromátida y como estas coorientaban a polos opuestos en anafase (FIGURA 43 B y C).

En el estudio **meiótico** se analizó la planta 2014-IsoC-13A-3, portadora de 1 miniB y utilizada para los análisis de FISH previos. En metafase I (FIGURA 44 A), también se pudieron apreciar 2 señales de CENH3 en el miniB, ambas de menor intensidad que las señales observadas en los cromosomas A. En anafase I (FIGURA 44 B), se pudo observar como el mini B separaba cromátidas y estas se orientaban hacia polos opuestos,

pudiéndose apreciar como las señales de CENH3 son de nuevo más pequeñas que las de los cromosomas A. Las mediciones de los centrómeros se realizaron en mitosis y no en meiosis debido al bajo número de células obtenidas en meiosis. Aún así, las fotografías en meiosis dejan patente que el miniB tiene menor cantidad de CENH3 en su región centromérica que los cromosomas A, y por tanto que el cromosoma B estándar.

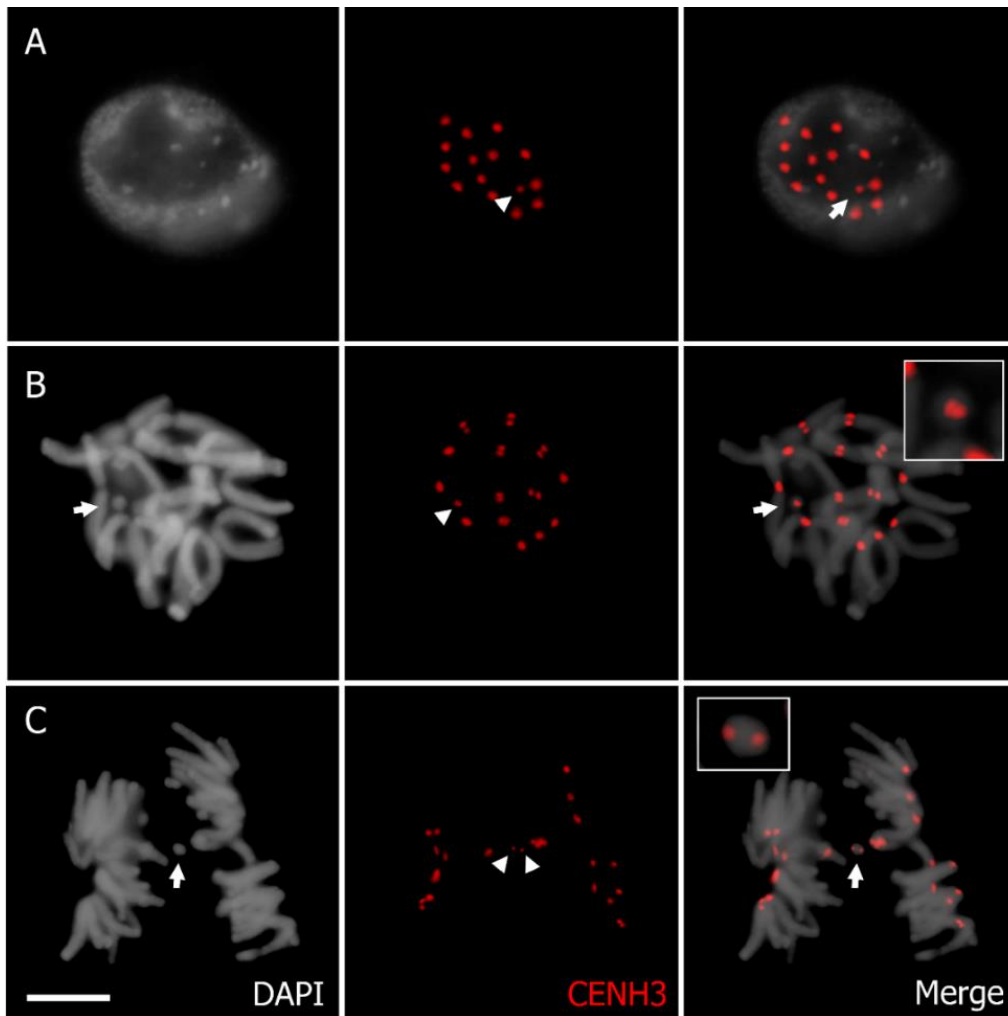


FIGURA 43. Inmunolocalización de CENH3 en células en mitosis del meristemo apical radicular de la planta 2015mB-A2-16 portadora de 1 miniB. **(A)** Núcleo interfásico, **(B)** Metafase y **(C)** Anafase, en las cuales se puede apreciar como la señal de CENH3 del miniB es de menor tamaño que la señal de los As. Las cabezas de flecha indican las señales de CENH3 del miniB. Las flechas indican la localización del miniB. Barra 10 μ m.

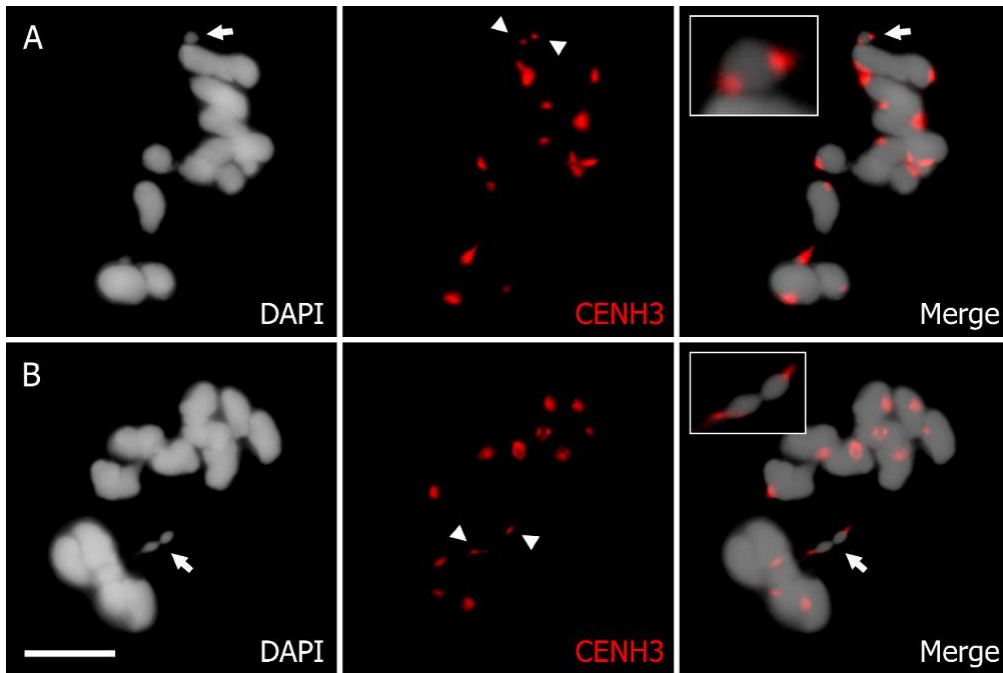


FIGURA 44. Inmunolocalización de CENH3 en meiocitos de la planta 2014-IsoC-13A-3, portadora de 1 miniB. **(A)** Metafase I y **(B)** Anafase I, donde se puede apreciar el menor tamaño de la señal de CENH3 del miniB comparado con la de los A. Las cabezas de flecha indican las señales de CENH3 del miniB. Las flechas indican la localización de miniB. Barra 10 μ m.

ISO-BL ASIMÉTRICO DE DELECCIÓN

Analizando la descendencia de plantas de centeno pertenecientes al cultivar Paldang portadoras de cromosomas B e Iso-BL, se observó un segundo nuevo derivado del cromosoma B. En este apartado se ha realizado un estudio de su origen por medio de su genealogía, y un análisis estructural por medio de FISH con sondas presentes en el cromosoma B de centeno y se ha comparado su morfología con la del B estándar y el Iso-BL.

Origen del Iso-BL asimétrico de delección

En el año 2015, analizando la dotación cromosómica de diversas plantas, se observó que la planta 2015-IJ1-9 portaba dos copias de un nuevo derivado del cromosoma B. Esta planta descendía, por autofecundación de la planta 2013-IsoC-10, que era portadora de 2Iso-BL. Esta, a su vez, descendía por polinización abierta de la planta 2012-IJ1-3-1, portadora de 2Iso-BL y que también dio lugar a la planta portadora del miniB. Por lo cual, tanto el miniB como el nuevo derivado, tienen un origen común.

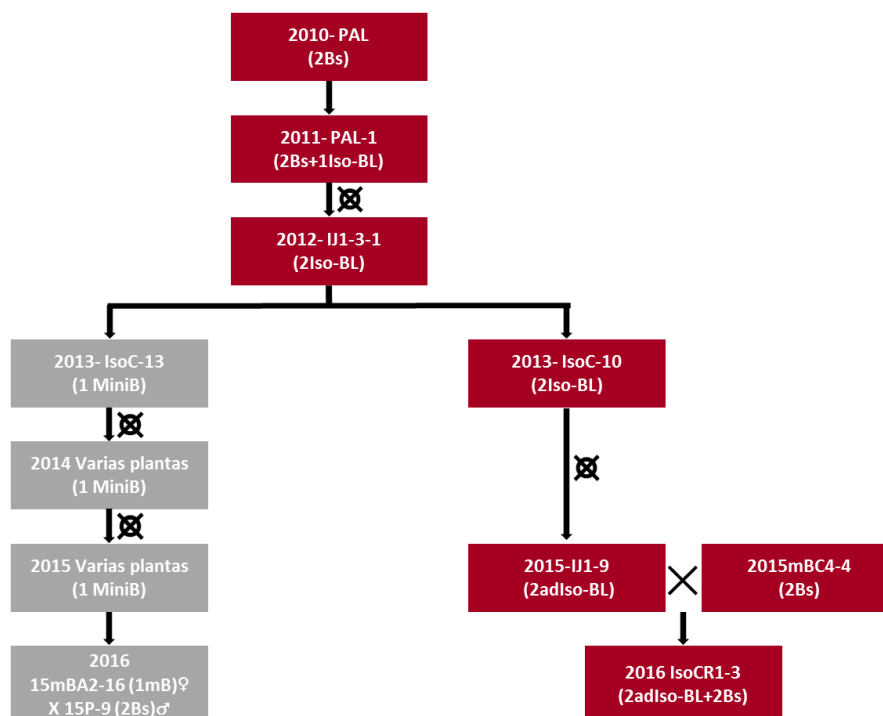


FIGURA 45. Genealogía del adIso-BL (rojo), adyacente a ella se muestra la genealogía del mini B (gris), ambas con un origen común. Se muestra el nombre de cada planta, su dotación cromosómica y el tipo de cruzamiento realizado para su obtención.

Para comprobar si el evento era único, se analizaron las cinco plantas hermanas de 2015-IJ1-9 y todas ellas era portadoras de 2Iso-BL. Posteriormente, la planta 2015-IJ1-9 (que portaba los nuevos derivados) se cruzó con otra portadora de 2 cromosomas B (15mBC4-4), dando lugar a la planta 2016-IsoCR1-3, portadora de 2Bs y dos nuevos derivados. El objetivo de este cruzamiento fue juntar en la misma planta tanto los cromosomas B como los nuevos derivados para comparar su estructura dentro de una misma célula (FIGURA 45).

Análisis estructural en mitosis y formación del Iso-BL asimétrico de delección

La caracterización del nuevo derivado se llevó a cabo mediante FISH con las sondas *D1100* y *ScCL11* en metafase mitótica en la planta 2016-IsoCR1-3, portadora de 2 nuevos derivados y 2 cromosomas B (FIGURA 46 A). También se realizó FISH con las mismas sondas en metafases mitóticas de la planta 2013-IsoC-10, portadora de 2 Iso-BL, de la que surgió el nuevo derivado, y se compararon los resultados (FIGURA 46 B).

En estas células se pudo observar que el cromosoma B posee señal de *D1100* únicamente en la región subtelomérica del brazo largo (FIGURA 46 C) y el Iso-BL posee señales de *D1100* en las regiones subteloméricas de ambos brazos (FIGURA 46 D). Sin embargo, el nuevo derivado tiene la morfología de un Iso-BL, ya que sus dos brazos son aparentemente largos, pero únicamente muestra señal de *D1100* en la región subtelomérica de uno de ellos (FIGURA 46 E), por lo que el otro brazo ha tenido que sufrir una delección distal o deficiencia. Por ese motivo, a este nuevo derivado se le denominó Iso-BL asimétrico de delección o deficiencia (asymmetric deficient Iso-BL) o adIso-BL.

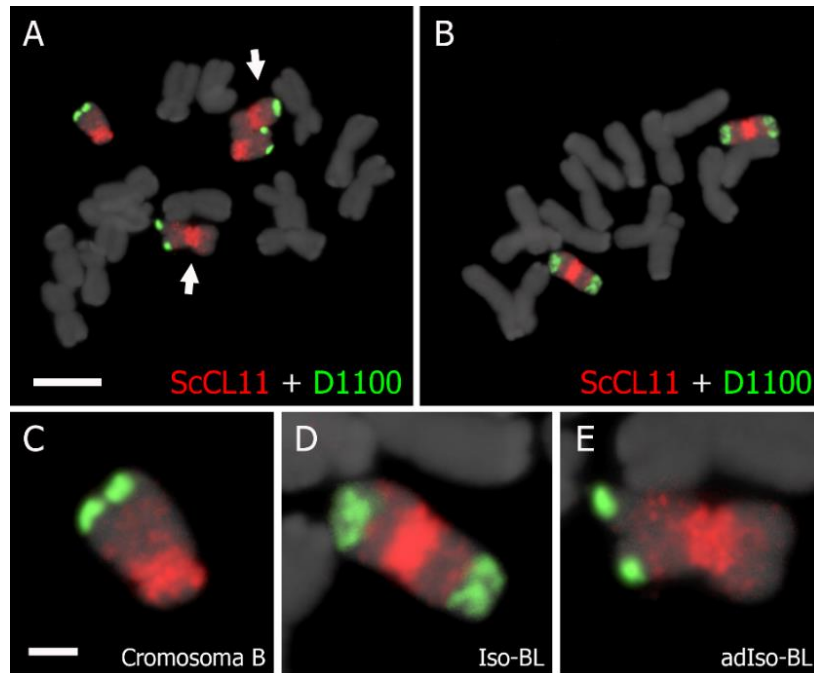


FIGURA 46. FISH en preparaciones de raíz con las sondas *ScCL11* y *D1100*. **(A)** Metafase mitótica de la planta 2016-IsoCR1-3, portadora de 2Bs y 2adIso-BL. **(B)** Metafase mitótica de la planta 2013-IsoC-10, portadora de 2Iso-BL. **(C)** Ampliación del cromosoma B estándar donde se puede apreciar que *D1100* está presente en la región subtelomérica del brazo largo. **(D)** Ampliación de un Iso-BL, con ambos brazos iguales y con *D1100* presente en la región subtelomérica de ambos. **(E)** Ampliación del adIso-BL, pudiéndose observar cómo ha sufrido una delección en uno de sus brazos que no muestra señal de *D1100*, conservando el otro brazo intacto con *D1100* en su región distal. Las flechas indican la localización de los adIso-BL. Barra 10μm en A y B y 2,5μm en C, D y E.

Para completar el estudio del origen del adIso-BL, se decidió realizar un análisis exhaustivo de la planta en la que se observó por primera vez este cromosoma: la planta 2015-IJ-1-9, portadora de 2 adIso-BL. El estudio se realizó en metafases mitóticas de raíces mediante FISH con las sondas *D1100* y *ScCL11*. Sorprendentemente, al utilizar esta combinación de sondas se identificaron en estas células gran número de nuevos derivados del cromosoma B de centeno, siendo todos ellos variaciones estructurales del mismo. Entre estos derivados cabe destacar:

- Iso-BL monocéntricos, cuyos brazos cromosómicos parecen de menor tamaño que un Iso-BL normal. Ambas regiones subteloméricas están marcadas por *D1100* y las regiones centromérica y pericentroméricas están marcadas por *ScCL11*, cuya señal parece de un tamaño mayor a la de un Iso-BL normal (FIGURA 47 A).

- Iso-BL dicéntricos, de mayor tamaño y longitud que un Iso-BL normal, poseen dos señales de *D1100*, una en la región subteloamérica de cada uno de los brazos. Además, presentan dos regiones centroméricas y pericentroméricas marcadas por la sonda *ScCL11* (FIGURA 47 B).
- Iso-BL tricéntricos, de mayor tamaño que un Iso-BL dicéntrico; con dos señales de *D1100*, cada una de ellas marcando la región subteloamérica de cada brazo. Además, presentan tres regiones centroméricas y pericentroméricas marcadas por la sonda *ScCL11* (FIGURAS 47 C y 47 G).
- Iso-BL asimétricos de delección de diversos tamaños, entre los cuales podemos encontrar nuestro objeto de estudio (adIso-BL) y otros muy similares. Observándose únicamente una señal de *D1100* en uno de sus brazos, pero con aparentemente diferentes puntos de rotura que se distinguen gracias a los diferentes patrones de *ScCL11* en sus brazos (FIGURA 47 D).

Con el fin de conocer más acerca de la estructura de todos estos derivados, las posibles reorganizaciones que ha podido sufrir y su estabilidad, se realizó una rehibridación de estas preparaciones de raíz con la sonda telomérica *pAtT4* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. Esta hibridación permitió demostrar que casi todos los derivados cromosómicos descritos presentaban secuencias teloméricas en sus extremos y no presentaban secuencias teloméricas intersticiales (FIGURA 47 E, F y G). Sin embargo, en los adIso-BL las señales teloméricas del brazo deleciónado son muy pequeñas, puesto que sólo se aprecian aumentando mucho el tiempo de exposición de la cámara en el microscopio (FIGURA 47 H). Esto puede ser debido a su reciente formación, puesto que el número de repeticiones teloméricas puede ser menor en número al de los telómeros normales, y es más difícil poder detectarlos por medio de la técnica de FISH.

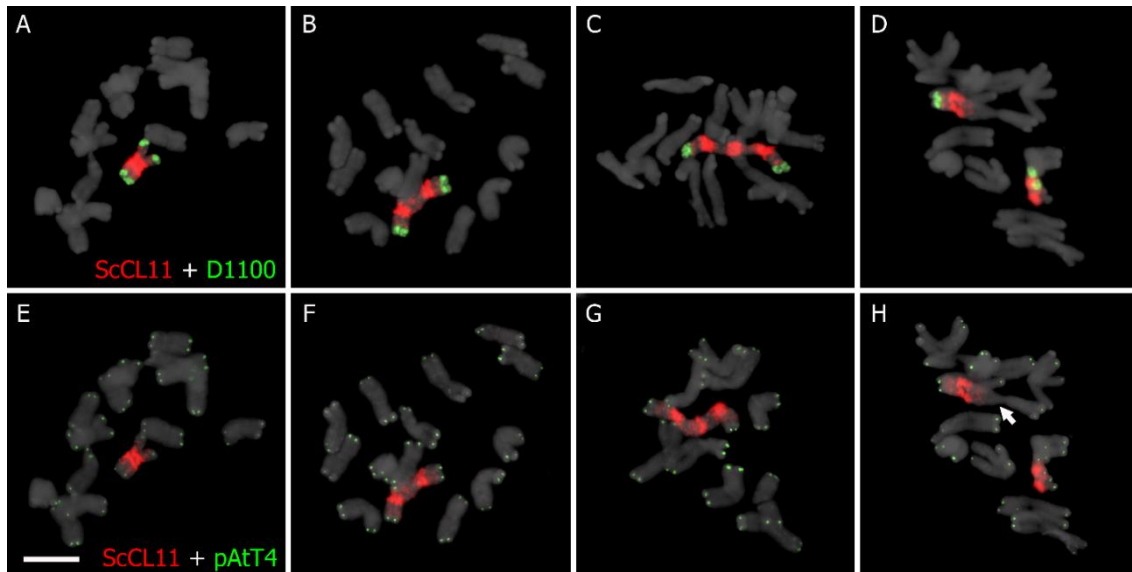


FIGURA 47. (A-D) FISH de raíz de la planta 2015-IJ-1-9 con las sondas *ScCL11* y *D1100*. (E-H) Rehibridación con las sondas *ScCL11* y *pAtT4*. (A y E) Metafase mitótica portadora de un Iso-BL monocéntrico más pequeño de lo habitual. (B y F) Metafase mitótica portadora de un Iso-BL dicéntrico. (C y G) Metafase mitótica portadora de un Iso-BL tricéntrico. (D-H) Metafase mitótica portadora de 2 adIso-BL. La flecha indica la ausencia de señales teloméricas al final del brazo deleciónado del adIso-BL. Barra 10 μ m.

En estas preparaciones no solo se observaron estos derivados cromosómicos en metafase mitótica, sino que también se pudieron observar anafases donde se apreciaba como estos nuevos derivados separaban cromátidas. El caso de mayor interés es el del Iso-BL dicéntrico, ya que se pudo observar que además de separar cromátidas hermanas, en algunas de ellas, cada uno de los centrómeros estaba tirando hacia polos opuestos produciéndose puentes (FIGURA 48 A). Al igual que en las metafases mitóticas también se realizó una rehibridación con secuencias teloméricas para conocer cuáles eran los extremos cromosómicos y no caer en errores de interpretación (FIGURA 48 B). De esta manera, se pudo confirmar que ambas regiones centroméricas del Iso-BL dicéntrico son funcionales. No pudo confirmarse por inmunodetección con CENH3 debido que el material era escaso y la formación de estos derivados fue un evento único, que no se volvió a observar. Estos datos permiten sugerir que este cromosoma dicéntrico podría romperse debido al estiramiento de cada uno de los centrómeros hacia polos opuestos. Esta rotura, seguida de una adición de secuencias teloméricas, podría dar lugar a diferentes derivados, entre los cuales se encontraría el adIso-BL.

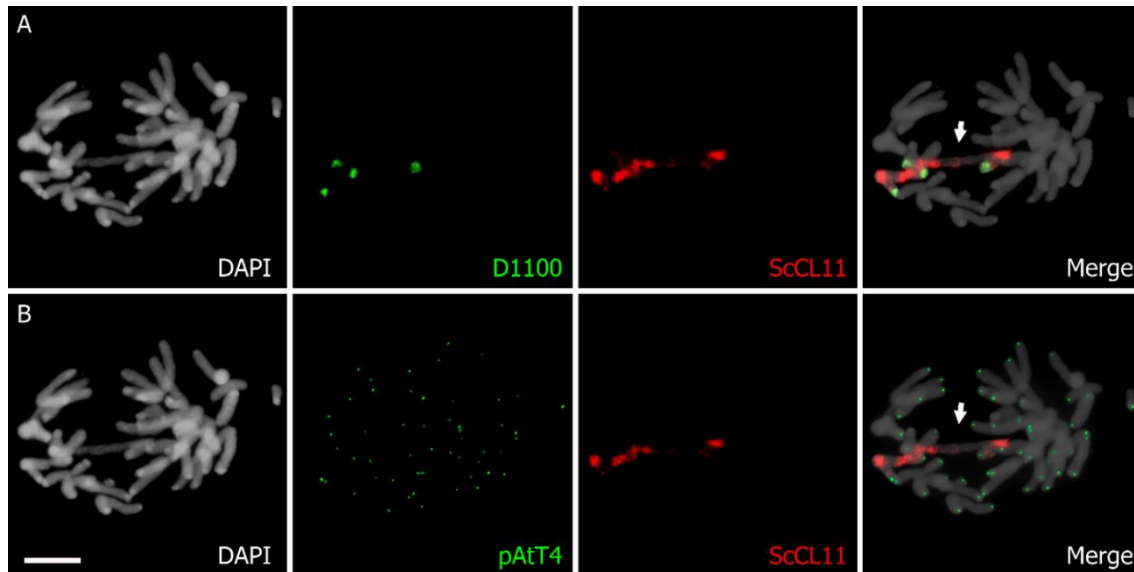


FIGURA 48. FISH de raíz de la planta 2015-IJ-1-9. **(A)** Anafase hibridada mediante FISH con las sondas *ScCL11* y *D1100*, donde se puede apreciar un Iso-BL dicéntrico separando cromátidas y formando un puente. **(B)** Rehibridación de la misma célula con *ScCL11* y *pAtT4*, observándose que el puente está formado por una única cromátida, mientras que la otra ha migrado íntegra a un polo. Las flechas señalan el puente anafásico. Barra 10µm.

Para analizar las anteras de esta misma planta (2015-IJ-1-9), se utilizaron las fases de diplotena, diacinesis y metafase I, puesto que en estas se pueden identificar mejor el apareamiento y permite analizar a grandes rasgos la estructura y el tipo de cromosoma B que portan.

Lo primero que llamo la atención en este estudio es que, pese a todos los derivados observados en las raíces, únicamente había un tipo de derivado en las anteras: el adIso-BL (FIGURA 49). Además, estos análisis permitieron confirmar que la morfología del adIso-BL es muy similar a un Iso-BL, pero con una deleción en uno de sus brazos al haber perdido la señal de *D1100* (FIGURA 49 A), tal y como se había observado en mitosis. También se realizó una rehibridación con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11* y con la sonda telomérica *pAtT4*, para identificar los extremos cromosómicos. Los resultados obtenidos, a diferencia de los obtenidos en las raíces, nos permitieron observar claramente los telómeros en los extremos de los brazos cromosómicos del adIso-BL, sin necesidad de aumentar el tiempo de exposición de la cámara. Esto podría interpretarse como que el adIso-BL, al haber pasado por varias divisiones celulares en la línea germinal, pudo estabilizar la región telomérica del brazo delecionado, de manera que el número de repeticiones aumento y ahora sí pudieron ser

detectadas mediante FISH sin necesidad de aumentar el tiempo de exposición (FIGURA 49 B).

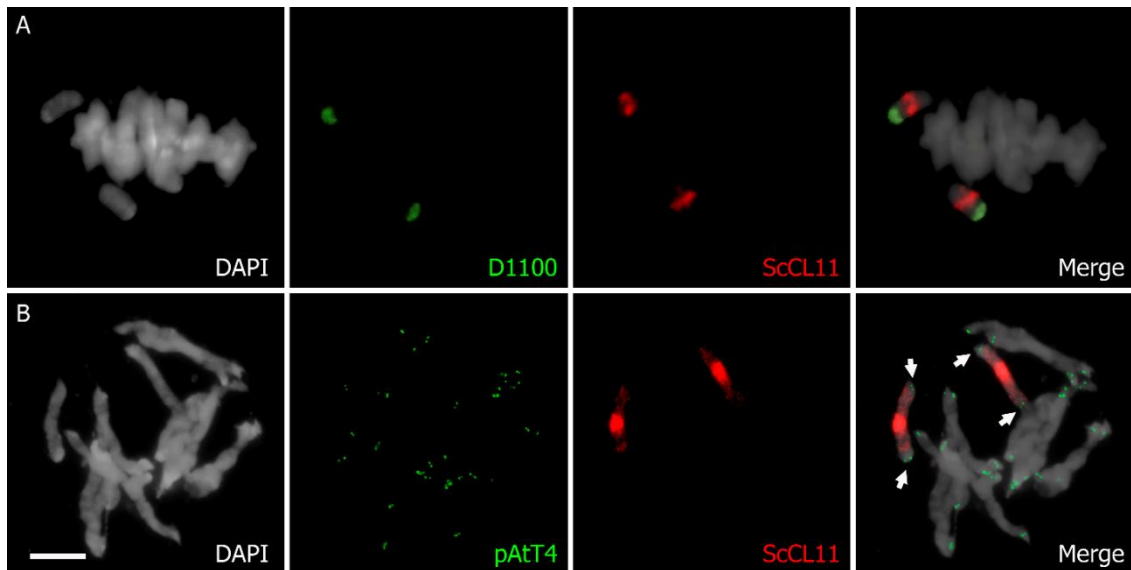


FIGURA 49. FISH de meiocitos de la planta 2015-IJ-1-9. **(A)** Metafase I hibridada con las sondas *ScCL11* y *D1100*, donde se puede apreciar la estructura del adIso-BL, con una deleción distal en uno de sus brazos. **(B)** Diplotena hibridada con *ScCL11* y *pAtT4*, donde se pueden apreciar las secuencias teloméricas al final de ambos extremos del adIso-BL. Las flechas marcan los extremos del adIso-BL. Barra 10 μ m.

Análisis estructural del Iso-BL asimétrico de deleción en paquitena

A continuación, se decidió realizar un estudio para conocer la estructura del adIso-BL de forma detallada, para ello se usaron anteras en paquitena de la planta 2015-IJ-1-9 (portadora de 2adIso-BL), debido a que en esta fase hay una menor condensación cromosómica que permite una mejor observación de la estructura del B. De este modo se pudo conocer más sobre el punto donde se produjo la deleción y obtener más información del mecanismo por el que pudo originarse el adIso-BL. Los mapeos se realizaron acorde a los 6 bloques heterocromáticos que forman el brazo largo del B (FIGURA 15 B), y todos se realizaron mediante FISH, usando las sondas *Sc55-3.FGA*, *Sc63-2.FGA*, *D1100* y *ScCL11* (FIGURA 29).

En primer lugar, se realizó un análisis con las sondas *ScCL11* y *D1100*, debido a que *ScCL11* es la sonda del B de centeno que más bloques heterocromáticos marca en el brazo largo, y por tanto nos permitiría conocer con mayor exactitud qué ha pasado en el brazo delecionado del adIso-BL. La otra sonda usada fue *D1100*, debido a que es la

única sonda que marca los 3 bloques heterocromáticos distales del brazo largo y, además, aparentemente había sido delecionada en su totalidad de uno de los brazos cromosómicos.

El resultado de este análisis permitió confirmar que el adIso-BL está formado por dos brazos largos del cromosoma B de centeno, estando uno de ellos delecionado a partir de la zona media del bloque heterocromático 4. Más concretamente, la rotura se había producido entre las señales de *ScCL11* y *D1100* de este bloque, puesto que la última señal presente en el brazo delecionado era la señal de *ScCL11* del bloque 4 y las señales de *D1100* se habían perdido totalmente (FIGURA 50 y 51 A y C).

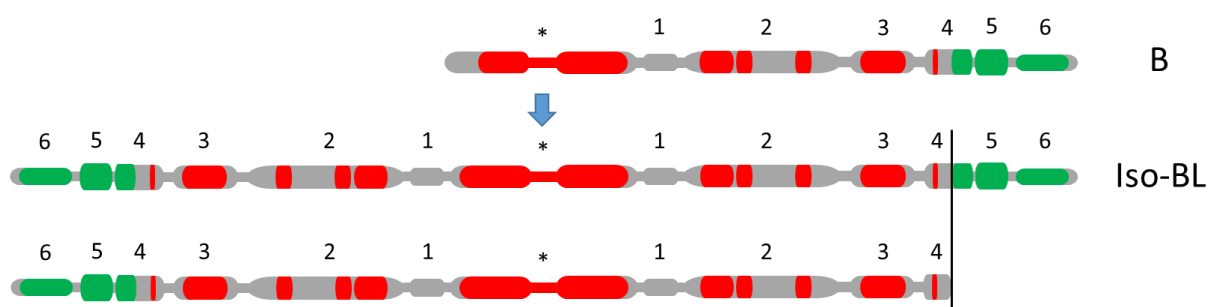


FIGURA 50. Esquemas de un cromosoma B estándar, un Iso-BL y un adIso-BL. Donde se representan *ScCL11* (rojo) y *D1100* (verde). La línea negra representa el lugar donde se ha producido la rotura del brazo del Iso-BL. El asterisco representa el centrómero y cada uno de los bloques heterocromáticos se encuentra numerado.

En segundo lugar, se realizó un análisis con *ScCL11* y *D1100*, en el que además se añadieron las sondas *Sc55* y *Sc63*, puesto que ambas localizan también en el bloque heterocromático 4. Esta combinación de sondas nos permitiría tener una mejor caracterización de la región donde se ha producido la deleción. Para poder llevar a cabo este estudio se realizó una combinación de *Sc55* y *Sc63* marcadas tanto con Biotina (rojo) como con Digoxigenina (verde) para poder obtener una señal que combinase ambos colores (amarillo) y no se confundiese con las señales de *ScCL11* (rojo) y *D1100* (verde), permitiendo además una fácil interpretación.

Los resultados de este estudio fueron sorprendentes, puesto que en el extremo del brazo delecionado no se observó la marca de *ScCL11* del bloque 4 o las señales de *Sc55* y *Sc63* de este mismo bloque, sino que se observaron una serie de bloques de heterocromatina adicionales, que no correspondían con los bloques 5 y 6 de la región distal del brazo largo del B. En este caso, lo que se observó fueron cinco bloques

heterocromáticos de un tamaño similar compuestos principalmente por *Sc55* y *Sc63* (FIGURA 51 B y D). El primero de ellos, representaría la parte proximal del bloque 4 original, donde se encuentra la señal de *ScCL11* observada en la FIGURA 51 A y C, y los otros cuatro bloques serían nuevas amplificaciones que se han producido en el adlso-BL, formadas principalmente por *Sc55* y *Sc63* (FIGURA 51 B y D, FIGURA 52). Por tanto, el adlso-BL no solo perdió el extremo distal de uno de sus brazos largos, sino que además amplificó las secuencias del brazo que se encuentran cerca del punto de delección hasta formar cuatro bloques extra, que estabilizarían su estructura y evitarían que este cromosoma se hubiera perdido en el momento de su truncamiento.

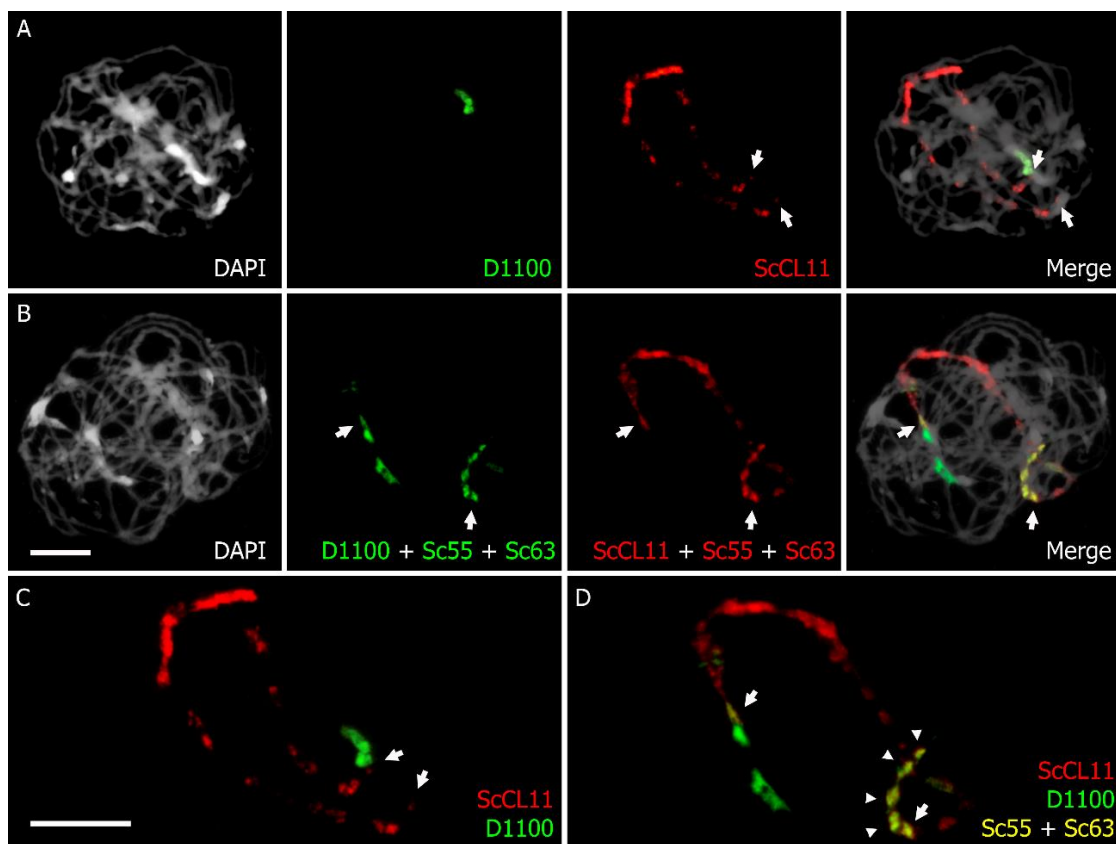


FIGURA 51. FISH de meiocitos de la planta 2015-IJ-1-9, portadora de 2adlso-BL. **(A)** Paquitena hibridada con las sondas *ScCL11* y *D1100*; se puede apreciar como *ScCL11* marca el bloque 4, donde se ha producido la delección. **(B)** Paquitena hibridada con *ScCL11*, *D1100*, *Sc55* y *Sc63*. La región distal del brazo truncado está formada por el bloque heterocromático 4 y cuatro nuevos bloques marcados en su totalidad por *Sc55* y *Sc63*. **(C y D)** Ampliaciones de las fotografías sin DAPI donde se puede apreciar mejor la estructura del adlso-BL. Las flechas indican la localización del bloque 4 y las puntas de flecha los nuevos bloques que se han amplificado. Barra 10µm.



FIGURA 52. Esquema de un adlso-BL, donde se representan *ScCL11* (rojo), *D1100* (verde) y *Sc55/Sc63* (amarillo). El asterisco representa el centrómero, los bloques heterocromáticos se encuentran numerados y los nuevos bloques formados están marcados con una punta de flecha.

ANÁLISIS MEIÓTICO DEL CROMOSOMA B DE CENTENO Y DERIVADOS

El estudio de la estructura del cromosoma B y de sus derivados ha permitido un mayor conocimiento sobre la localización de secuencias en este cromosoma accesorio. Por este motivo, se ha decidido tomar como referencia estos datos para realizar un estudio orientado a obtener más información sobre cómo transcurre la meiosis en el cromosoma B y cómo puede afectar esto a su transmisión. En este análisis, se han estudiado las fases clave de la meiosis en plantas del cultivar Paldang portadoras de 1B, 2Bs y 2adlso-BL; se ha comparado la frecuencia de bivalentes en metafase I de plantas con 2Bs, 2lso-BL y 2adlso-BL, y gracias a estos análisis, se han podido analizar algunas alteraciones de la meiosis como el autoapareamiento, además de observarse otros eventos como una inversión en el cromosoma B y una translocación en el adlso-BL.

Análisis meiótico de plantas con 2Bs

El estudio del comportamiento meiótico de dos cromosomas B se realizó mediante FISH, utilizando las sondas *ScCL11* y *D1100*, puesto que estas abarcan la mayor parte del cromosoma B, permitiendo diferenciar tanto la región distal del brazo largo, el centrómero y el brazo corto. Para este análisis se usaron anteras procedentes de plantas de Paldang hermanas (17-13-7 y 17-13-3), las cuales fueron fijadas el mismo día bajo las mismas condiciones. Los estadios meióticos utilizados fueron profase I, donde se estudió leptotena, cigotena, paquitena, diplotena/diacinesis (al ser fases consecutivas, de breve duración, han sido agrupadas para el desarrollo de este estudio); metafase I, diadas y tétradas.

En profase I, la clasificación de las células observadas se realizó según el grado de apareamiento que mostraban los 2Bs. Pudiendo encontrarse desapareados como univalentes, apareados por uno de los brazos o apareados por ambos brazos (bivalentes abiertos o cerrados respectivamente, a partir de paquitena hasta metafase I). Con respecto a la fase de leptotena, se diferenció entre temprana o tardía. La leptotena tardía se caracteriza porque se visualiza la formación del *bouquet*, que puede identificarse porque es una zona más condensada y fuertemente teñida, donde confluyen las regiones distales de los cromosomas. La presencia de las regiones distales

en el *bouquet* fue confirmada mediante FISH con las sondas *ScCL11* y *pAtT4*, pudiéndose apreciar como todas las secuencias teloméricas quedaban agrupadas en esa región (FIGURA 53). Además, dentro de las células en las que se observó a los cromosomas B desapareados, estos se clasificaron dependiendo de si sus regiones distales, marcadas por *D1100*, se encontraban próximas una con otra o no.

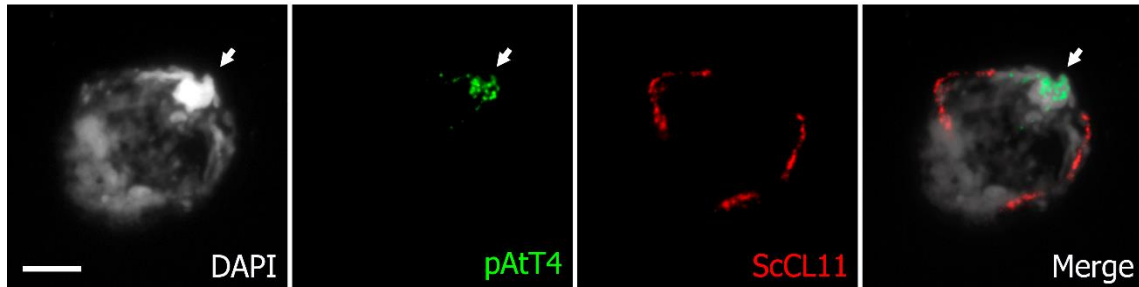


FIGURA 53. Leptotena tardía de centeno portadora de 2Bs hibridada mediante FISH con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11* y la sonda telomérica *pAtT4*. Se puede apreciar el *bouquet* como una zona más condensada y fuertemente teñida con DAPI, donde confluyen las regiones distales de los cromosomas marcadas por la sonda telomérica. Las flechas indican la localización del *bouquet*. Barra 10 μ m.

En **leptotena temprana**, los 2Bs no mostraban apareamiento en ninguna de las 16 células encontradas. Sin embargo, en 11 de las células observadas (68,75%), la región distal de los brazos largos estaba separada (FIGURA 54 A), mientras que en las 5 células restantes (31,25%) los extremos estaban juntos (FIGURA 54 B) (TABLA 9).

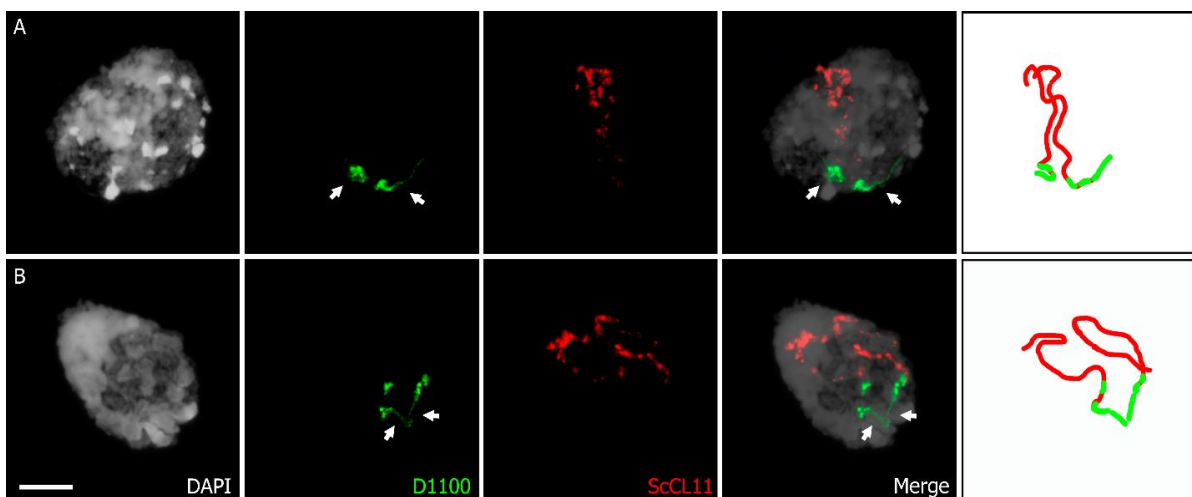


FIGURA 54. Meiocitos de centeno portadores de 2Bs en **leptotena temprana** hibridados mediante FISH con la sonda subteloómica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2Bs desapareados, donde ambos extremos marcados por *D1100* se pueden observar separados. **(B)** 2Bs desapareados, pero con los extremos marcados por *D1100* juntos. Las flechas indican la zona distal del brazo largo del B. El esquema de la derecha representa la disposición espacial de los cromosomas B. Barra 10 μ m.

Comportamiento 2Bs	Desapareados		Apareados
	Extremos separados	Extremos juntos	
Leptotena temprana	11	5	0
	16		
	68,75%	31,25%	0%

TABLA 9. Comportamiento de 2Bs en leptotena temprana.

En **leptotena tardía** se observaron un total de 93 células. Dentro de estas, los 2Bs estaban desapareados en 66 de ellas (70,97%), mientras que en las 27 células restantes (29,03%) se encontraban apareados. De las células donde los 2Bs estaban desapareados, se pudieron observar 26 células (27,96% del total) en la que los extremos distales de los brazos largos estaban distantes (FIGURA 55 A), mientras que en las otras 40 células (43,01% del total) los extremos se encontraban muy cercanos entre sí (FIGURA 55 B) (TABLA 10). Por otro lado, dentro de las 27 células que mostraban apareamiento, únicamente se observaron 3 de ellas (3,23% del total) en las que los Bs estaban apareados por el brazo corto (FIGURA 55 C); 14 células (15,05% del total) en las que estaban apareando por el brazo largo (FIGURA 55 D) y en las 10 células restantes (10,75% del total), el apareamiento se producía por ambos brazos cromosómicos (FIGURA 55 E) (TABLA 10). Otro dato a tener en cuenta, es que en todas las células observadas en leptotena tardía, los brazos largos de los Bs, marcados por *D1100*, estaban incluidos en el *bouquet*, aunque en ocasiones los extremos de los 2Bs estuvieran separados entre sí. Sin embargo, solo en 12 células de las 93 (12,90%) se pudo observar como la región distal del brazo corto de ambos cromosomas también estaba incluida en el *bouquet* (FIGURA 55 F).

Por otra parte, teniendo en cuenta todas las células en leptotena, tanto temprana como tardía, se pudo apreciar que, en 82 núcleos, los cromosomas B estaban desapareados. De los 164 cromosomas B observados, en 7 casos (4,27%) (TABLA 11) se pudo observar como los Bs autoapareaban (FIGURA 55 F). La detección de este autoapareamiento, no se había descrito previamente mediante la técnica de FISH pero, gracias al conocimiento de la disposición de las señales de *ScCL11* y *D1100*, se ha podido observar, ya que estas aparecen entremezcladas, adoptando disposiciones espaciales anómalas.

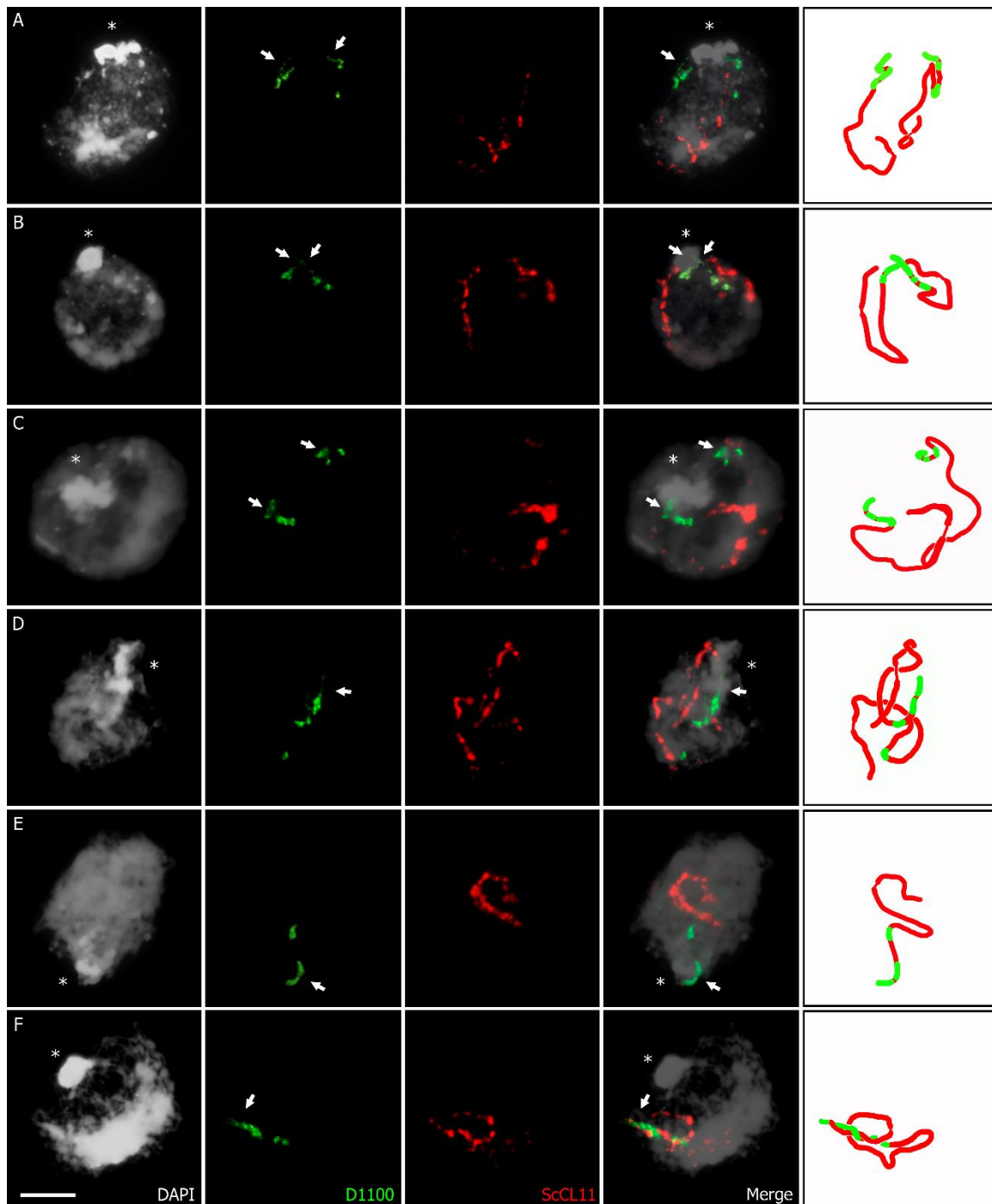


FIGURA 55. Meiocitos de centeno con 2Bs en **leptotena tardía** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2Bs desapareados, con los extremos de ambos brazos largos separados. **(B)** 2Bs desapareados, con los extremos del brazo largo juntos. **(C)** 2Bs apareados por el brazo corto. **(D)** 2Bs apareados por el brazo largo. **(E)** 2Bs apareados por ambos brazos y en toda su longitud. **(F)** Célula donde se puede apreciar un autoapareamiento entre la zona distal del brazo largo y la región pericentromérica. El asterisco indica la localización del *bouquet*. Las flechas indican el extremo del brazo largo del B. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los cromosomas B. Barra 10 μ m.

Comportamiento 2Bs	Desapareados		Apareados		
	Extremos separados	Extremos juntos	Brazo corto	Brazo largo	Ambos brazos
Leptotena tardía	26	40	3	14	10
	66		27		
	93				
	70,97%		29,03%		
	27,96%	43,01%	3,23%	15,05%	10,75%

TABLA 10. Comportamiento de 2Bs en leptotena tardía.

Comportamiento 2Bs desapareados	Autoaparean	No autoaparean
Leptotena	7 cromosomas	157 cromosomas
	164 cromosomas	
	4,27%	95,73%
	82	

TABLA 11. Comportamiento de 2Bs desapareados en leptotena.

En **cigotena**, se analizaron un total de 105 células. En 42 de ellas (40%), los cromosomas B se encontraban desapareados como univalentes (TABLA 12). De los 84 cromosomas B analizados en estas 42 cigotenas, se pudo observar como 6 de ellos (7,14%) autoapareaban (FIGURA 56 A) mientras que los 78 Bs restantes (92,86%) no lo hacían (FIGURA 56 B) (TABLA 12). Respecto a las 63 células (60%) donde los Bs se encontraban apareando (TABLA 12); se pudo apreciar que en 10 células (9,52%) los Bs apareaban únicamente por el brazo corto (FIGURA 56 C), en 28 células (26,67%) los Bs apareaban exclusivamente por el brazo largo (FIGURA 56 D), mientras que en las 25 células restantes (23,81%) los dos cromosomas B se observaron apareados por ambos brazos (FIGURA 56 E) (TABLA 12).

Comportamiento 2Bs	Desapareados		Apareados		
	autoapareados	No autoapareados	Brazo corto	Brazo largo	Ambos brazos
Cigotena	6 cromosomas	78 cromosomas			
	84 cromosomas				
	7,14%	92,86%	63		
	42		105		
	40%		60%		
			9,52%	26,67%	23,81%

TABLA 12. Comportamiento de 2Bs en cigotena. Resaltado en azul se muestra el número de cromosomas que autoaparean con respecto a los cromosomas totales en células donde los cromosomas B están desapareados.

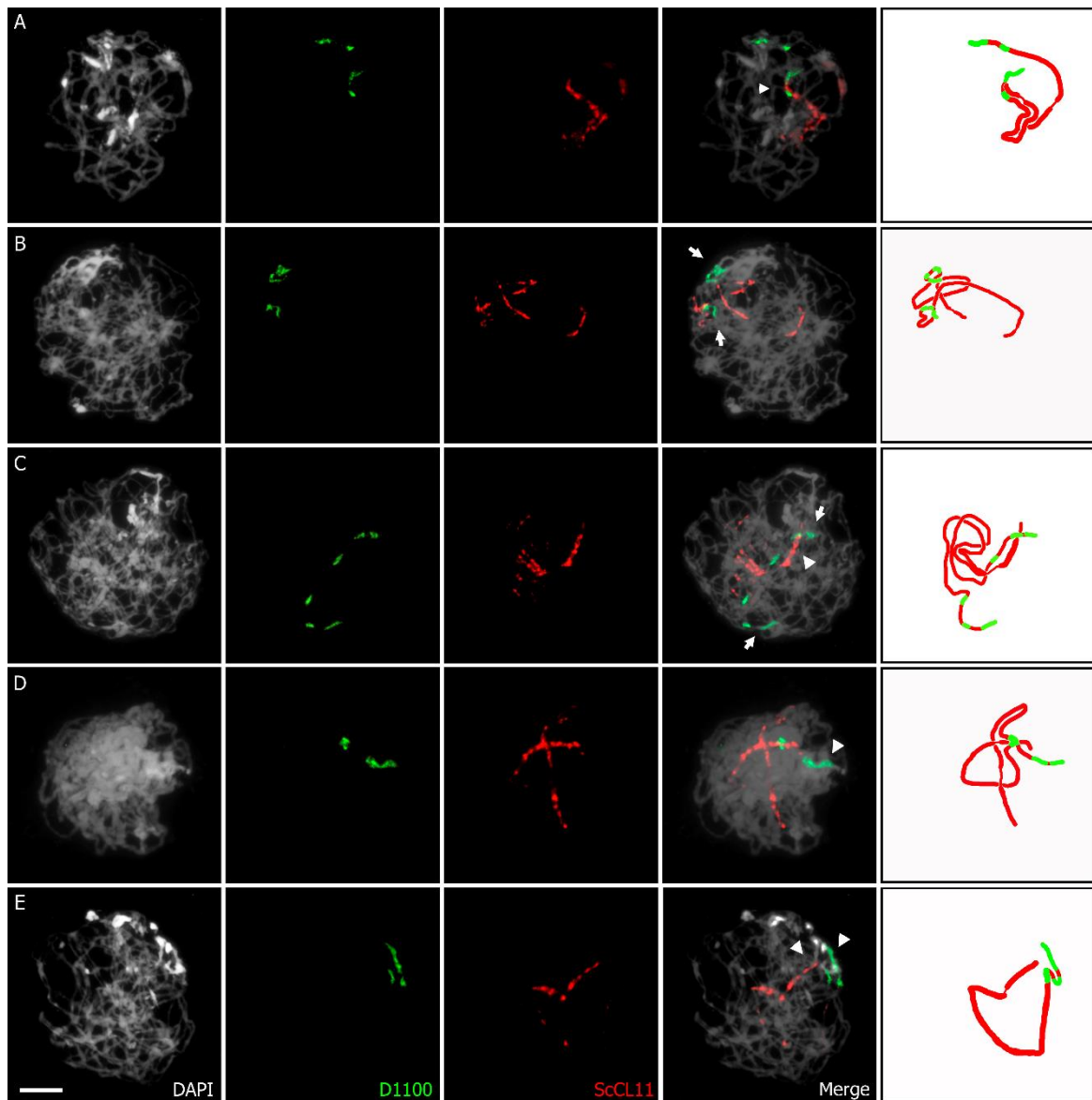


FIGURA 56. Meiocitos de centeno con 2Bs en **cigotena** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2Bs desapareados, con autoapareamiento en uno de ellos. **(B)** 2Bs desapareados, ninguno autoaparea. **(C)** 2Bs apareados por el brazo corto. **(D)** 2Bs apareados por el brazo largo. **(E)** 2Bs apareados por ambos brazos y en toda su longitud. Las flechas indican el extremo del brazo largo del B y las cabezas de flecha indican el apareamiento. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los cromosomas B. Barra 10 μ m.

En **paquitenas** se analizaron un total de 96 células. En 14 de ellas los cromosomas B se encontraban desapareados (14,58%); de los 28 cromosomas B analizados en estas 14 paquitenas, se pudo observar como 7 de ellos (25%) autoapareaban (FIGURA 57 A) mientras que los 21 Bs restantes (75%) no autoapareaban (FIGURA 57 B) (TABLA 13). Por otra parte, en las 82 paquitenas restantes (85,42%) los cromosomas B se encontraban apareados. Se observaron 3 células (3,13%) en las que los cromosomas B estaban

apareando únicamente por el brazo corto (FIGURA 57 C), 12 células (12,50%) en las que los Bs estaban apareando por el brazo largo (FIGURA 57 D) y 67 células (69,79%) en las que los cromosomas B estaban apareando por ambos brazos (FIGURA 57 E) (TABLA 13).

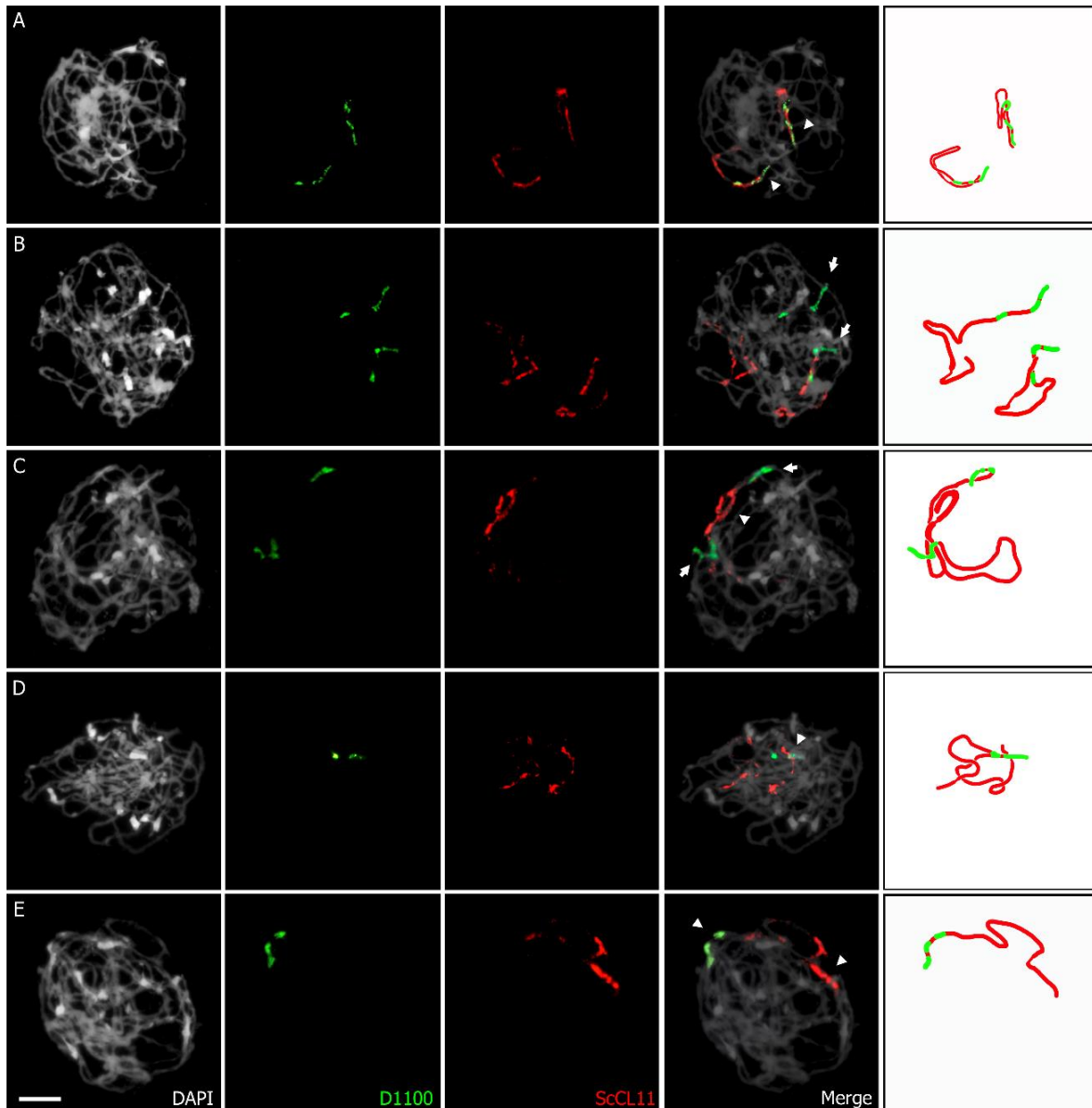


FIGURA 57. Meiocitos de centeno con 2Bs en **paquitena** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2Bs desapareados, con autoapareamiento en ambos Bs. **(B)** 2Bs desapareados, donde ninguno de ellos autoaparea. **(C)** 2Bs apareados por el brazo corto. **(D)** 2Bs apareados por el brazo largo. **(E)** 2Bs apareados por ambos brazos y en toda su longitud. Las flechas indican el extremo del brazo largo del B y las cabezas de flecha indican el apareamiento. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los cromosomas B. Barra 10 μ m.

Comportamiento 2Bs	Desapareados		Apareados			
Paquitena	autoapareados	No autoapareados	Brazo corto	Brazo largo	Ambos brazos	
	7 cromosomas	21 cromosomas				
	28 cromosomas		3	12	67	
	25%	75%				
	14		82			
	96					
	14,58%		85,42%			
		3,13%	12,50%	69,79%		

TABLA 13. Comportamiento de 2Bs en paquitena. Resaltado en azul se muestra el número de cromosomas que autoaparean con respecto a los cromosomas totales en células donde los cromosomas B están desapareados.

En **diplotena** y **diacinesis** se observaron un total de 90 células, dentro de las cuales se pudo observar que en 24 de ellas (26,67%) los cromosomas B estaban desapareados formando dos univalentes (FIGURA 58 A); a partir de esta fase no se observaron Bs autoapareados. En las 66 células restantes (73,33%) los cromosomas B aparecían formando bivalentes (TABLA 14). Dentro de estas últimas, en 9 células (10%) se pudieron observar bivalentes abiertos con un quiasma en el brazo corto (FIGURA 58 B), en 34 células (37,78%) se pudieron observar bivalentes abiertos con un quiasma en el brazo largo (FIGURA 58 C) y en 23 células (25,55%) se observaron bivalentes cerrados, con un quiasma en cada uno de sus brazos (FIGURA 58 D) (TABLA 14).

Comportamiento 2Bs	Desapareados (univalentes)	Apareados (bivalentes)			
Diplotena Y Diacinesis	24	Bivalentes abiertos		Bivalentes cerrados	
		Brazo corto	Brazo largo	Ambos brazos	
		9	34	23	
		66			
	90				
	26,67%	73,33%			
	10%	37,78%	25,55%		

TABLA 14. Comportamiento de 2Bs en diplotena y diacinesis.

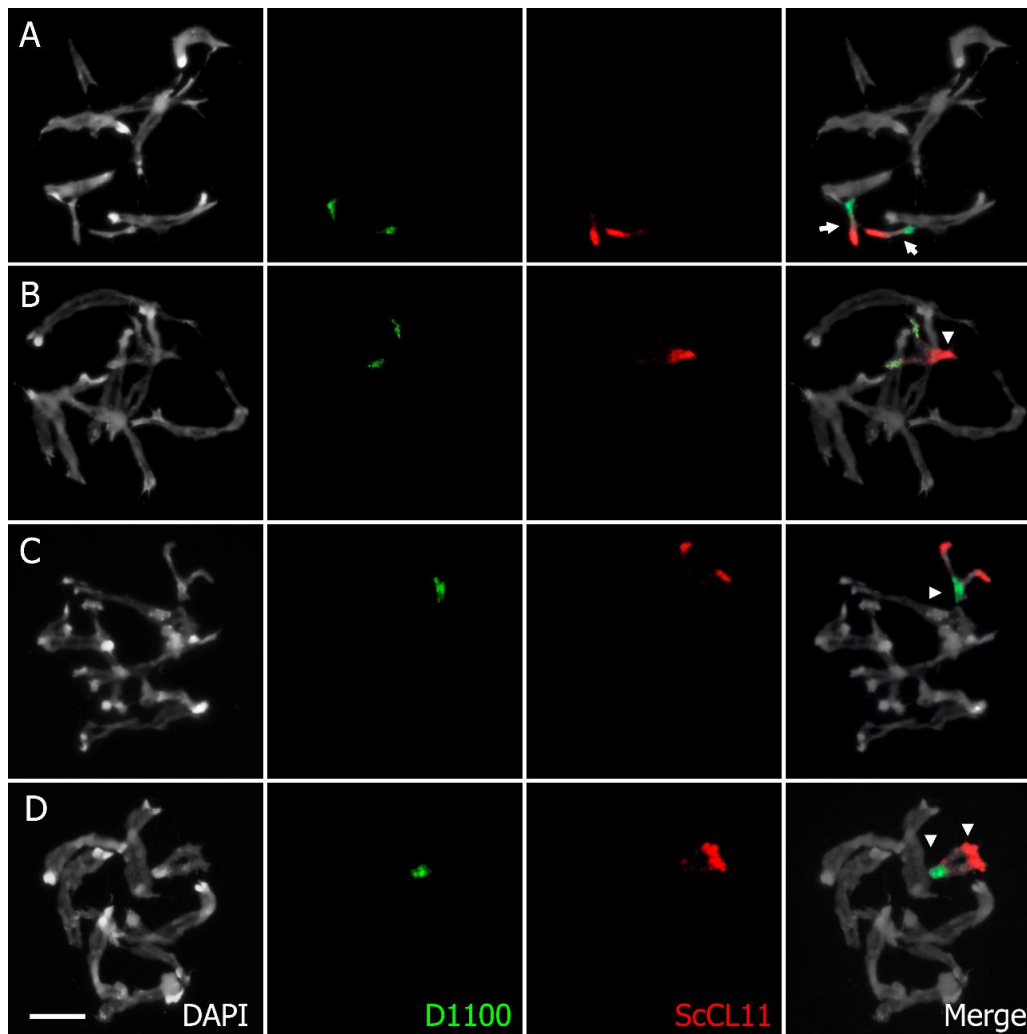


FIGURA 58. Meiocitos de centeno con 2Bs en **diplotena/diacinesis** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2Bs desapareados. **(B)** 2Bs formando un bivalente abierto con un quiasma en la zona distal del brazo corto. **(C)** 2Bs formando un bivalente abierto con un quiasma en la zona distal del brazo largo. **(D)** 2Bs formando un bivalente cerrado con 2 quiasmas, uno en cada uno de los brazos. Las flechas indican los cromosomas B como univalentes y las cabezas de flecha indican el quiasma. Barra 10 μ m.

En **metafase I**, se estudiaron un total de 137 células, dentro de las cuales se pudo observar como en 85 de ellas (62,04%) los cromosomas B estaban como univalentes (FIGURA 59 A), mientras que en las 52 células restantes (37,96%) se encontraban formando bivalentes (TABLA 15). Dentro de las células donde se observaron bivalentes, pudieron distinguirse 2 células (1,46%) donde los cromosomas B formaban bivalentes abiertos con el quiasma en el brazo corto (FIGURA 59 B), 12 células (8,76%) en las que los Bs formaban bivalentes abiertos con un quiasma en la región intersticial del brazo largo (FIGURA 59 C), 34 células (24,82%) donde los Bs formaban bivalentes abiertos, pero en este caso con el quiasma situado en la región distal del brazo largo (FIGURA 59

D). Con respecto a las 4 metafases restantes (2,92%), se observaron bivalentes cerrados con quiasmas tanto en las regiones distales del brazo corto como en las del brazo largo (FIGURA 59 E) (TABLA 15). Los quiasmas en el brazo largo (ya sea distal o intersticial) representan un 89,28% del total de los quiasmas y se dan en un 36,50% de las células observadas.

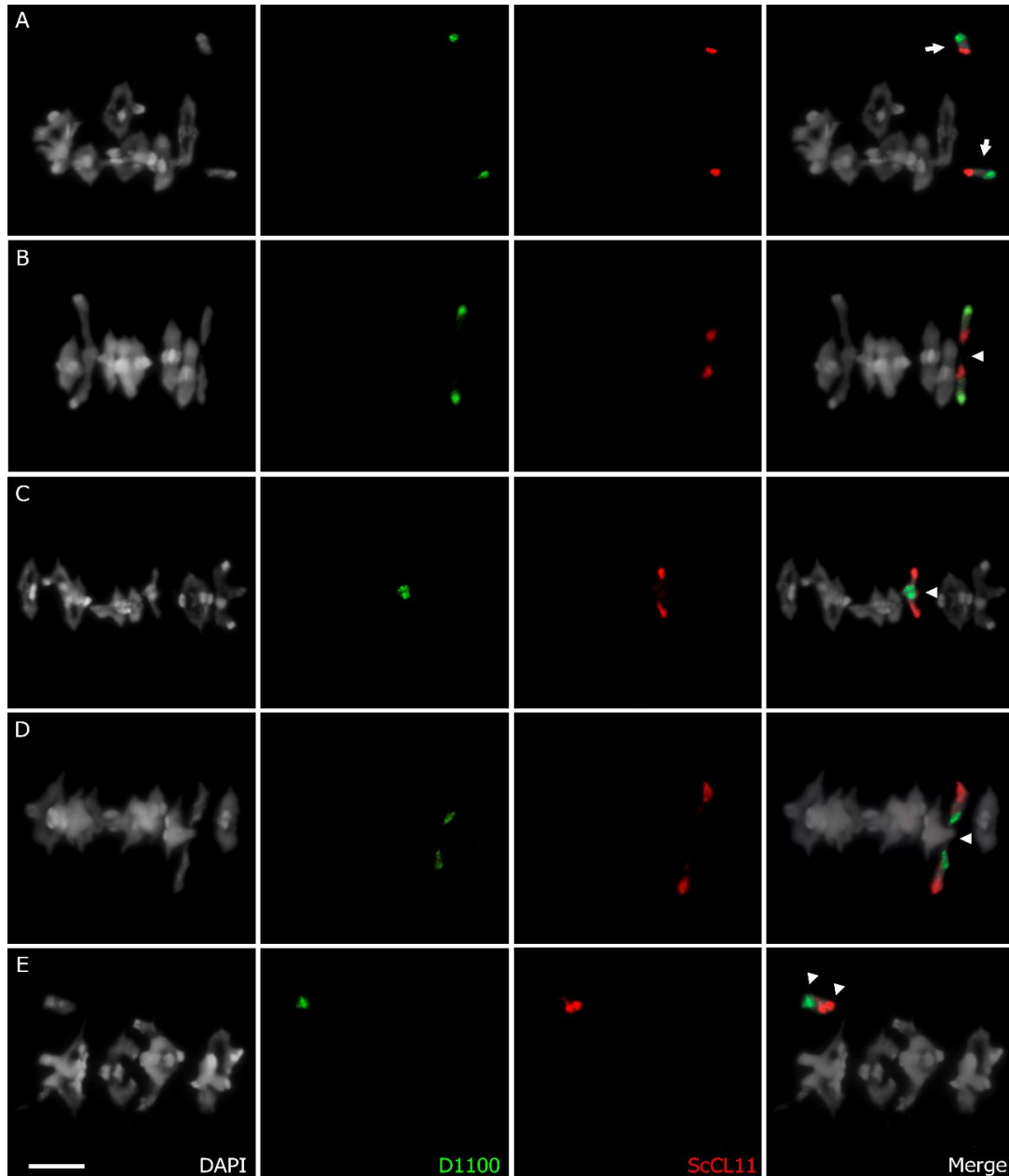


FIGURA 59. Meiocitos de centeno con 2Bs en **metafase I** hibridados mediante FISH con la sonda subteloamérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2Bs desapareados. **(B)** 2Bs formando un bivalente abierto con un quiasma en la zona distal del brazo corto. **(C)** 2Bs formando un bivalente abierto con un quiasma en la zona intersticial del brazo largo. **(D)** 2Bs formando un bivalente abierto con un quiasma en la zona distal del brazo largo. **(E)** 2Bs formando un bivalente cerrado con un quiasma en cada brazo. Las flechas indican los cromosomas B como univalentes y las cabezas de flecha indican el brazo donde está formado el quiasma. Barra 10 μ m.

Comportamiento 2Bs	Desapareados (univalentes)	Apareados (bivalentes)			
		Bivalentes abiertos			Bivalentes cerrados
Metafase I	85	Quiasma brazo corto	Quiasma brazo largo		Quiasma en ambos brazos
		2	Intersticial	Distal	4
			12	34	
		52			
	137				
	62,04%	37,96%			
1,46%		8,76%	24,82%	2,92%	

TABLA 15. Comportamiento de 2Bs en metafase I.

En **diadas**, se analizaron un total de 158 núcleos (79 diadas), las cuales tenían un total de 158 cromosomas B. Se observó que 118 Bs (74,68%) habían migrado a uno de los núcleos de la diada sin separar cromátidas hermanas (FIGURA 60 A). En 28 casos (17,72%) se observó cómo los Bs no habían separado cromátidas hermanas y estos quedaban retrasados en la placa metafásica formando un micronúcleo (FIGURA 60 B). En 10 casos (6,33%), los cromosomas B habían separado sus cromátidas, incorporándose estas a los núcleos de la diada (FIGURA 60 C). Por último, en los 2 casos restantes (1,27%), los cromosomas B habían separado cromátidas, quedando al menos una de ellas retrasada, sin llegar a incorporarse al núcleo quedando como micronúcleo (FIGURA 60 D) (TABLA 16). De los 158 núcleos contados en esta fase, únicamente 43 núcleos (27,22%) no tenían ningún cromosoma B, frente a los 115 (72,78%) restantes que poseían al menos un B (TABLA 16).

Comportamiento 2Bs	Cr. B no separa cromátidas	Cr. B no separa cromátidas Y forma micronúcleos	Cr. B separa cromátidas	Cr. B separa cromátidas Y forma micronúcleos
Diadas	118	28	10	2
	79 diadas (158 núcleos y 158 cromosomas B)			
	74,68%	17,72%	6,33%	1,27%
	Núcleos de diada con Bs		Núcleos de diada sin Bs	
	115		43	
	72,78%		27,22%	

TABLA 16. Comportamiento de 2Bs en diadas.

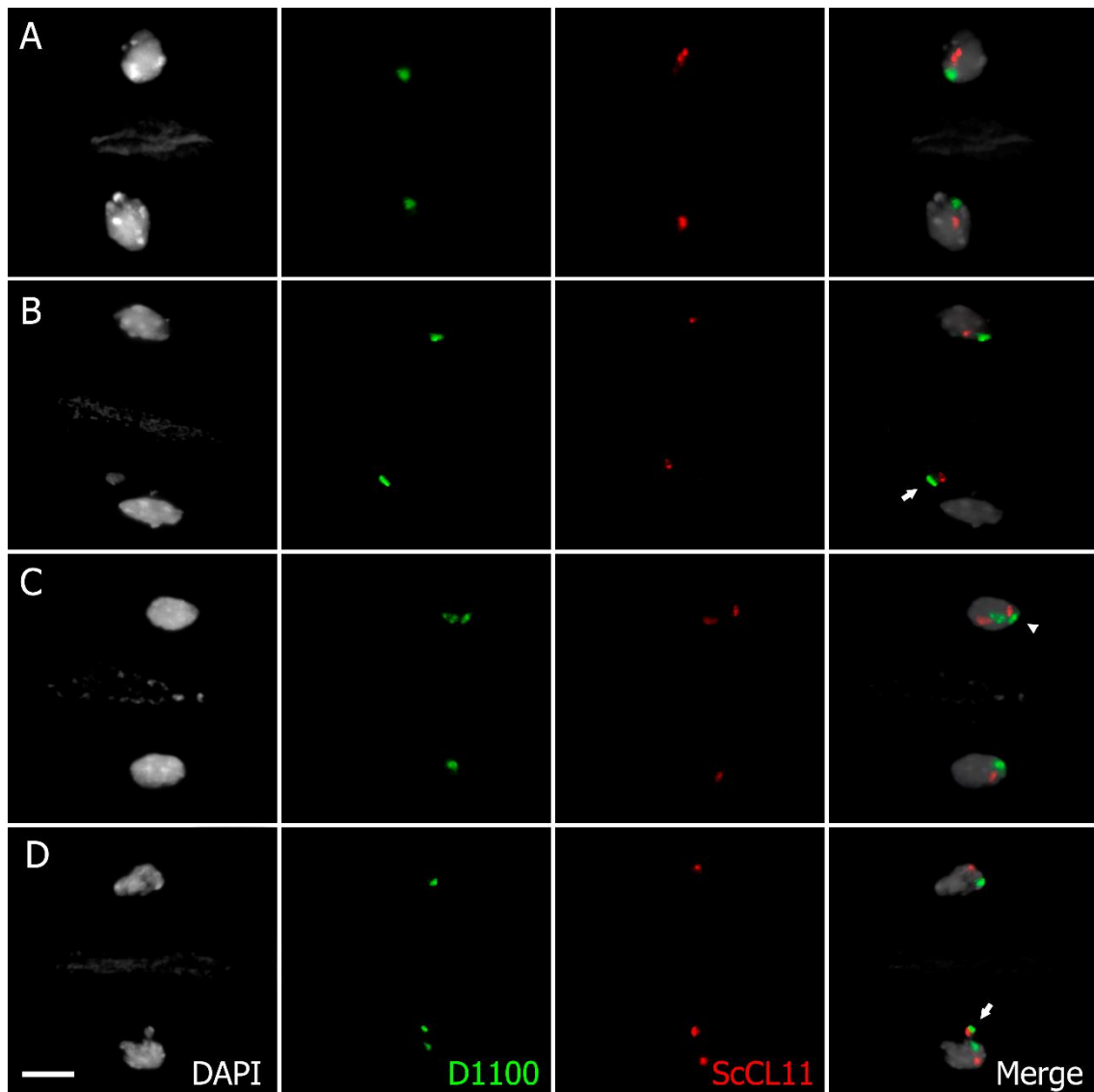


FIGURA 60. Meiocitos de centeno con 2Bs en **diadas** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Diada con 2Bs donde se observa el comportamiento esperado para esta fase, donde los Bs no separan cromátidas y migran con sus dos cromátidas uno a cada polo. **(B)** Diada donde los Bs no separan cromátidas y migran a polos opuestos quedando uno como un micronúcleo. **(C)** Diada donde uno de los Bs ha separado cromátidas y un núcleo posee una cromátida y un B entero. **(D)** Diada donde uno de los Bs separa cromátidas y este, al migrar, queda como un micronúcleo. Las flechas indican los micronúcleos del B y la cabeza de flecha indica el núcleo que posee un B entero y una cromátida. Barra 10µm.

En **tétradas**, se observaron un total de 292 núcleos (73 tétradas), en los que había presentes un total de 146 cromosomas B. En 38 ocasiones (26,03%), el comportamiento del B fue que no separó cromátidas, habiendo migrado a uno de los núcleos de la tétrada (FIGURA 61 A). Por otra parte, se observaron 11 cromosomas B (7,53%) que no habían separado sus cromátidas, pero que habían quedado retrasados formando micronúcleos (FIGURA 61 B). Se observaron 64 Bs (43,84%) que habían separado cromátidas hermanas

y estas se incorporaron en diferentes núcleos de la tétrada (FIGURA 61 C). Por último, los 33 Bs restantes (22,60%), habían separado cromátidas, pero al menos una de ellas quedó retrasada formando un micronúcleo (FIGURA 61 D) (TABLA 17). De los 292 núcleos de tétrada analizados, 93 no portaban cromosoma B (31,85%), frente a los 199 núcleos (68,15%) que poseían al menos un B (TABLA 17).

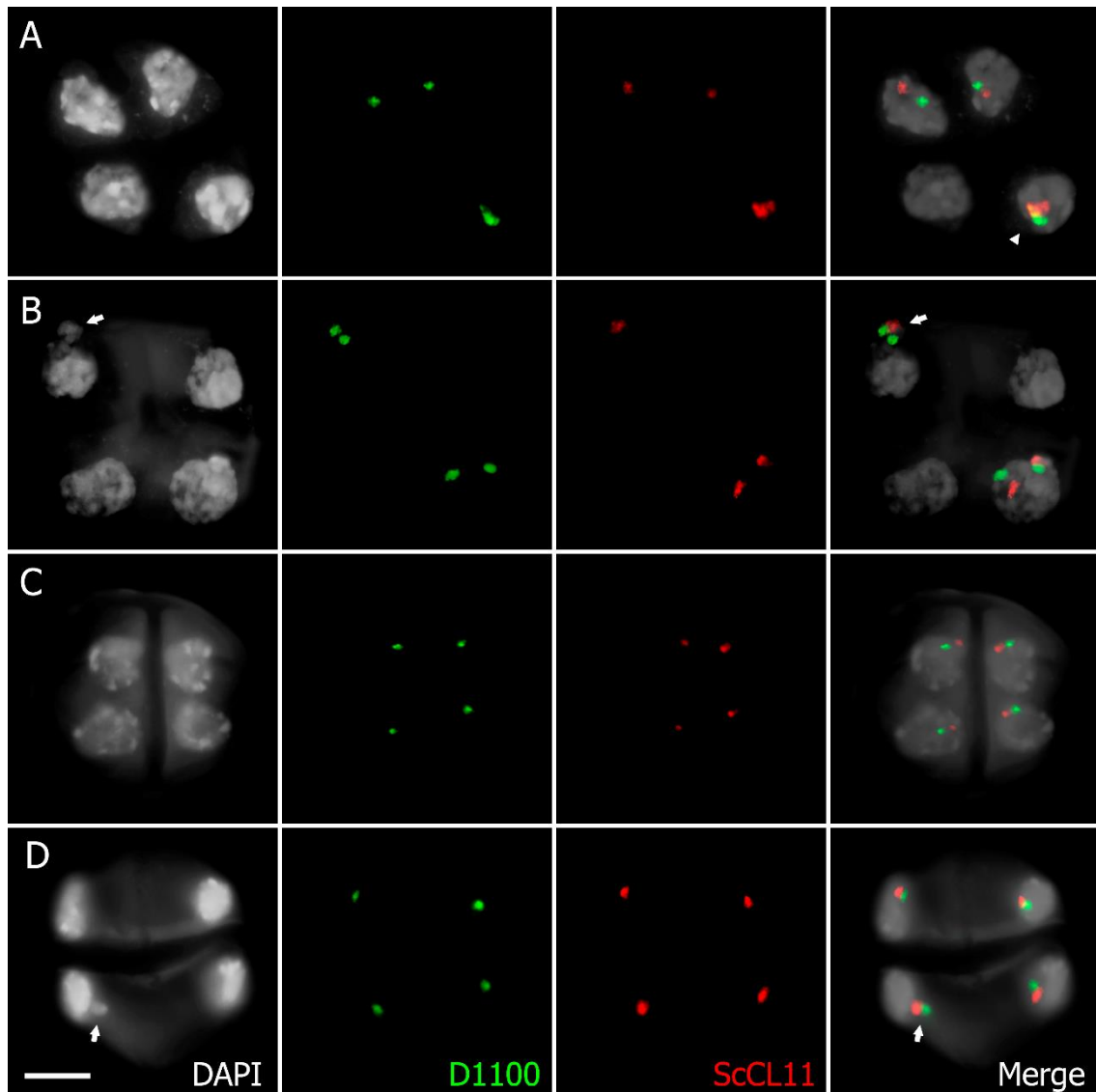


FIGURA 61. Meiocitos de centeno con 2Bs en **tétradas** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Tétrada con 2Bs donde uno de los B no separa cromátidas y migra con ambas a uno de los núcleos. **(B)** Tétrada donde uno de los Bs no separa cromátidas quedando como un micronúcleo. **(C)** Tétrada donde los Bs separan cromátidas, que es el comportamiento esperado para esta fase. **(D)** Tétrada donde los Bs separan cromátidas y una queda como un micronúcleo. Las flechas indican los micronúcleos del B y la cabeza de flecha indica el núcleo que posee un B entero que no ha separado cromátidas. Barra 10 μ m.

Comportamiento 2Bs	Cr. B no separa cromátidas	Cr. B no separa cromátidas Y forma micronúcleos	Cr. B separa cromátidas	Cr. B separa cromátidas Y forma micronúcleos
Tétradas	38	11	64	33
	73 tétradas (292 núcleos y 146 cromosomas B)			
	26,03%	7,53%	43,84%	22,60%
	Núcleos de tétrada con Bs		Núcleos de tétrada sin Bs	
	199		93	
	68,15%		31,85%	

TABLA 17. Comportamiento de 2Bs en tétradas.

Análisis meiótico de plantas con 1B

También se realizó el análisis de plantas portadoras de un cromosoma B, con el fin de conocer su comportamiento en meiosis. Más concretamente, para conocer si se produce autoapareamiento, igual que cuando el B se encuentra como univalente en células portadoras de 2Bs, y si este autoapareamiento puede afectar a su segregación. Este análisis se realizó mediante FISH, utilizando las sondas *ScCL11-1* y *D1100* en dos espigas de la misma planta (17-4-10), perteneciente al cultivar Paldang, recogidas a la vez en las mismas condiciones. El análisis se realizó en todas las etapas de la profase, además de en metafase I, diadas y tétradas. La clasificación de las células observadas desde leptotena hasta metafase I se realizó en función de si los Bs mostraban o no autoapareamiento, en el caso de tenerlo se trató de describir la configuración que adoptaba el B en cada uno de los casos.

En **leptotena**, en 77 células de las 83 observadas (92,77%), no se encontró autoapareamiento del B (FIGURA 62 A). Sin embargo, en las 6 células restantes (7,23%) se pudo detectar que el cromosoma B autoapareaba, ya que las señales de *D1100* y *ScCL11* aparecían entremezcladas o adoptando disposiciones espaciales anómalas (FIGURA 62 B) (TABLA 18). Todos los cromosomas que autoapareaban tenían una única configuración de autoapareamiento, la cual se denominó configuración A, en la que la zona pericentromérica marcada por *ScCL11*, apareaba parcialmente con el brazo largo incluyendo una parte de la región distal marcada por *D1100* (FIGURA 62 B). Además de esta configuración A, en ocasiones se puede observar como las regiones

pericentroméricas se pliegan, apreciándose toda la señal de *ScCL11* concentrada en una pequeña región; esta observación puede ser un fenómeno óptico debido a la disposición de los cromosomas en el núcleo o podría ser algún tipo de autoapareamiento entre secuencias repetidas de las regiones pericentroméricas; estas células no se han contabilizado como autoapareamientos. Además, en esta fase se pudo observar que en 58 de las 83 células estudiadas (69,88%), la señal de *D1100* correspondiente al bloque 6 aparecía incluida dentro del *bouquet*, mientras que en las 25 células restantes (30,12%) se encontraba fuera del mismo. Por el contrario, únicamente se observaron 37 de las 83 células (44,58%) en las que el brazo corto del B estuviera incluido dentro del *bouquet*.

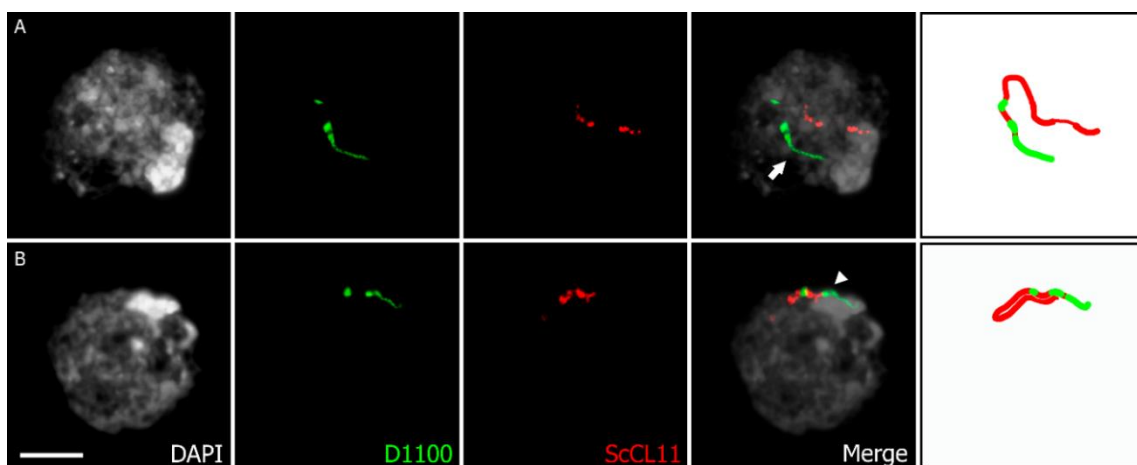


FIGURA 62. Meiocitos de centeno portadores de 1B en leptotena hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Leptotena con 1B que no muestra autoapareamiento, donde ambos extremos se encuentran en el *bouquet*. **(B)** Leptotena con 1B autoapareado, mostrando la única configuración de autoapareamiento identificable en leptotena. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los cromosomas B. La flecha indica el extremo distal del brazo largo. La cabeza de flecha señala el autoapareamiento. Barra 10µm.

Comportamiento 1B	No autoaparea	Autoaparea (configuración A)
Leptotena		
	77	6
	83	
	92,77%	7,23%

TABLA 18. Comportamiento de 1B en leptotena, donde se observa la única configuración de autoapareamiento observada en esta fase.

En **cigotena**, en 54 de los 81 meiocitos observados (66,66%) no se encontró autoapareamiento del B (FIGURA 63 A), mientras que en los 27 meiocitos restantes (33,34%) sí se detectó autoapareamiento (TABLA 19). Cuando el B autoapareaba, se observó que adoptaba una serie de configuraciones, las cuales se ordenaron según el tamaño de la región autoapareada. La configuración A, es la más frecuente, apareciendo en 10 células (12,35%), en ella la zona pericentromérica aparea con el brazo largo incluyendo una parte de la región distal; el apareamiento se da a largo de todo el brazo largo excepto en el bloque 6 (FIGURA 63 B). Por otra parte, se observaron 6 células que tenían la configuración B (7,41%), donde la región distal del brazo largo está apareando con regiones proximales del mismo, pero sin incluir a la región pericentromérica (FIGURA 63 C). Se observaron 8 células que presentaban la configuración C (9,88%), en este caso, únicamente la parte distal (bloques 4 y 5, pero sin incluir el bloque 6) es la que se encuentra apareando con las regiones centroméricas y pericentroméricas quedando el resto del cromosoma formando un lazo (FIGURA 63 D). La configuración D fue observada en 2 células (2,47%), donde el apareamiento se da entre zonas intersticiales del brazo largo no marcadas por las sondas (FIGURA 63 E). Por último, se observó 1 célula en la que el B adoptaba la configuración E (1,23%), donde la zona más distal del brazo largo está apareando consigo misma (FIGURA 63 F) (TABLA 19).


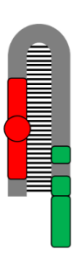
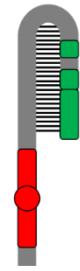
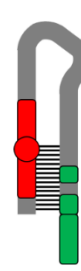

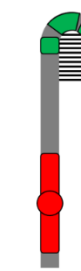
Comportamiento 1B	No autoaparea	Autoaparea				
Cigotena						
	54	Conf. A	Conf. B	Conf. C	Conf. D	Conf. E
		10	6	8	2	1
		27				
		81				
66,66%	33,34%					
	12,35%	7,41%	9,88%	2,47%	1,23%	

TABLA 19. Comportamiento de 1B en cigotena, observándose un esquema con las configuraciones que puede adoptar el cromosoma B en esta fase.

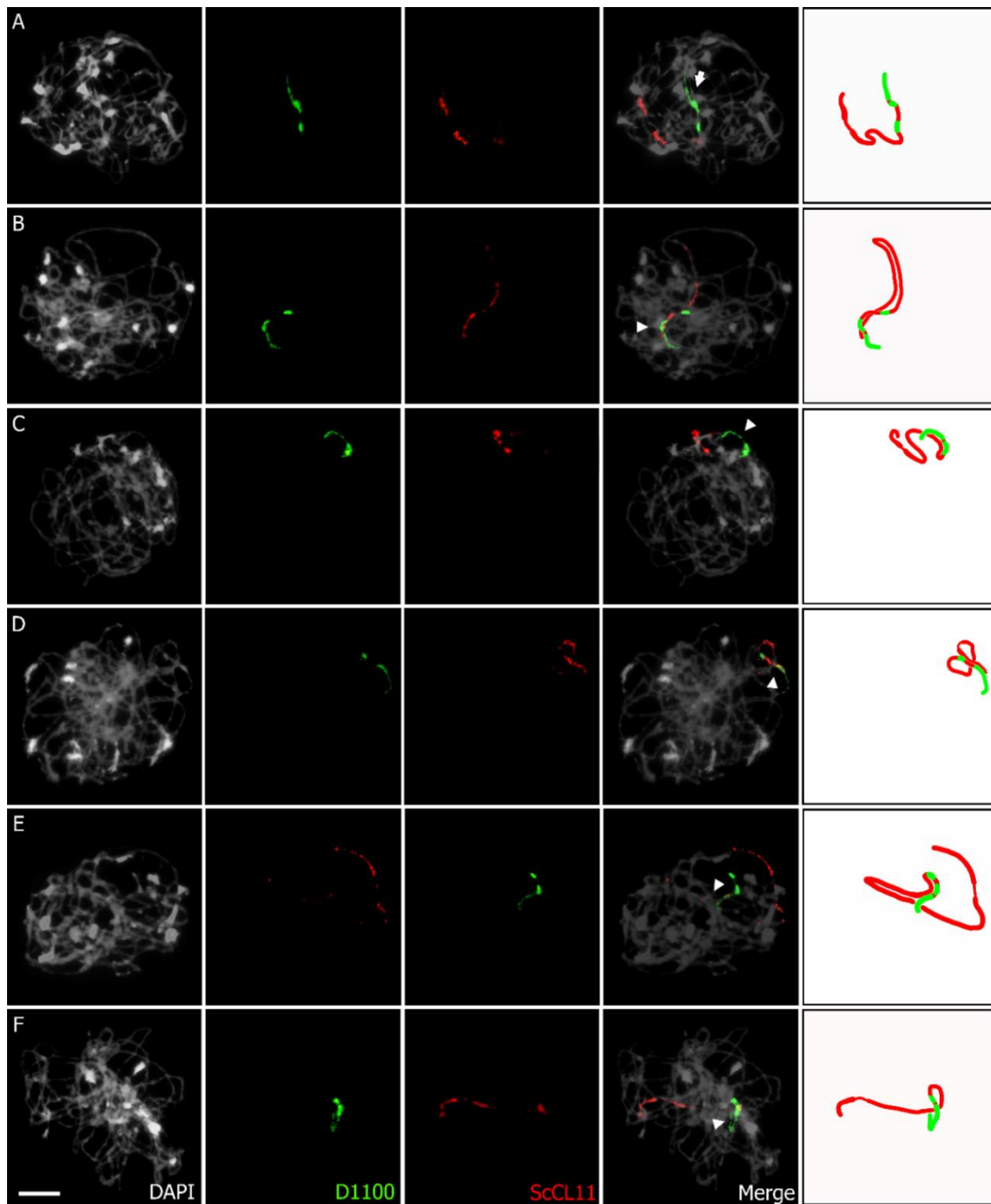


FIGURA 63. Meiocitos de centeno con 1B en **cigotena** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 1B sin autoapareamiento. **(B)** 1B mostrando la configuración A de autoapareamiento, estando parte de la región distal del brazo largo apareando con la región centromérica y pericentromérica, extendiéndose el autoapareamiento al resto del brazo largo, excepto en el bloque 6. **(C)** 1B mostrando la configuración B, donde la región distal autoaparea con zonas más intersticiales del brazo largo sin incluir las regiones centromérica y pericentroméricas. **(D)** 1B mostrando la configuración C, donde la región distal del B aparea con parte de las regiones centroméricas y pericentroméricas, pero el autoapareamiento no se extiende al resto del brazo y el cromosoma forma un lazo. **(E)** 1B mostrando la configuración D, donde autoaparean regiones intersticiales del brazo largo sin incluir la región distal ni centromérica. **(F)** 1B mostrando la configuración E, donde aparece autoapareando únicamente la región distal del brazo largo. Las flechas indican el extremo del brazo largo del B y las cabezas de flecha indican el apareamiento. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los cromosomas B. Barra 10 μ m.

En **paquitena** se analizaron 61 células. En 31 de ellas (50,82%) el cromosoma B no mostraba autoapareamiento (FIGURA 64 A), mientras que en las 30 células restantes (49,18%) el B sí autoapareaba, repitiéndose algunas de las configuraciones observadas previamente (TABLA 20). Se observaron cuatro configuraciones de autoapareamiento, las cuales corresponden con las observadas en cigotena. La configuración A es la más frecuente, observándose en 14 células (22,95%), donde se observa como la zona pericentromérica autoaparea con el brazo largo incluyendo parte de la región distal marcada por *D1100*, el autoapareamiento también se extiende al resto del brazo largo, quedando únicamente el bloque 6 sin aparear (FIGURA 64 B). La configuración B se observó en 6 células (9,835%), donde la región distal hibridada con D1100 autoaparea únicamente con regiones intersticiales (FIGURA 64 C). Por otra parte, de la configuración C se observaron 4 células (6,56%) en las cuales solo aparea la parte distal (bloques 4 y 5, pero sin incluir el bloque 6) con las regiones centromérica y pericentroméricas, el autoapareamiento no se extiende al resto del brazo y el cromosoma forma un lazo (FIGURA 64 D). Por último, 6 células (9,835%) muestran la configuración D donde se puede apreciar como autoaparea la zona media del brazo largo del B sin incluir ni pericentrómero ni región subtelomérica (FIGURA 64 E) (TABLA 20).


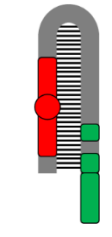
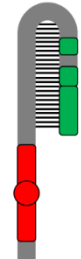
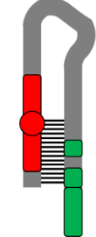
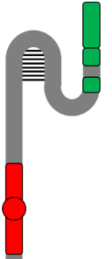
Comportamiento 1B	No autoaparea	Autoaparea (configuración A)			
Paquitena					
	31	Conf. A	Conf. B	Conf. C	Conf. D
		14	6	4	6
	30				
	61				
50,82%	49,18%				
	22,95%	9,835%	6,56%	9,835%	

TABLA 20. Comportamiento de 1B en paquitena, observándose un esquema con las configuraciones que puede adoptar el cromosoma B en esta fase.

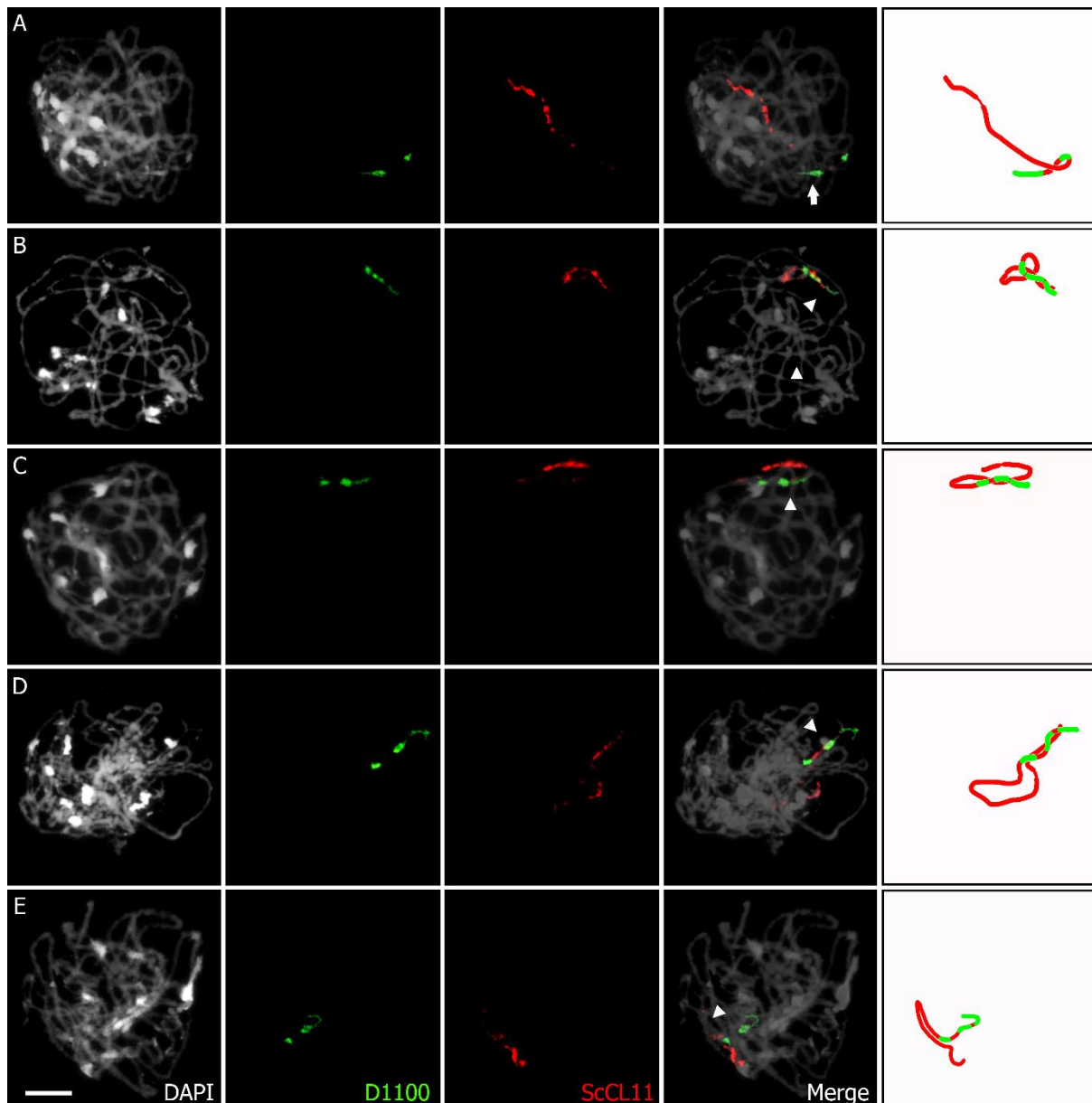


FIGURA 64. Meiocitos de centeno con 1B en **paquitena** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 1B sin autoapareamiento **(B)** 1B con la configuración A de autoapareamiento, donde se observa la parte de la región distal del brazo largo apareando con la región centromérica y pericentromérica, extendiéndose el autoapareamiento al resto del brazo largo. **(C)** 1B exhibiendo la configuración B, donde la región distal autoaparea con zonas más intersticiales del brazo largo. **(D)** 1B mostrando la configuración C, donde la región distal del B aparea con las regiones centroméricas y pericentroméricas, formando un lazo. **(E)** 1B con la configuración D, donde autoaparean regiones intersticiales del brazo largo sin incluir la región distal ni centromérica. Las flechas indican el extremo del brazo largo del B y las cabezas de flecha indican el apareamiento. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los cromosomas B. Barra 10 μ m.

En **diplotena** y **diacinesis** se analizaron un total de 84 células, de las cuales en 73 (86,90%) el cromosoma B no se encontraba autoapareado (FIGURA 65), mientras que en las 11 células restantes (13,10%) se concluyó que el B estaba autoapareado porque las sondas *ScCL11* y *D1100* aparecían muy próximas y estaban entremezcladas de manera que la estructura del B que se puede observar es totalmente irreconocible (TABLA 21). Estas configuraciones deben responder a la formación de un quiasma intracromosómico o algún tipo de interacción física en el B para compensar la necesidad de apareamiento con un cromosoma homólogo. Dentro de las células en las que el B parecía autoapareado, se pudieron observar siete configuraciones distintas, las cuales no están relacionadas con las observadas en fases previas, y por ese motivo se las ha nombrado con una letra (A-G) seguida de una D (Diplotena) (TABLA 21) (FIGURA 66 A-G). Dentro de estas configuraciones, la más abundante era la configuración AD. La diferenciación de estas configuraciones está basada en la proximidad y distribución relativa de las sondas en el B.

Comportamiento 1B	No autoapareado	Autoapareado						
		Conf. AD	Conf. BD	Conf. CD	Conf. DD	Conf. ED	Conf. FD	Conf. GD
Diplotena Y Diacinesis	73	5	1	1	1	1	1	1
		11						
		84						
	86,90%	13,10%						
		5,96%	1,19%	1,19%	1,19%	1,19%	1,19%	1,19%

TABLA 21. Comportamiento de 1B en diplotena y diacinesis.

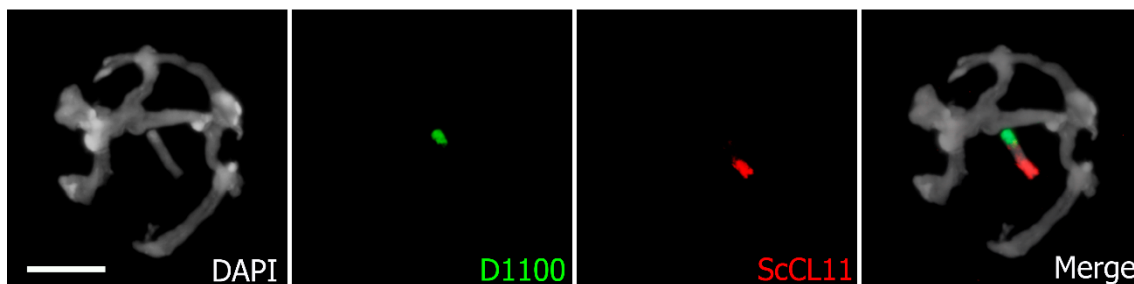


FIGURA 65. Meiocito de centeno portador de 1B en el estadio de diplotena. Las sondas de ADN hibridadas mediante FISH son la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. En esta célula se puede apreciar como el cromosoma B se encuentra estirado sin mostrar autoapareamiento. Barra 10µm.

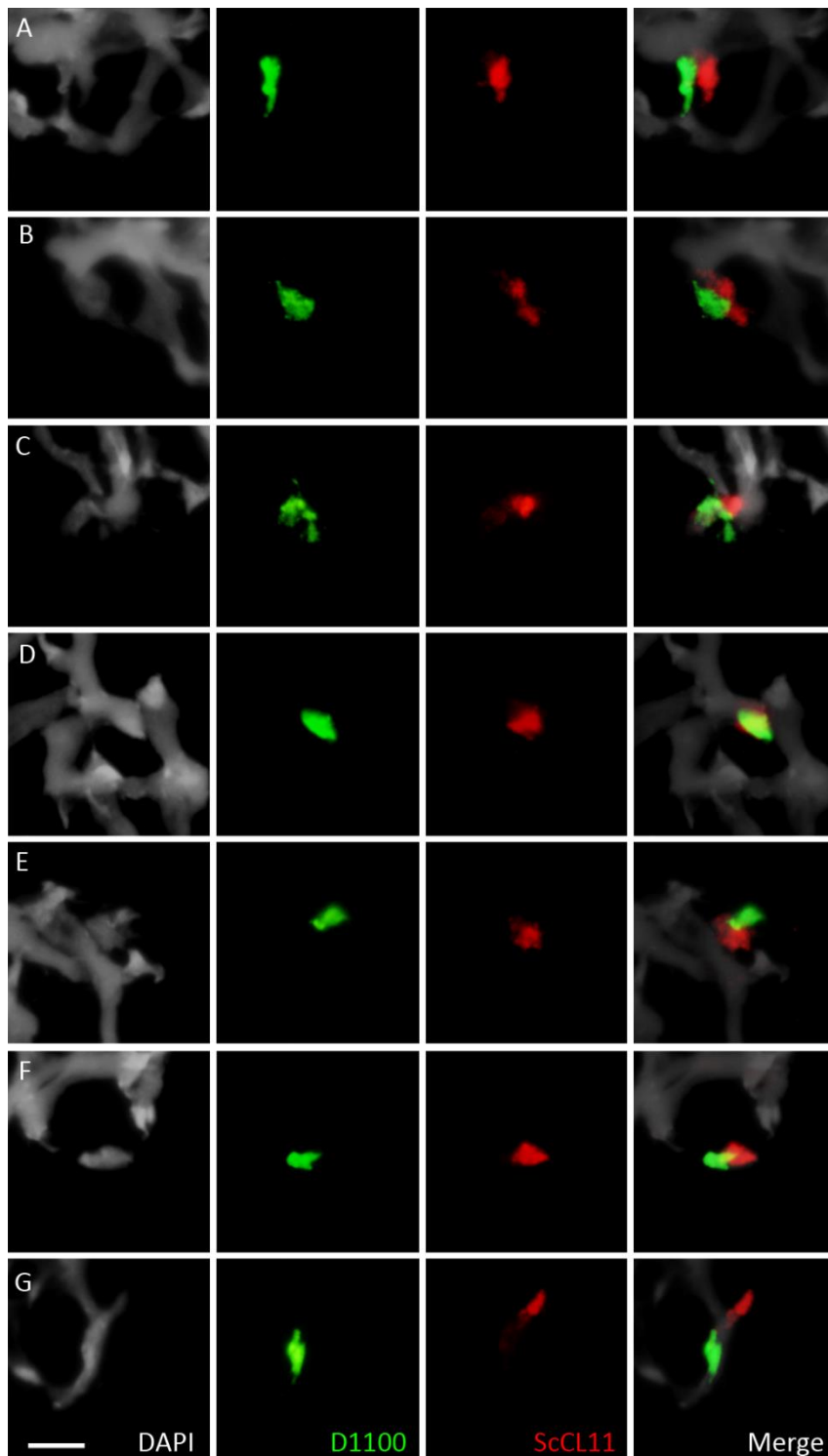


FIGURA 66. Ampliaciones de meiocitos portadores de 1B de centeno en **diplotena y diacinesis**. Todas las ampliaciones corresponden al B adoptando diferentes configuraciones de autoapareamiento observadas durante estos estadios meióticos. La hibridación se realizó usando en FISH la sonda subteloamérica *D1100*, junto con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Ampliación de una célula donde puede apreciarse la configuración AD de autoapareamiento. **(B)** Ampliación de un meiocito donde se puede apreciar la configuración BD de autoapareamiento. **(C)** Ampliación de una diplotena donde apreciarse la configuración CD de autoapareamiento. **(D)** Ampliación de una célula donde puede apreciarse la configuración DD de autoapareamiento. **(E)** Ampliación de la configuración ED, donde se puede apreciar como ambas sondas aparecen entremezcladas y estiradas. **(F)** Ampliación de un meiocito donde se puede apreciar la configuración FD de autoapareamiento. **(G)** Ampliación de una célula donde puede apreciarse la configuración GD de autoapareamiento. Barra 5µm.

En **metafase I**, de un total de 53 células analizadas, se pudo observar que en 43 de ellas (81,13%) el B poseía la configuración esperada para un univalente, es decir, sin autoapareamiento (FIGURA 67). Por otro lado, se observaron 10 células (18,87%) en las que se concluyó que el B estaba autoapareado, porque al igual que en el caso de la diplotena y diacinesis, se podía observar que las sondas *ScCL11* y *D1100* aparecían muy

próximas y estaban entremezcladas adoptando disposiciones espaciales anómalas para un univalente. Dentro de estas últimas, se observaron seis tipos o configuraciones de apareamiento diferentes, las cuales no se corresponden con las configuraciones observadas previamente, y por ese motivo se las denominó con una letra (A-F) seguidas de una M (metafase I) (FIGURAS 68 A-F) (TABLA 22). De manera similar a la fase anterior, estas disposiciones espaciales deben responder a la formación de un quiasma intracromosómico o algún tipo de interacción física en el B para compensar la necesidad de apareamiento con un cromosoma homólogo. En el caso de metafase I, se puede apreciar que el número de autoapareamientos es similar al de diplotena. Sin embargo en ambas fases los autoapareamientos son menores a los observados en paquitena donde alcanzan el mayor número.

Comportamiento 1B	No autoapareado	Autoapareado					
		Conf. AM	Conf. BM	Conf. CM	Conf. DM	Conf. EM	Conf. FM
Metafase I	43	4	2	1	1	1	1
		10					
		53					
	81,13%	18,87%					
		7,54%	3,77%	1,89%	1,89%	1,89%	1,89%

TABLA 22. Comportamiento de 1B en Metafase I.

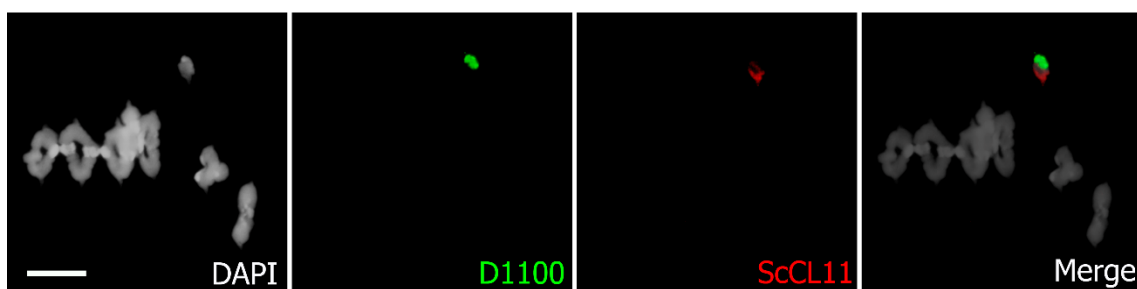


FIGURA 67. Meiocito de centeno portador de 1B en el estadio de metafase I. Las sondas de ADN utilizadas para FISH son la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. En esta célula se puede apreciar como el cromosoma B se encuentra estirado sin mostrar autoapareamiento. Barra 10µm.

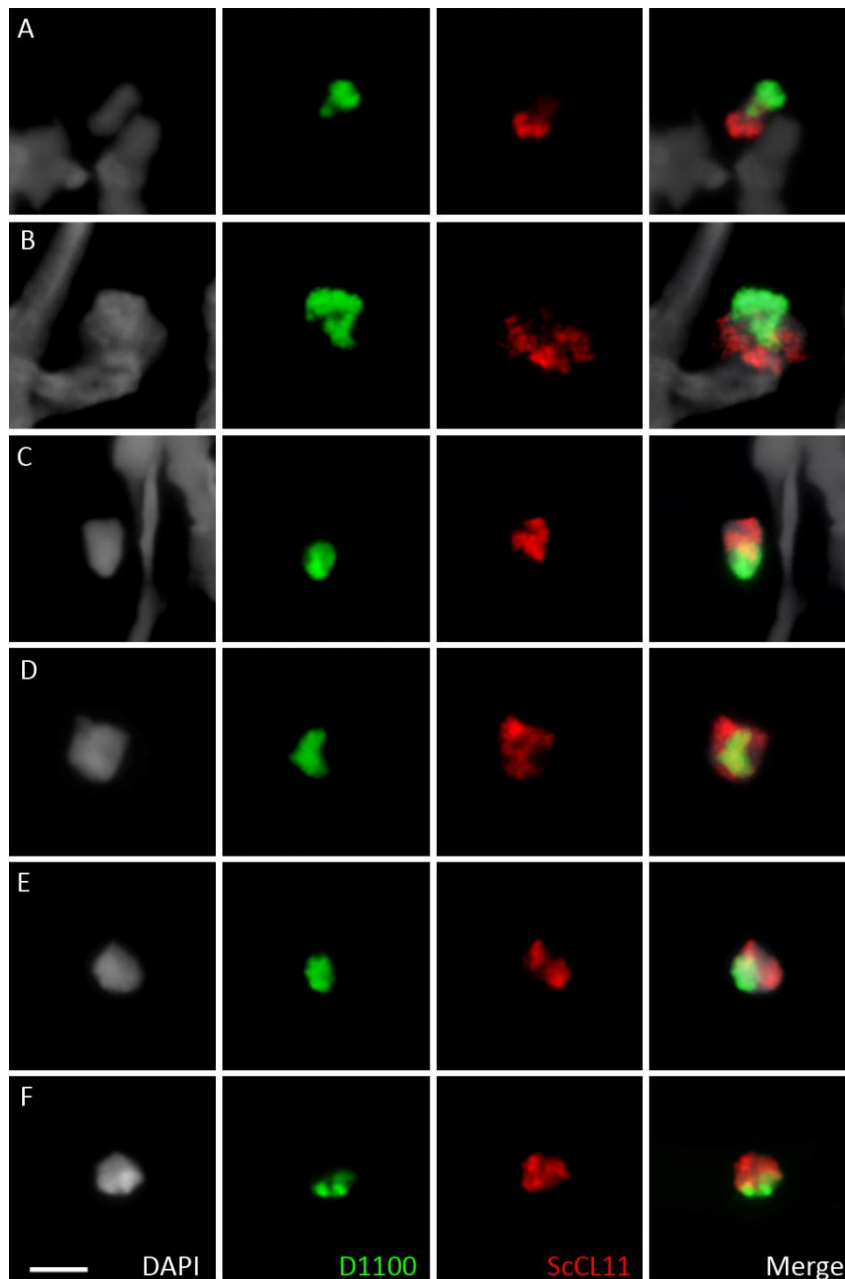


FIGURA 68. Ampliaciones de meiocitos portadores 1B de centeno en el estadio de **metafase I**. Todas las ampliaciones corresponden a las diferentes configuraciones de autoapareamiento observadas en el B durante este estadio meiótico. La hibridación se realizó usando en FISH la sonda subteloamérica *D1100*, junto con la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Configuración AM de autoapareamiento, que es la más abundante dentro de las configuraciones de apareamiento. **(B)** Configuración BM de autoapareamiento. **(C)** Configuración CM de autoapareamiento. **(D)** Cromosoma B con la configuración DM de autoapareamiento. **(E)** B con la configuración EM. **(F)** Configuración FM de autoapareamiento. Barra 5 μ m.

En **díadas**, de un total de 65 díadas analizadas, se observó que en 20 de ellas (30,77%), el B se había integrado en el núcleo de una de las células de la díada (FIGURA 69 A), mientras que en las 45 células restantes (69,23%) el B se encontró formando micronúcleos (FIGURA 69 B) (TABLA 23). En ninguna de las células se observó división ecuacional del cromosoma B. Es muy importante reseñar que, en esta fase, de los 130 núcleos de díada observados, únicamente 20 contenían un cromosoma B (15,38%), frente a los 110 que no contenían B (84,62%) (TABLA 23). Estos datos nos indican que, al estar en una única dosis, la falta del cromosoma homólogo y el autoapareamiento disminuyen la segregación correcta del B.

Comportamiento 1B	Cr. B no separa cromátidas	Cr. B no separa cromátidas Y forma micronúcleos	Cr. B separa cromátidas	Cr. B separa cromátidas Y forma micronúcleos
Diadas	20	45	0	0
	65 diadas (130 núcleos y 65 cromosomas B)			
	30,77%	69,23%	0%	0%
	Núcleos de diada con Bs		Núcleos de diada sin Bs	
	20		110	
	15,38%		84,62%	

TABLA 23. Comportamiento de 1B en diadas.

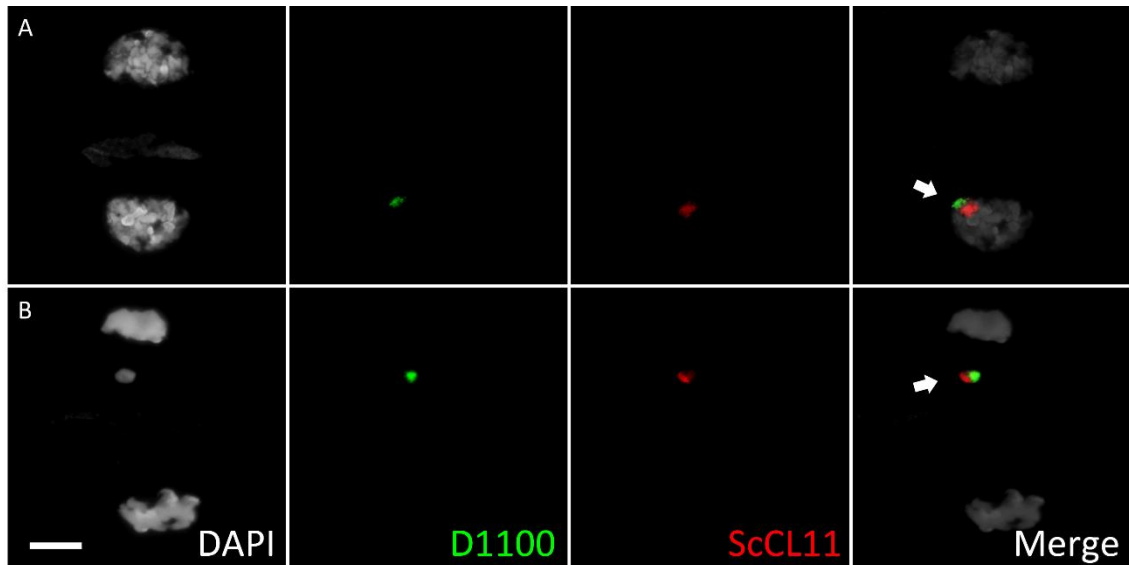


FIGURA 69. Meiocito de centeno portador de 1B en el estadio de **diadas**. Las sondas de ADN utilizadas en FISH son la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Célula en la que el B no separa cromátidas y migra a uno de los polos celulares. **(B)** Célula donde se puede apreciar como el cromosoma B no ha separado cromátidas, queda retrasado en la división y forma un micronúcleo. Las flechas indican la localización del cromosoma B. Barra 10µm.

Por último, en **tétradas** se contabilizaron un total de 70 células con 280 núcleos. Se analizó el comportamiento del B pudiéndose observar que únicamente 8 Bs no habían separado cromátidas. En 4 ocasiones (5,715%) el B había migrado con sus dos cromátidas a uno de los polos quedando integrado en el núcleo (FIGURA 70 A) y en las otras 4 ocasiones (5,715%) el B había quedado como micronúcleo (FIGURA 70 B) (TABLA 24). En 40 tétradas el B había separado cromátidas, sin embargo, únicamente en 8 (11,43%) la segregación fue la correcta, llegando cada una de las cromátidas a integrarse en su correspondiente núcleo (FIGURA 70 C). Por el contrario, en las 32 tétradas restantes (45,71%), al menos una de las cromátidas quedó como micronúcleo sin integrarse en el núcleo de la tétrada (FIGURA 70 D) (TABLA 24). Además, pudieron observarse 22 tétradas que no siguieron los comportamientos anteriormente descritos en este o en otros estadios. En 19 de estas tétradas (27,14%) se pudo observar como las cromátidas se habían separado, pero se encontraban en núcleos transversalmente opuestos de la tétrada (FIGURA 70 E), lo cual permite conocer que, aun no habiendo observado división ecuacional del cromosoma B en diadas, esta se produce. Dentro de estas 19 tétradas, en todas pudo observarse como al menos una cromátida quedó como micronúcleo. En las 3 tétradas restantes (4,29%) no se observó ninguna señal de cromosoma B, lo cual se explicaría si las cromátidas o los B hubieran quedado como micronúcleos en divisiones previas y estos hubieran sido degradados (TABLA 24). Para concluir este análisis, se comprobó que, de los 280 núcleos de tétrada analizados, 224 núcleos no portaban cromosoma B (80%), frente a los 56 núcleos (20%) que poseían al menos un B (TABLA 24).

Comportamiento 1B	Cr. B no separa cromátidas	Cr. B no separa cromátidas Y forma micronúcleos	Cr. B separa cromátidas	Cr. B separa cromátidas Y forma micronúcleos	Otros comportamientos	
					Opuesto	Sin B
Tétradas	4	4	8	32	19	3
	70 tétradas (280 núcleos y 70 cromosomas B)					
	5,715%	5,715%	11,43%	45,71%	27,14%	4,29%
	Núcleos de tétrada con Bs			Núcleos de tétrada sin Bs		
	56			224		
	20%			80%		

TABLA 24. Comportamiento de 1B en tétradas.

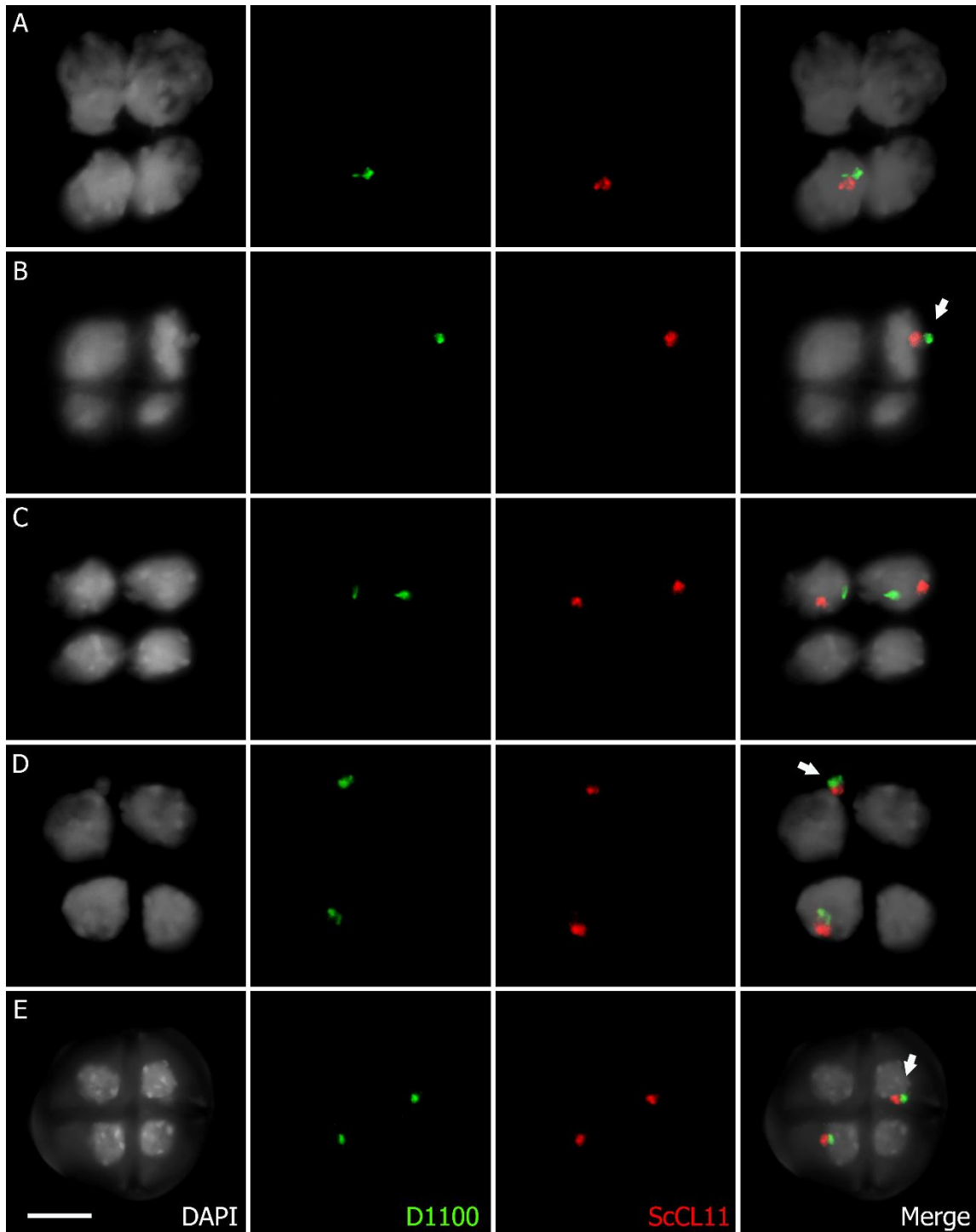


FIGURA 70. Meiocitos de centeno con 1B en **tétradas** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Tétrada donde se observa como un cromosoma B no separó cromátidas y migró a uno de los núcleos. **(B)** Tétrada en la que el cromosoma B no separó cromátidas y quedó retrasado formando un micronúcleo. **(C)** Tétrada en la que el cromosoma B separó cromátidas y migró cada una a núcleos opuestos. **(D)** Tétrada en la que el cromosoma B separó cromátidas, pero una de ellas quedó retrasada formando un micronúcleo. **(E)** Tétrada donde el cromosoma B separó cromátidas, pero estas se encontraron en núcleos transversalmente opuestos, donde una está formando un micronúcleo. Esta disposición de las cromátidas no se podría dar en esta fase, por tanto, la separación de cromátidas se tuvo que producir en diadas. Las flechas indican el extremo del brazo largo del B. Barra 10 μ m.

Comparación del autoapareamiento y segregación de plantas con 2Bs y 1B.

A continuación, se compararon los datos de autoapareamiento del cromosoma accesorio obtenidos durante toda la profase I y metafase I de plantas portadoras de 1B y 2Bs. Para comparar las muestras se realizaron pruebas χ^2 de contingencia (homogeneidad), trabajando con un nivel de significación estadística de 0,05 o inferior.

Los resultados nos permiten observar como en **leptotena**, cuando está empezando el apareamiento, los valores de autoapareamiento en plantas con 1B y 2Bs son similares, siendo bajos en ambos casos y sin mostrar diferencias significativas (FIGURA 71). Sin embargo, a medida que avanza la meiosis y se va formando el complejo sinaptonémico, se puede observar que hay diferencias muy significativas, puesto que en **cigotena** el número de autoapareamientos en plantas con 1B, es cuatro veces mayor que el observado en plantas con 2Bs ($\chi^2=16,77$, $p<0,001$, $g.l=1$) (FIGURA 71). En paquitena, se observa el mayor porcentaje de autopareamientos tanto en plantas con 1B como con 2Bs; siendo el número de autoapareamientos en plantas con 1B significativamente mayor ($\chi^2=4,59$, $p<0,05$, $g.l=1$) que el observado para 2Bs (FIGURA 71). En **diplotena** y **diacinesis**, cuando ya se ha desensamblado el complejo sinaptonémico, lo único que mantiene a los homólogos juntos son los quiasmas; se puede observar como hay una bajada en el autoapareamiento, principalmente en plantas con 2Bs, donde es inexistente. Por tanto, se observa una diferencia entre el autoapareamiento de plantas con 1B y 2Bs, sin embargo, la prueba de X^2 no dio diferencias significativas en este estadio (FIGURA 71). Por otra parte, en **metafase I**, podemos observar cómo aumentan el número de células donde se observa autoapareamiento en plantas con 1B respecto a los observados en el estadio anterior. El autoapareamiento en células con 2Bs sigue siendo inexistente, por ello en este caso sí que existe una diferencia muy significativa entre el autoapareamiento de plantas con 1B y 2Bs ($\chi^2=17,18$, $p<0,001$, $g.l=1$) (FIGURA 71).

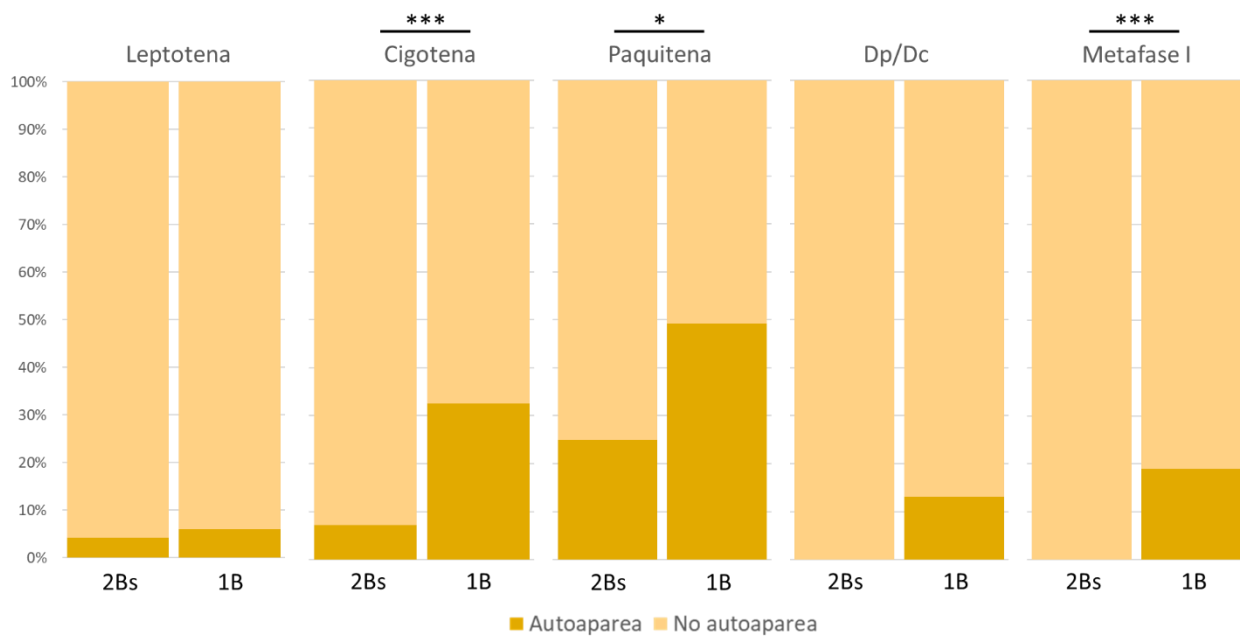


FIGURA 71. Gráfica donde se muestra el porcentaje de autoapareamiento del cromosoma accesorio en plantas con 2Bs y 1B, en cada una de las fases de la meiosis. El color más oscuro representa el porcentaje de cromosomas B que autoaparean, mientras que el color más claro representa el porcentaje de todos los cromosomas B que no muestran autoapareamiento. El grado de significación se muestra en la parte superior de cada gráfica representado por asteriscos (cigotena y metafase I $p < 0,001$, paquitena $p < 0,05$).

Con respecto a la segregación cromosómica en diadas y tétradas de plantas con 1B y 2Bs, se realizaron pruebas χ^2 de contingencia (homogeneidad), trabajando con un nivel de significación de $p < 0,001$. En este caso para realizar los análisis estadísticos, la frecuencia de núcleos con B de las plantas con 2Bs, se dividió a la mitad para poder equipararlo a las plantas con 1B. En **diadas**, hay una diferencia significativa muy grande entre el número de núcleos que portan cromosoma B ($\chi^2 = 16,3$, $p < 0,001$, $g.l=1$); siendo muy superior el número de núcleos de diada que portan B cuando las plantas tienen una dotación cromosómica de 2Bs (FIGURA 72). Esto es debido a que, al estar en dos dosis, no tener autoapareamiento y tener la presencia de un cromosoma homólogo con el que aparear, se facilita la segregación, evitando formación de micronúcleos y separación precoz de cromátidas, lo cual, no pasa cuando hay solo 1B. Por otra parte, en **tétradas**, tanto para plantas con 1B como con 2Bs, disminuyen los porcentajes de núcleos que portan cromosoma B, debido a la pérdida de Bs en forma de micronúcleos. Aun así, sigue habiendo una diferencia significativa muy grande, entre el número de núcleos con

cromosoma B, cuando este está en 1 o 2 dosis ($\chi^2 = 14,60$, $p < 0,001$, $g.l = 1$); siendo más de tres veces superior cuando hay 2Bs, que cuando hay una única copia (FIGURA 72).

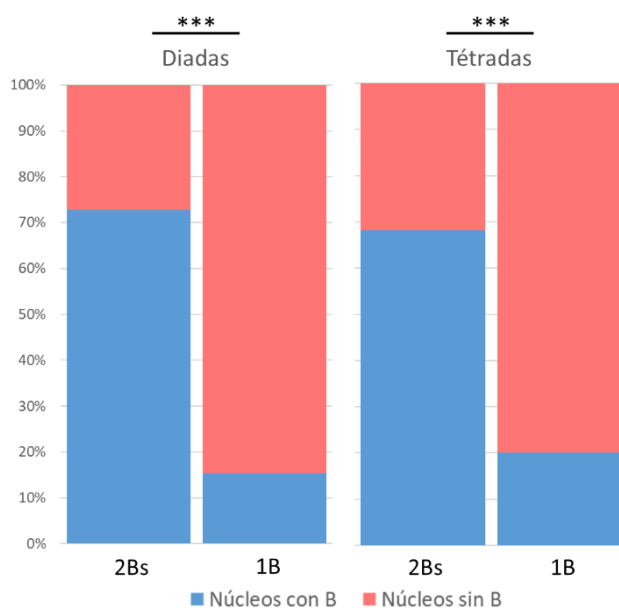


FIGURA 72. Gráfica donde se muestra el porcentaje de núcleos portadores al menos de un B (cromátida o cromosoma) en plantas con 2Bs y 1B, en los estadios meióticos de diadas y tétradas. El color azul representa el porcentaje de núcleos que portan B, mientras que el color rojo representa el porcentaje de núcleos que no tienen B. El grado de significación se muestra en la parte superior de cada gráfica representado por asteriscos ($p < 0,001$).

Análisis meiótico de plantas con 2adlso-BL

Se realizó un análisis de la planta 15-IJ-1-9 de cultivar Paldang, portadora de 2adlso-BL, con el fin de conocer el comportamiento en meiosis de los mismos y compararlo con el B estándar. Más concretamente, para conocer si la delección en uno de los brazos del isocromosoma afecta a su apareamiento, y por tanto al desarrollo de la meiosis y su posterior transmisión. Este análisis se realizó mediante FISH utilizando las sondas *ScCL11-1* y *D1100* en todas las etapas de la profase (excepto leptotena por falta de material) además de en metafase I, diadas y tétradas. La clasificación de las células observadas desde el inicio de cigotena hasta metafase I se realizó según el grado de apareamiento que mostraban los dos adlso-BL. Pudiendo encontrarse desapareados como univalentes, apareados por uno de los brazos o por ambos brazos (bivalentes abiertos o cerrados respectivamente a partir de paquitena hasta metafase I).

En **cigotena** se analizaron un total de 113 células; en 18 de ellas (15,93%) los 2adIso-BL se encontraron totalmente desapareados (FIGURA 73 A). Sin embargo, a diferencia de los cromosomas B, ya sea en una o dos dosis, en ninguno de los adIso-BL se observó autoapareamiento (TABLA 25). Por otro lado, dentro de las 95 células restantes los adIso-BL apareaban (84,07%) (TABLA 25); en 3 células (2,65%) los 2adIso-BL apareaban solo por el brazo deletado (FIGURA 73 B), mientras que en 21 células se observó que los adIso-BL (18,58%) apareaban únicamente por el brazo intacto (FIGURA 73 C). Por último, se observaron 71 células (62,84%) en las cuales se encontraron los adIso-BL apareando tanto por el brazo intacto, como por el brazo que ha sufrido la deleción distal (FIGURA 73 D) (TABLA 25). En ningún caso se vio apareamiento entre el brazo intacto y el brazo con la deleción.

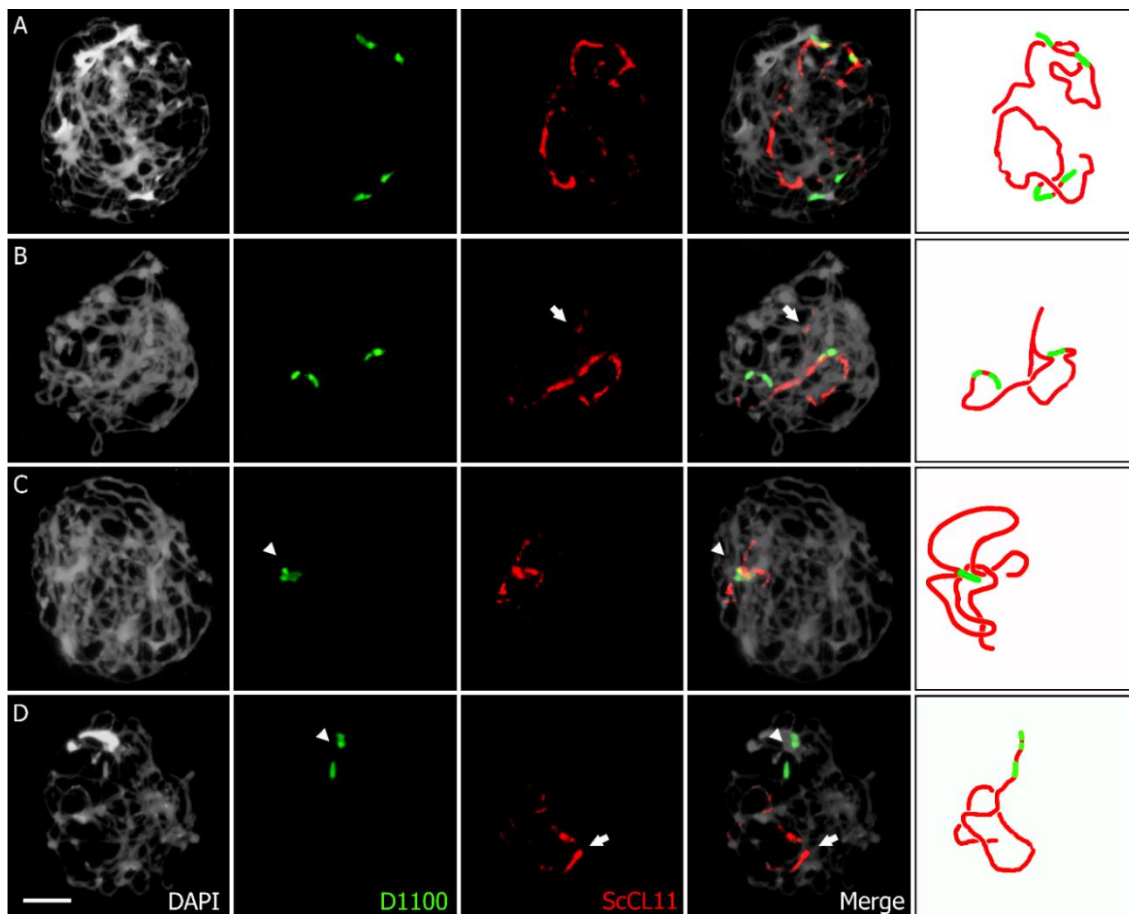


FIGURA 73. Meiocitos de centeno con 2 adIso-BL en **cigotena** hibridados mediante FISH con la sonda subteloamérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2 adIso-BL desapareados. **(B)** 2 adIso-BL apareado únicamente por el brazo deletado, quedando el brazo largo, marcado por *D1100*, desapareado. **(C)** 2 adIso-BL apareando únicamente por el brazo intacto, mientras que el brazo deletado queda desapareado. **(D)** 2adIso-BL apareados por ambos brazos y en toda su longitud. Las flechas indican el apareamiento del brazo deletado y las cabezas de flecha indican el apareamiento del brazo intacto del adIso-BL. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los adIso-BL. Barra 10µm.

Comportamiento 2adlso-BL	Desapareados	Apareados		
		Brazo delecionado	Brazo intacto	Ambos brazos
Cigotena	18	3	21	71
		95		
		113		
	15,93%	84,07%		
		2,65%	18,58%	62,84%

TABLA 25. Comportamiento de 2adlso-BL en cigotena.

En **paquitena** se analizaron un total de 116 meiocitos, de los cuales únicamente 8 (6,90%) tenían los dos adlso-BL desapareados (FIGURA 74 A). Al igual que en el estadio anterior, en ningún caso se observó a los adlso-BL autoapareando (TABLA 26). En las 108 células restantes (93,10%), los adlso-BL estaban apareando; en 3 células (2,59%) se encontraron apareados por el brazo delecionado (FIGURA 74 B), mientras que en 6 células (5,17%) se observó a los adlso-BL apareados por el brazo intacto (FIGURA 74 C). Por último, en las 99 células restantes (85,34%) se observó los dos adlso-BL apareados tanto por el brazo intacto como por el brazo delecionado (FIGURA 74 D) (TABLA 26). Al igual que en cigotena, en ningún caso se vio apareamiento entre el brazo intacto y el delecionado.

Comportamiento 2adlso-BL	Desapareados	Apareados		
		Brazo delecionado	Brazo intacto	Ambos brazos
Paquitena	8	3	6	99
		108		
		116		
	6,90%	93,10%		
		2,59%	5,17%	85,34%

TABLA 26. Comportamiento de 2adlso-BL en paquitena.

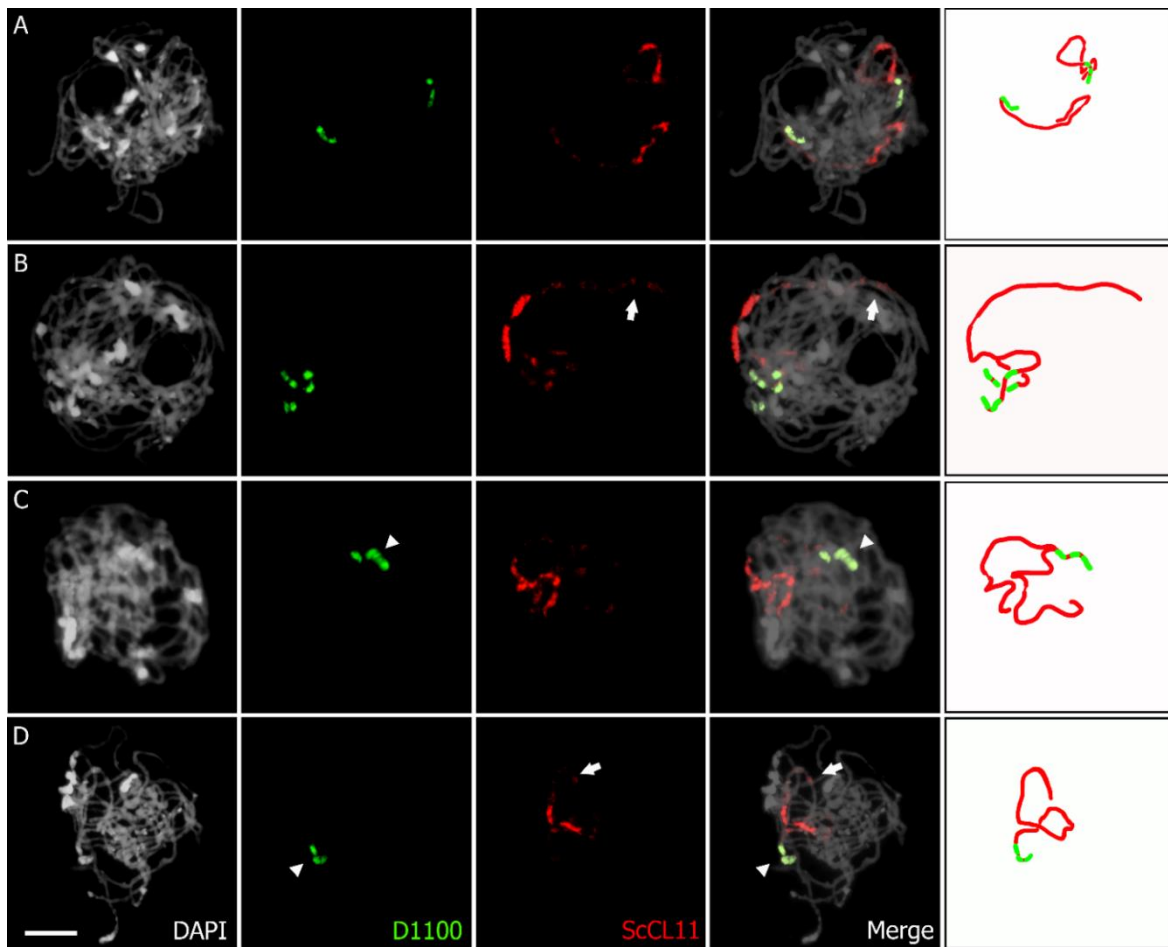


FIGURA 74. Meiocitos de centeno con 2adIso-BL en **paquitena** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2adIso-BL desapareados. **(B)** 2adIso-BL apareados únicamente por el brazo deleciónado, quedando el brazo intacto, marcado por *D1100*, desapareado. **(C)** 2adIso-BL apareados únicamente por el brazo intacto, mientras que el brazo deleciónado queda desapareado. **(D)** 2adIso-BL apareados por ambos brazos y en toda su longitud. Las flechas indican el apareamiento del brazo deleciónado y las cabezas de flecha indican el apareamiento del brazo intacto del adIso-BL. Los esquemas de la derecha representan la disposición espacial de los adIso-BL. Barra 10 μ m.

En **diplotena** y **diacinesis** se analizaron únicamente 25 células debido a la falta de anteras en esta fase. De estas células, en 5 (20%) se observaron los 2adIso-BL desapareados como univalentes (FIGURA 75 A); en las 20 células restantes (80%) los adIso-BL se encontraron apareados formando bivalentes (TABLA 27). Dentro de los bivalentes, encontramos 3 meiocitos (12%) en donde los adIso-BL formaban bivalentes abiertos con un quiasma en el brazo deleciónado (FIGURA 75 B), mientras que en 6 células (24%) los adIso-BL están apareados con un quiasma en el brazo intacto (FIGURA 75 C). Por último, en 11 células (44%) se observó que los 2 adIso-BL formaban bivalentes

cerrados, con un quiasma en cada uno de sus brazos (FIGURA 75 D) (TABLA 27). En ningún caso se vio un quiasma entre el brazo intacto/largo y el brazo deletado.

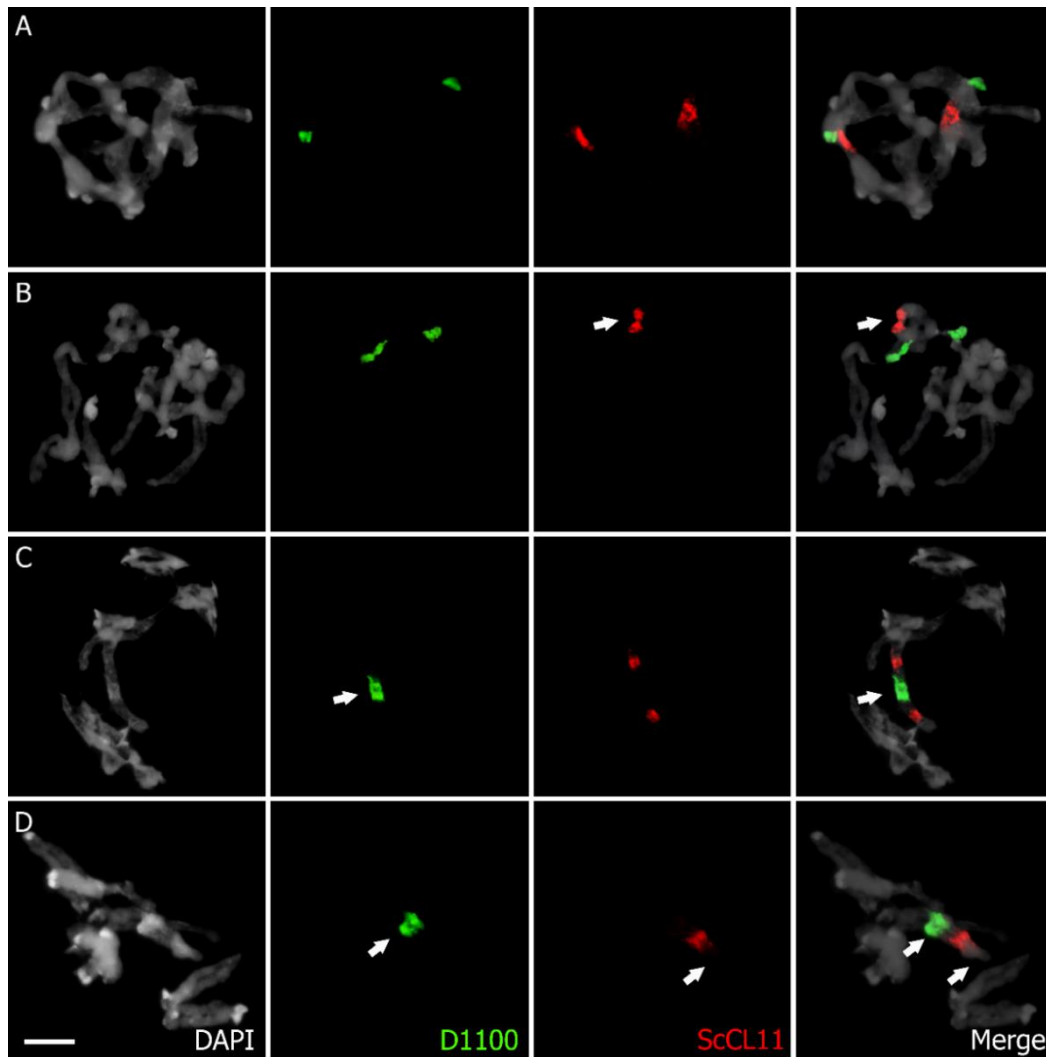


FIGURA 75. Meiocitos de centeno con 2adIso-BL en **diplotena** y **diacinesis** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2adIso-BL desapareados como univalentes. **(B)** 2adIso-BL con un quiasma en el brazo deletado. **(C)** 2adIso-BL con un quiasma en el brazo intacto. **(D)** 2adIso-BL formando un bivalente cerrado con un quiasma en cada brazo. Las flechas indican la localización de los quiasmas. Barra 10µm.

Comportamiento 2adIso-BL	Desapareados (univalentes)	Apareados (bivalentes)		
		Quiasma en brazo deletado	Quiasma en brazo intacto	Quiasma en ambos brazos
Diplotena Y Diacinesis	5	3	6	11
		20		
		25		
	20%	80%		
		12%	24%	44%

TABLA 27. Comportamiento de 2adIso-BL en diplotena y diacinesis.

En **metafase I**, se analizaron un total de 65 células portadoras de 2adlso-BL. En 19 de ellas (29,23%) los adlso-BL se encontraban como univalentes (FIGURA 76 A), mientras que en 46 células restantes (70,77%) los adlso-BL formaban bivalentes (TABLA 28). Dentro de estas últimas, en 20 células (30,77%) los adlso-BL se encontraban formando bivalentes abiertos con quiasma en el brazo delecionado (FIGURA 76 B), frente a las 18 células (27,69%) en las que los adlso-BL se encontraban formando bivalentes abiertos con quiasma en el brazo intacto (FIGURA 76 C). Los bivalentes cerrados, con quiasmas en ambos brazos del adlso-BL solo se observaron en 8 células (12,31%) (FIGURA 76 D) (TABLA 28). Igual que en diplotena y diacinesis, no se observaron univalentes en forma de anillo por apareamiento intracromosómico, ni se vieron bivalentes con formación de quiasmas entre el brazo delecionado y el brazo intacto.

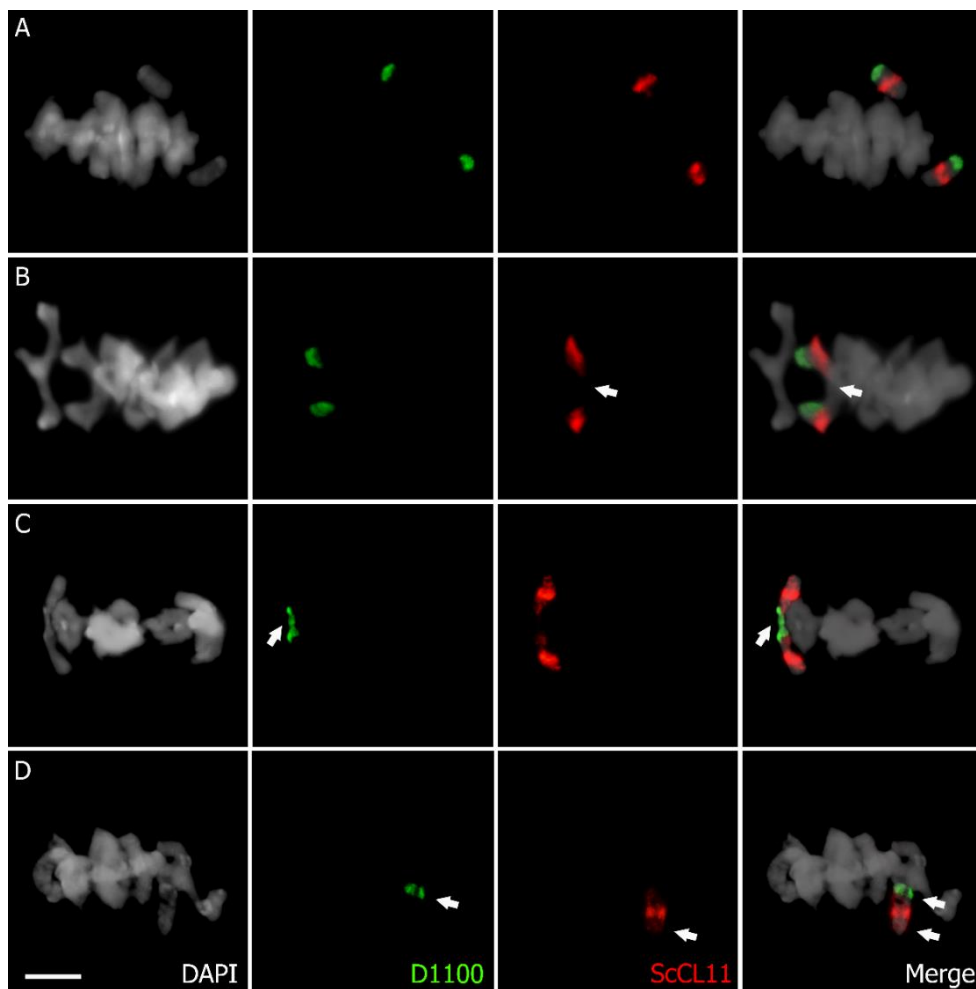


FIGURA 76. Meiocitos de centeno con 2adlso-BL en **Metafase I** hibridados mediante FISH con la sonda subteloamérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** 2adlso-BL como univalentes. **(B)** 2adlso-BL formando un bivalente abierto con un quiasma en el brazo delecionado. **(C)** 2adlso-BL formando un bivalente abierto con quiasma en la zona distal del brazo intacto. **(D)** 2adlso-BL formando un bivalente cerrado con quiasma en ambos brazos. Las flechas indican la localización de los quiasmas. Barra 10µm.

Comportamiento 2adlso-BL	Desapareados (univalentes)	Apareados (bivalentes)		
Metafase I	19	Quiasma en brazo delecionado	Quiasma en brazo intacto	Quiasma en ambos brazos
		20	18	8
		46		
	65			
	29,23%	70,77%		
		30,77%	27,69%	12,31%

TABLA 28. Comportamiento de 2adlso-BL en metafase I.

A continuación, se contabilizaron un total de 51 **díadas**. En ellas se analizó el comportamiento de los 102 adlso-BL y su presencia o ausencia en los 102 núcleos de diada contabilizados. En 85 ocasiones (83,33%), el adlso-BL había migrado a uno de los núcleos de la diada sin separar cromátidas (FIGURA 77 A). En ningún caso se observaron adlso-BL que no hubieran separado cromátidas y quedasen como micronúcleos (TABLA 29). Los 17 adlso-BL restantes (16,67%) habían separado cromátidas; en 13 ocasiones (12,75%) el adlso-BL había separado cromátidas y estas habían migrado a polos opuestos, incorporándose en ellos (FIGURA 77 B), mientras que los 4 adlso-BL restantes (3,92%) habían separado cromátidas quedando una de ellas retrasada, formando micronúcleos (FIGURA 77 C) (TABLA 29). Aun quedando cromátidas rezagadas y formando micronúcleos, de los 102 núcleos de diada estudiados, únicamente 1 núcleo no era portador de adlso-BL (0,98%), mientras que los 101 núcleos restantes (99,02%) poseían al menos una cromátida o uno de estos cromosomas (TABLA 29).

Comportamiento 2adlso-BL	No separa cromátidas	No separa cromátidas Y forma micronúcleos	Separa cromátidas	Separa cromátidas Y forma micronúcleos
Diadas	85	0	13	4
	85		17	
	51 diadas (102 núcleos y 102 adlso-BL)			
	83,33%	0%	12,75%	3,92%
	83,33%		16,67%	
	Núcleos de diada con adlso-BL		Núcleos de diada sin adlso-BL	
	101		1	
	99,02%		0,98%	

TABLA 29. Comportamiento de 2adlso-BL en diadas.

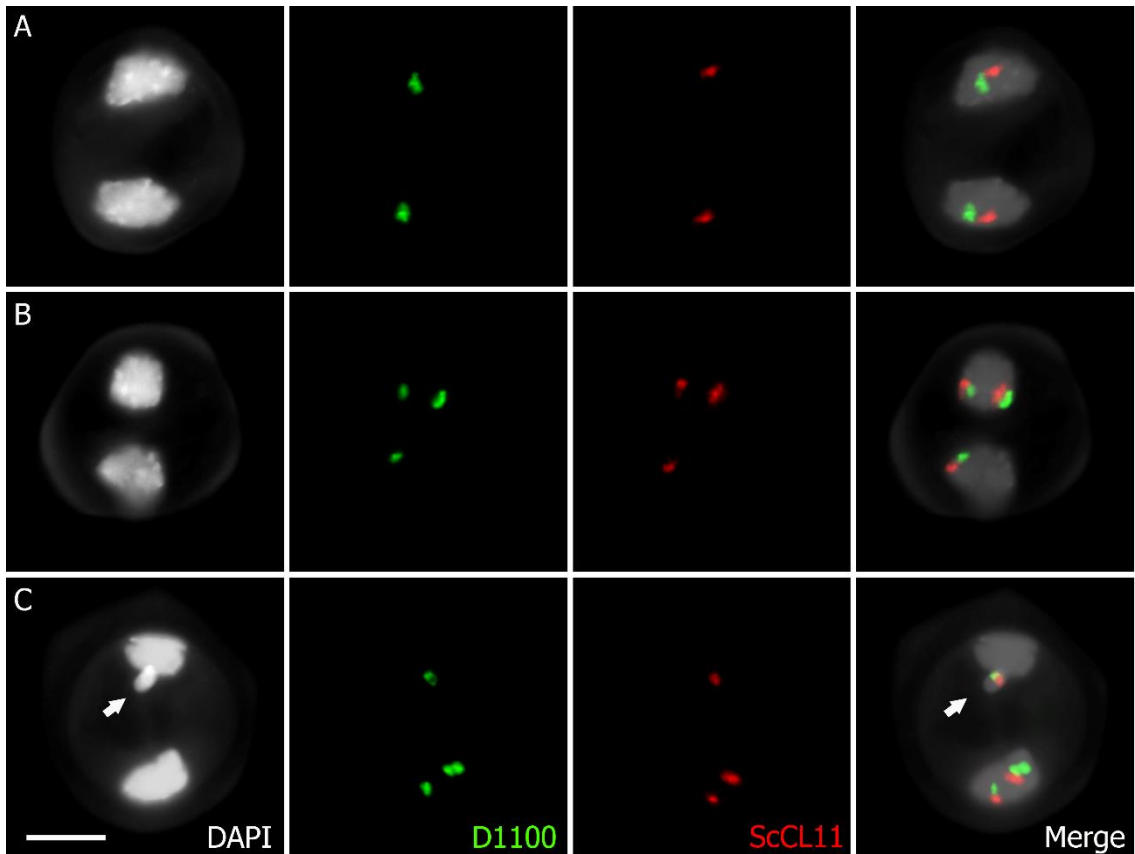


FIGURA 77. Meiocitos de centeno con 2adIso-BL en **diadas** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Los adIso-BL no separan cromátidas y migran a diferentes polos celulares. **(B)** Un adIso-BL separa cromátidas, y cada una de ellas migra a polos opuestos. **(C)** Un adIso-BL separa cromátidas y una de ellas queda como micronúcleo. Las flechas indican la localización de los micronúcleos. Barra 10 μ m.

En **tétradas**, se siguió el mismo criterio que en la fase anterior. Se analizaron un total de 89 tétradas, y en ellas se analizó el comportamiento de los 178 adIso-BL y su presencia en los 356 núcleos de tétrada. En 52 ocasiones (29,21%) el adIso-BL no había separado cromátidas, y había migrado con ambas juntas a uno de los núcleos de la tétrada (FIGURA 78 A). Igual que ocurre en diadas, en ningún caso se observaron adIso-BL que no hubieran separado cromátidas y quedasen como micronúcleos (TABLA 30). Por otra parte, en los 126 casos restantes (70,79%), el adIso-BL había separado cromátidas. Dentro de estos, en 118 casos (66,29%) el adIso-BL había separado cromátidas y estas se habían incorporado en núcleos distintos de la tétrada (FIGURA 78 B). Mientras que, en 8 ocasiones (4,50%), el adIso-BL había separado cromátidas, pero una de ellas apareció retrasada, no se integró en el núcleo y quedó como micronúcleo (FIGURA 78 C) (TABLA 30). Con respecto a la presencia del adIso-BL en los núcleos de

tétrada, se observó que únicamente 64 núcleos (17,98%) no eran portadores de este cromosoma accesorio, frente a los 292 núcleos (82,02%) que si lo portaban (TABLA 30).

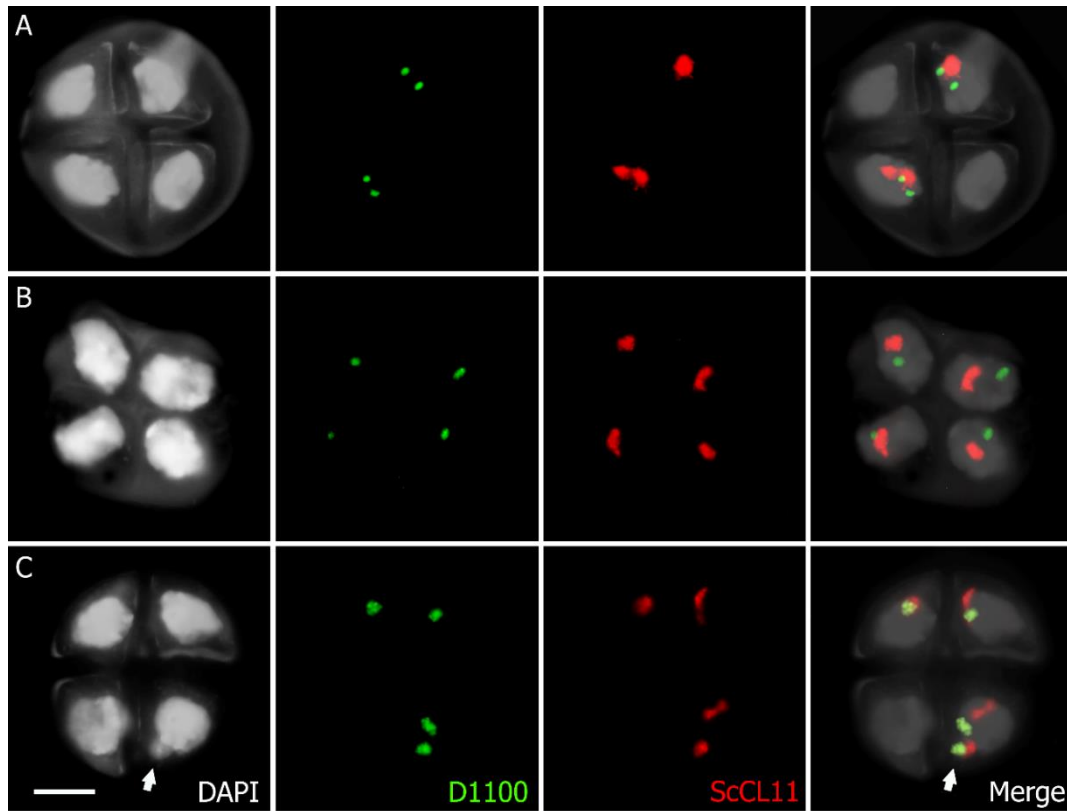


FIGURA 78. Meiocitos de centeno con 2 adIso-BL en **tétradas** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Los adIso-BL no separaron cromátidas y migraron a diferentes polos celulares. **(B)** Los adIso-BL separaron cromátidas y aparecen en los núcleos de la tétrada. **(C)** Ambos adIso-BL separaron cromátidas, quedando una de ellas como micronúcleo. Las flechas indican la localización de los micronúcleos. Barra 10 μ m.

Comportamiento 2adIso-BL	No separa cromátidas	No separa cromátidas Y forma micronúcleos	Separa cromátidas	Separa cromátidas Y forma micronúcleos
	52	0	118	8
	52		126	
	89 tétradas (356 núcleos y 178 adIso-BL)			
Tétradas	29,21%	0%	66,29%	4,50%
	29,21%		70,79%	
	Núcleos de tétrada con adIso-BL		Núcleos de tétrada sin adIso-BL	
	292		64	
	82,02%		17,98%	

TABLA 30. Comportamiento de 2adIso-BL en tétradas.

Comparación del comportamiento de plantas con 2Bs y 2adIso-BL

Una vez obtenidos todos los datos del comportamiento de los cromosomas accesorios en plantas con 2Bs y 2adIso-BL para cada una de las fases de la meiosis, vamos a comparar el apareamiento, formación de bivalentes y segregación en todo el proceso. El único estadio que no figura en la comparación es leptotena, puesto que no se han podido obtener datos del adIso-BL en dicha fase. Para comparar las muestras se realizaron pruebas χ^2 de contingencia (homogeneidad), trabajando con un nivel de significación de 0,05 o inferior.

En **cigotena**, observamos como existen diferencias muy significativas entre las plantas con 2Bs y 2adIso-BL ($\chi^2=36,11$, $p<0,001$, $g.l=3$), pudiendo observarse como el apareamiento es mayor entre los dos adIso-BL, principalmente en la categoría de apareados por ambos brazos. También cabe reseñar que el apareamiento por el brazo largo/intacto es mayor que por el brazo corto/delecionado en ambos tipos de cromosoma (FIGURA 79). En **paquitena** también se puede observar como hay diferencias significativas en el apareamiento del cromosoma accesorio en plantas con 2Bs y 2adIso-BL ($\chi^2=7,98$, $p<0,05$, $g.l=3$), siendo el apareamiento del adIso-BL superior al del cromosoma B. Con respecto a los cromosomas apareados únicamente por el brazo largo/intacto o corto/delecionado, ocurre lo mismo que en cigotena, siendo más frecuente observar apareamientos por el brazo largo que por el brazo corto (FIGURA 79). En **diplotena** y **diacinesis** no se observaron diferencias significativas entre el apareamiento de estos cromosomas en plantas con 2Bs y 2adIso-BL, lo cual es debido al bajo número de células observadas en las plantas con 2adIso-BL. Sin embargo, es posible observar que en las plantas con 2adIso-BL se mantiene la tendencia, siendo superior el número de bivalentes cerrados con quiasma en ambos brazos, seguido de los bivalentes abiertos con quiasma en el brazo intacto. Por el contrario, se puede apreciar como en las plantas con 2Bs la tendencia cambia, siendo los bivalentes abiertos con quiasma en el brazo largo los más abundantes. Esto puede ser debido a que el B tiene un brazo corto de un tamaño muy reducido, lo cual dificulta la formación del quiasma en dicho brazo (FIGURA 79). En **metafase I**, se pueden apreciar diferencias muy significativas en la formación de bivalentes entre los 2 cromosomas B y los 2adIso-BL, siendo superior la frecuencia de bivalentes del adIso-BL ($\chi^2=51,01$, $p<0,001$, $g.l=3$). Se puede observar

como la mayoría de los bivalentes formados en el B, están unidos mediante un quiasma en el brazo largo, sin embargo, en el adIso-BL la frecuencia de bivalentes con quiasma en el brazo corto/delecionado y con quiasma en el brazo intacto es casi igual, y representan la mayoría de los bivalentes observados (FIGURA 79).

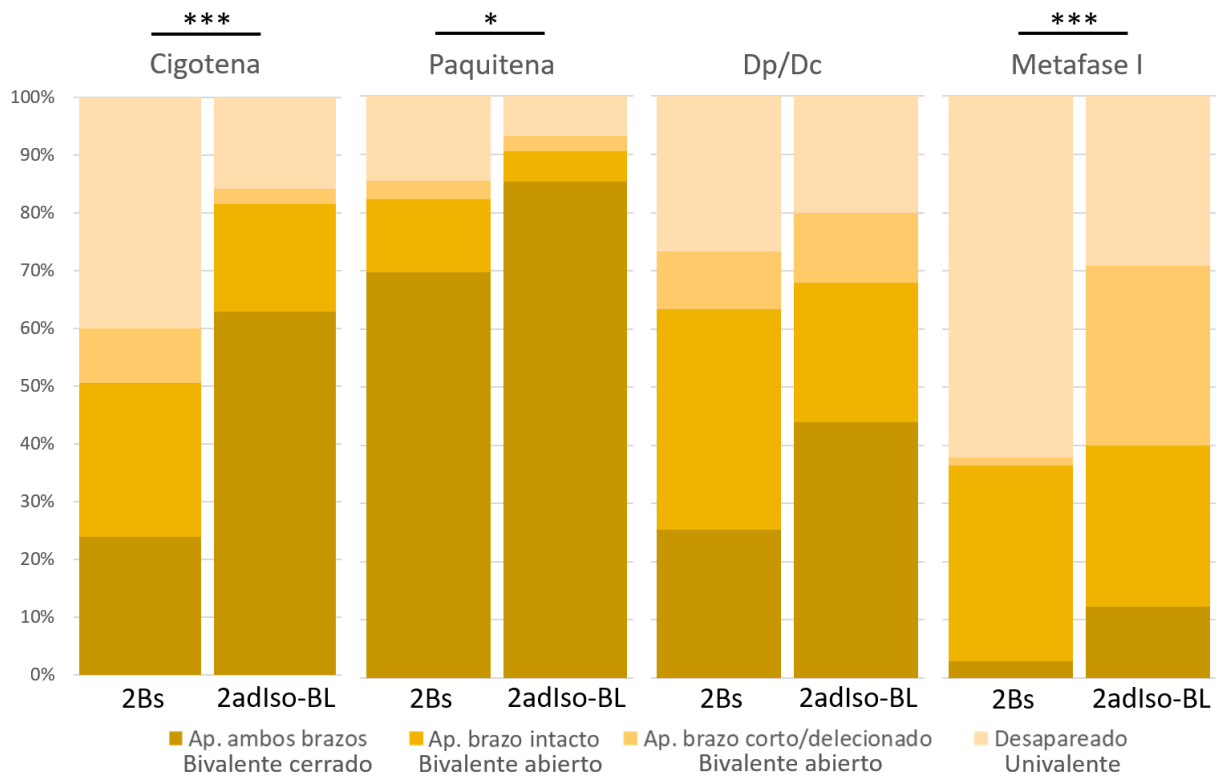


FIGURA 79. Gráfica donde se muestra el porcentaje de apareamiento (cigotena y paquitena) y formación de bivalentes (diplotena-diacinesis y metafase I) de los cromosomas accesorios en plantas con 2Bs y 2 adIso-BL. Del color más oscuro al más claro se representa el porcentaje de cromosomas B que aparean por ambos brazos o forman bivalentes cerrados, el porcentaje de cromosomas que aparean por el brazo largo/intacto, el porcentaje de cromosomas que aparean por el brazo corto/delecionado y el porcentaje de cromosomas que están desapareados o univalentes respectivamente. El grado de significación se muestra en la parte superior de cada gráfica representado por asteriscos (cigotena y metafase I $p < 0,001$, paquitena $p < 0,05$).

Para tener más información sobre el comportamiento de estos cromosomas accesorios en plantas con 2Bs y 2adIso-BL, se decidió realizar una comparación con plantas con 2 Iso-BL normales; para ello se realizó un análisis del comportamiento de 2 Iso-BL en metafase I, estadio que permite ver los resultados de la profase I. De un total de 62 células analizadas, se observaron 33 (53,23%) en las que los Iso-BL se encontraban como univalentes; dentro de estas se pudieron diferenciar 10 (16,13%) en las que los Iso-BL no tenían quiasma y se comportaban como univalentes normales (FIGURA 80 A);

por el contrario, se observaron 23 células (37,10%) en las que los Iso-BL tenían un quiasma intracromosómico entre ambos brazos, formando univalentes en anillo (FIGURA 80 B) (TABLA 31). En las 29 células (46,77%) restantes, los Iso-BL se encontraban formando bivalentes. Dentro de este grupo se pudieron observar 16 células (25,80%) en las que los Iso-BL estaban formando bivalentes abiertos, con un quiasma distal en uno de sus brazos (FIGURA 80 C); al contrario que en el caso de Bs y adIso-BL, en el Iso-BL ambos brazos son idénticos y no se ha podido diferenciar cuando el quiasma se producía en uno o en otro. Por otro lado, se encontraron 13 células (20,97%) en las que los Iso-BL formaban bivalentes cerrados con quiasmas tanto en las regiones distales como en las intersticiales de ambos brazos (FIGURA 80 D) (TABLA 31).

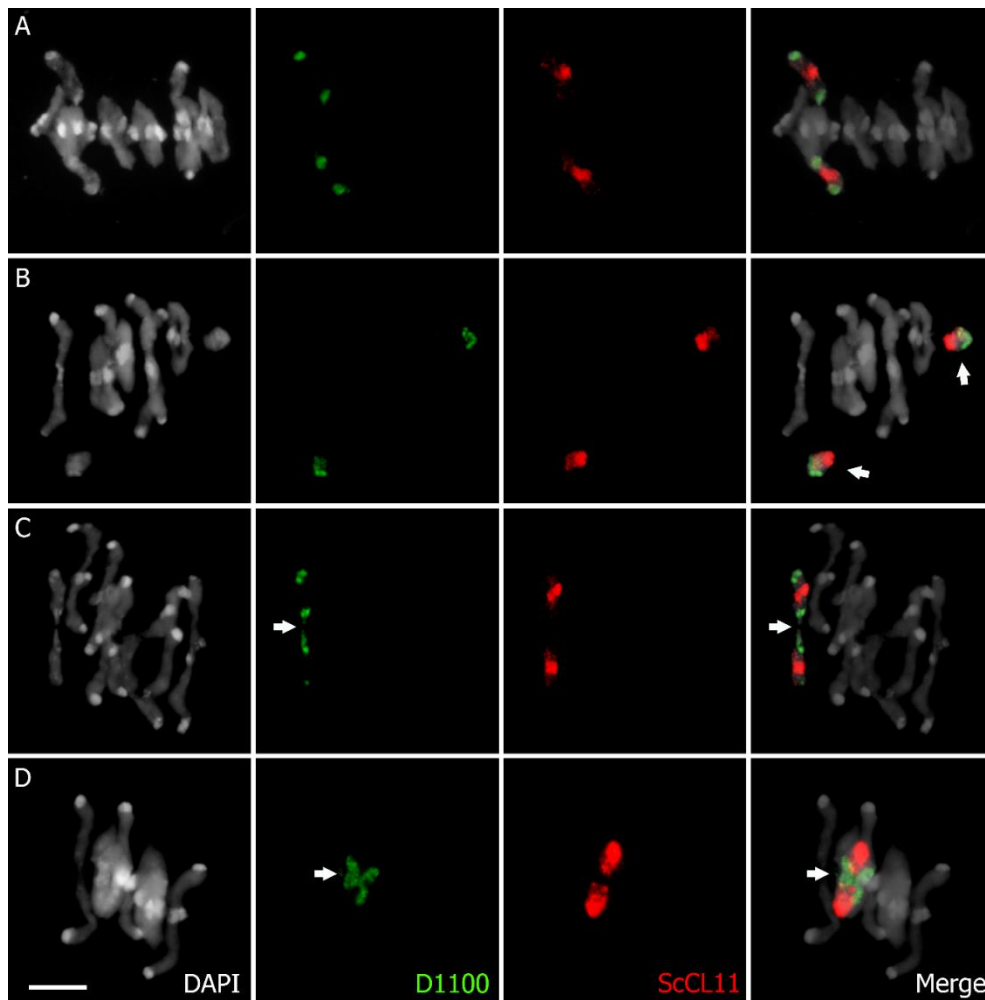
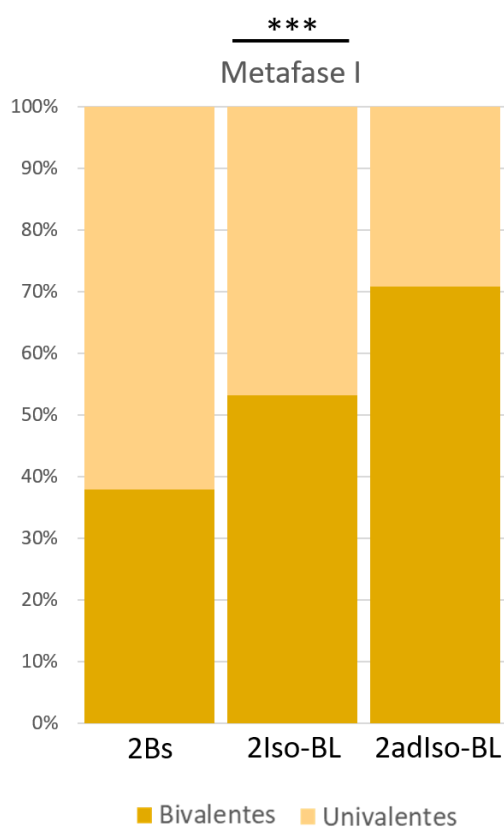


FIGURA 80. Meiocitos de centeno con 2Iso-BL en **Metafase I** hibridados mediante FISH con la sonda subteloamérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Los 2Iso-BL se encuentran como univalentes. **(B)** 2Iso-BL como univalentes en anillo con un quiasma intracromosómico. **(C)** 2Iso-BL formando un bivalente abierto con un quiasma en la región distal de uno de sus brazos. **(D)** 2Iso-BL formando un bivalente cerrado con quiasmas intersticiales en ambos brazos. Las flechas indican la localización de los quiasmas. Barra 10µm.

Comportamiento 2Iso-BL	Desapareados		Apareados (bivalentes)	
	Univalentes	Univalentes en anillo	Quiasma en un brazo	Quiasma en ambos brazos (distal + intersticial)
Metafase I	10	23	16	13
	33		29	
	62			
	53,23%		46,77%	
	16,13%	37,10%	25,80%	20,97%

TABLA 31. Comportamiento de 2Iso-BL en metafase I.

Los resultados obtenidos nos permiten observar que la frecuencia de formación de bivalentes del adIso-BL es la más alta, notablemente más alta que la del Iso-BL y el doble que la del B (FIGURA 81). La diferencia encontrada entre el adIso-BL y el Iso-BL se debe a la ausencia del apareamiento intracromosómico del adIso-BL, pues al ser sus brazos diferentes se evita la formación de univalentes en anillo. Esto se comprobó, al igual que en comparaciones anteriores, mediante una prueba del χ^2 de contingencia (homogeneidad) ($\chi^2=14,01$, $p<0,001$, $g.l=2$) (FIGURA 81). Estas diferencias significativas en la formación de bivalentes sugieren que el adIso-BL podría segregarse mejor, y por tanto, transmitirse mejor que el B y el Iso-BL a la siguiente generación.



Metafase I	Univalentes	Bivalentes	N
2Bs	85	52	137
2Iso-BL	29	33	62
2adIso-BL	19	46	65

FIGURA 81. Gráfica donde se muestra el porcentaje de univalentes y bivalentes en metafase I de 2Bs, 2Iso-BL y 2adIso-BL. El color más oscuro representa el porcentaje de bivalentes, mientras que el color más claro representa el porcentaje de univalentes. El grado de significación se muestra en la parte superior de la gráfica representado por asteriscos ($p<0,001$).

Continuando con la comparación entre plantas con 2Bs y 2adlso-BL, se realizó un análisis de la segregación cromosómica en diadas y tétradas, para ello se realizaron pruebas χ^2 de contingencia (homogeneidad), trabajando con un nivel de significación de $p < 0,001$. En **diadas**, hay una diferencia significativa muy grande entre el número de núcleos que portan ambos tipos de cromosomas accesorios, siendo para los 2adlso-BL el 99,02% frente al 72,80% de los 2B ($\chi^2=29,33$, $p < 0,001$, $g.l=1$) (FIGURA 82). En **tétradas** la diferencias también son significativas ($\chi^2=16,79$, $p < 0,001$, $g.l=1$), estando los adlso-BL presentes en el 82,02% de los núcleos, frente al 68,15% en el que están presentes los B (FIGURA 82). Estas diferencias son debidas probablemente a que el adlso-BL tiene un menor porcentaje de univalentes en metafase I, y por tanto, una menor formación de micronúcleos. Este hecho apoya las observaciones previas, confirmando que el adlso-BL segrega mejor y podría transmitirse mejor a la descendencia.

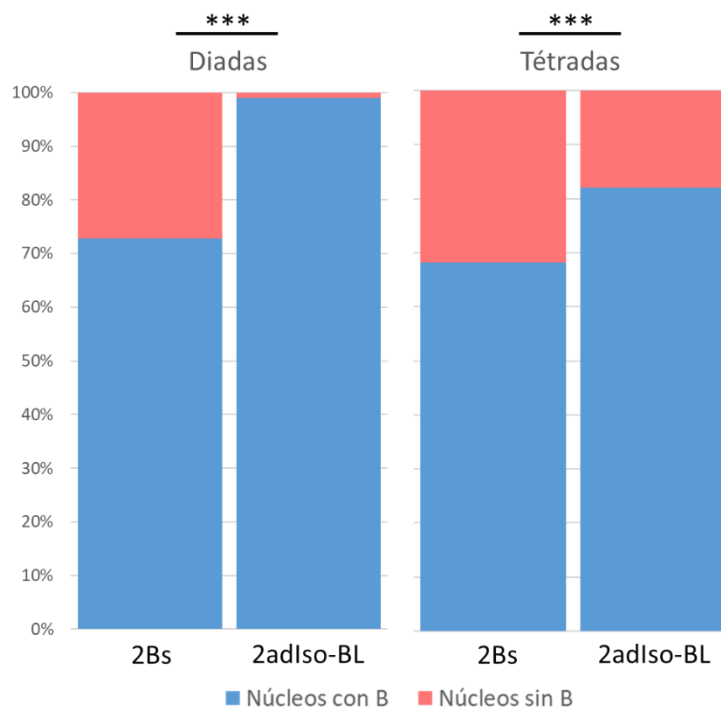


FIGURA 82. Gráfica donde se muestra el porcentaje de núcleos portadores al menos de un cromosoma accesorio (cromátida o cromosoma) en plantas portadoras de 2Bs y 2adlso-BL, en los estadios meióticos de diadas y tétradas. El color azul representa el porcentaje de núcleos que portan cromosoma accesorio, mientras que el color rojo representa el porcentaje de núcleos que no lo tienen. El grado de significación se muestra en la parte superior de cada gráfica y estadio representado por asteriscos ($p < 0,001$).

NUEVAS VARIACIONES CROMOSÓMICAS

adIso-BL translocado

Como se ha visto en los análisis previos, el adIso-BL parece ser el cromosoma accesorio que presenta una mejor segregación y podría transmitirse mejor a la descendencia. Por ese motivo se decidió hacer cruzamientos para obtener más plantas portadoras únicamente de 2adIso-BL. Se cruzó la planta 2016-IsoCR1-3 (FIGURA 45) con plantas con OBs para seleccionar en su descendencia plantas que portaran solo el adIso-BL; las plantas descendientes que tenían un adIso-BL se autofecundaron y en el año 2018 se obtuvo de nuevo una planta portadora de 2adIso-BL (denominada 18IsoT6-4). Esta planta se analizó mediante FISH con las sondas *ScCL11* y *D1100* para completar los análisis previos.

Al analizar las hibridaciones *in situ* se apreciaron dos señales de *D1100* no esperadas, de un tamaño muy reducido, que se encontraban localizadas en los extremos distales de dos cromosomas A diferentes (FIGURA 83). Esta nueva localización de *D1100*, indica que se ha debido producir una translocación entre los adIso-BL y los cromosomas A. Además, se observó que el comportamiento de los adIso-BL translocados en metafase I, no era el mismo que el observado para plantas con 2adIso-BL en análisis previos. De las 93 células de esta planta analizadas en metafase I, en 53 de ellas (56,99%) los adIso-BL aparecían desapareados como univalentes, mientras que en las 40 células restantes aparecían formando bivalentes (43,01%) (TABLA 32). Dentro de las células en las que los adIso-BL estaban formando bivalentes, se observaron 18 células (19,35%) en las que los adIso-BL formaban un bivalente abierto con un quiasma en el brazo delecionado, 13 células (13,98%) en las que formaban bivalentes abiertos con un quiasma en el brazo largo y 9 células (9,68%) en las que formaban bivalentes cerrados con quiasmas en ambos brazos (TABLA 32). Nunca se observó formación de quiasmas entre el brazo con la translocación y el delecionado.

Comportamiento 2adIso-BL translocados	Desapareados (Univalentes)	Apareados (bivalentes)		
		Quiasma brazo delecionado	Quiasma brazo con translocación	Quiasma en ambos brazos
Metafase I	53	18	13	9
		40		
		93		
	56,99%	43,01%		
		19,35%	13,98%	9,68%

TABLA 32. Comportamiento de 2adIso-BL translocados en metafase I.

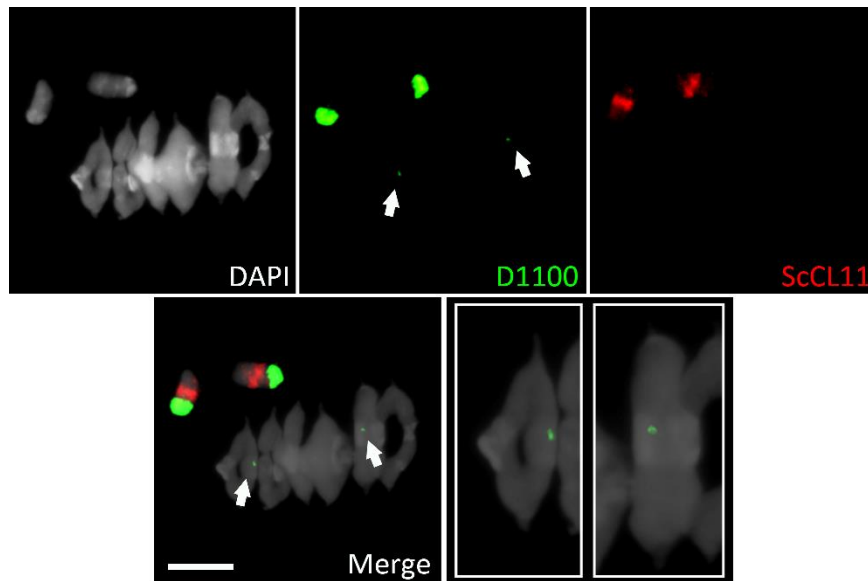
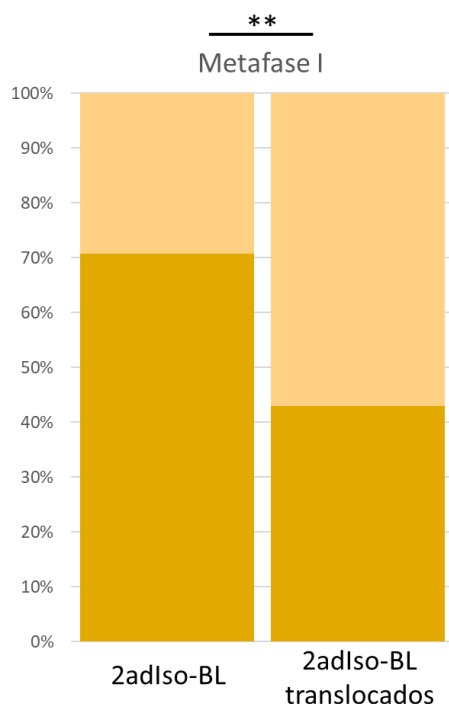


FIGURA 83. Meiocitos de centeno con 2adIso-BL translocados en **Metafase I** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. Se observa como hay dos translocaciones en las regiones distales de dos cromosomas A diferentes. Las flechas indican la localización de las translocaciones. Barra 10 μ m.

Los resultados de las plantas con 2adIso-BL translocados se compararon con los resultados obtenidos previamente en la planta 15-IJ-1-9, portadora de 2adIso-BL, mediante una prueba de χ^2 de contingencia (homogeneidad); confirmando que existen diferencias significativas entre el comportamiento de los adIso-BL de la planta 15-IJ-1-9 y los adIso-BL translocados de la planta 18IsoT6-4 ($\chi^2=12,455$, $p<0,01$, g.l=3) (FIGURA 84). Por tanto, esta nueva reorganización cromosómica entre los adIso-BL y los cromosomas A, está afectando al apareamiento y a la formación de bivalentes de los adIso-BL.



Metafase I	Univalentes	Bivalentes	N
2adIso-BL	19	46	65
2adIso-BL translocados	53	40	93

FIGURA 84. Gráfica donde se muestra el porcentaje de univalentes y bivalentes en metafase I de 2adIso-BL y 2adIso-BL translocados. El color más oscuro representa el porcentaje de bivalentes, mientras que el color más claro representa el porcentaje de univalentes. El grado de significación se muestra en la parte superior de la gráfica representado por asteriscos ($p < 0,01$).

Para concluir el análisis del adIso-BL translocado, se analizaron las raíces de las plantas 18IsoT6-4 (donde se observó por primera vez) y 19-2T-1-24 (una de sus descendientes), ambas del cultivar Paldang, mediante la técnica FISH con las sondas *D1100* y *ScCL11*.

En el análisis de la planta 18IsoT6-4 se pueden observar los 2adIso-BL, además de las translocaciones en dos cromosomas A (FIGURA 85 A). Por tanto, podemos confirmar que las translocaciones proceden de los cruzamientos realizados en el año 2017. Por otra parte, en el análisis de la planta descendiente 19-2T-1-24, no se aprecia ningún adIso-BL, sin embargo, se mantienen las translocaciones en dos A diferentes (FIGURA 85 B). Estos resultados permiten confirmar que la translocación de los adIso-BL está afectando a su transmisión, lo cual viene determinado principalmente por el número de bivalentes en metafase I y el apareamiento previo, que desciende con respecto a los adIso-BL sin translocación.

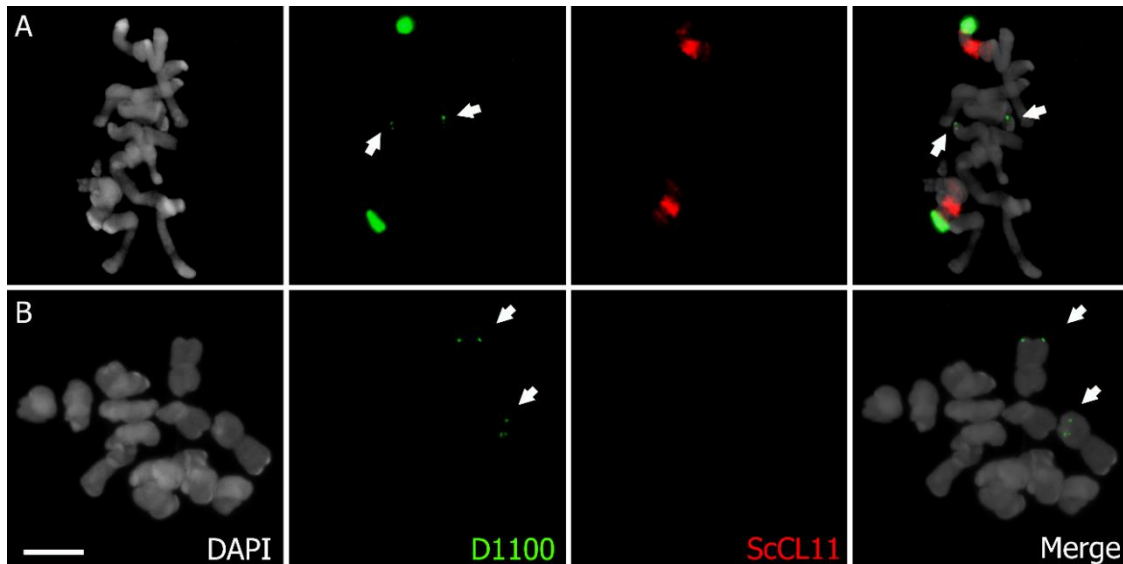


FIGURA 85. Células del meristemo apical radicular de las plantas de centeno 18IsoT6-4 y 19-2T-1-24; hibridadas mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Metafase de la planta 18IsoT6-4, donde se pueden apreciar 2adIso-BL translocados y la translocación en As. **(B)** Metafase de la planta 19-2T-1-24 donde se puede apreciar la translocación en dos As. Las flechas indican la localización de las translocaciones en los A. Barra 10 μ m.

Cromosoma B con inversión paracéntrica

El estudio del comportamiento de un cromosoma B fue llevado a cabo en la planta 17-4-10, sin embargo, no fue la única planta utilizada para este estudio. También se usó la planta 17-6-14, portadora de un cromosoma B. Esta planta fue descartada para el experimento, debido a que el B que portaba tenía un patrón de sondas diferente al de los observados previamente. Por ese motivo se decidió hacer un análisis estructural de este cromosoma mediante FISH con las sondas *ScCL11-1* y *D1100* en los estadios de leptotena, cigotena, paquitena, diplotena/diacinesis y metafase I con el fin de conocer más en profundidad la estructura del mismo.

En **leptotena**, se pudo apreciar que el brazo corto del B, la zona centromérica y las regiones pericentroméricas de ambos brazos parecen similares a las observadas previamente en un B estándar. Sin embargo, en el brazo largo parece haber diferencias; se puede observar como la sonda más distal es *D1100*, pero no aparece únicamente en la región subtelomérica del brazo largo, sino que también se encuentra en una región intersticial del mismo, donde está intercalada con las señales de *ScCL11* (FIGURA 86 A), lo que no ocurre en el cromosoma B normal.

En **cigotena**, se observa que ha tenido lugar algún tipo de reordenamiento cromosómico en la parte intersticial del brazo largo del B. Al igual que en leptotena se puede observar como una señal de *D1100* se encuentra en la mitad del brazo largo, quedando las otras dos señales de *D1100* en la región subteloamérica. Es decir, que se ha producido una inversión paracéntrica, que parece haber incluido parte del bloque 4, el cual ha quedado dividido; quedando una parte en la zona intersticial del brazo largo y la otra parte en la región distal del mismo, junto con las otras dos señales de *D1100* correspondientes a los bloques 5 y 6 (FIGURA 86 B y FIGURA 87). La observación de la estructura de este cromosoma es compleja, puesto que en muchas células el B se encuentra autoapareando de manera que la región subteloamérica marcada por *D1100* aparece apareada con las regiones pericentroméricas.

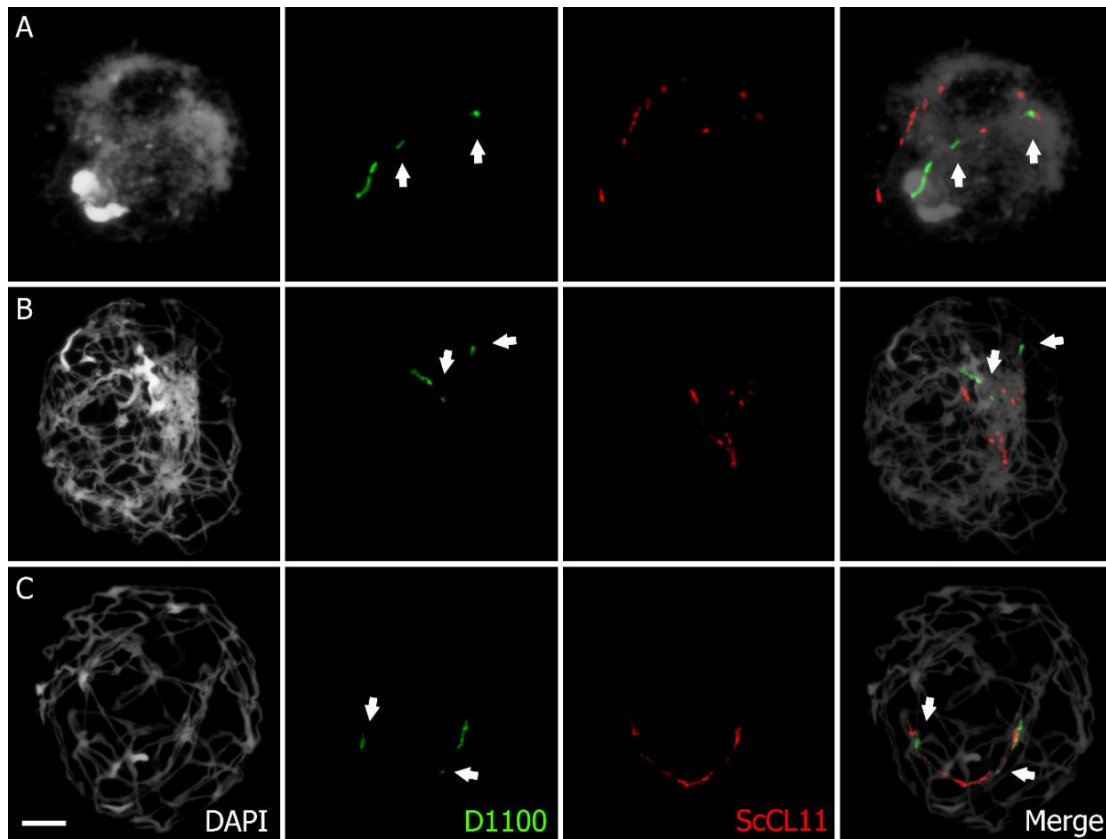


FIGURA 86. Meiocitos de centeno con un cromosoma B con una inversión paracéntrica, hibridados con la sonda subteloamérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Leptotena donde se puede apreciar como una porción del bloque 4 se localiza en zonas intersticiales del brazo largo. **(B)** Cigotena. **(C)** Paquitena donde el cromosoma B con la inversión autoaparea, adoptando una configuración donde la región distal del brazo largo aparea con las regiones centromérica y pericentromérica. Las flechas indican la localización de las dos partes del bloque 4 separadas tras la inversión. Barra 10 μ m.

En **paquitena**, en muchas células observadas el B aparece autoapareado, con la región distal marcada por *D1100* apareada con las regiones centromérica y pericentroméricas marcadas por *ScCL11* (FIGURA 86 C). Similar a la configuración A, observada en los univalentes del cromosoma accesorio en el análisis de la sinapsis de plantas con 1B (TABLA 20 y FIGURA 64 A).

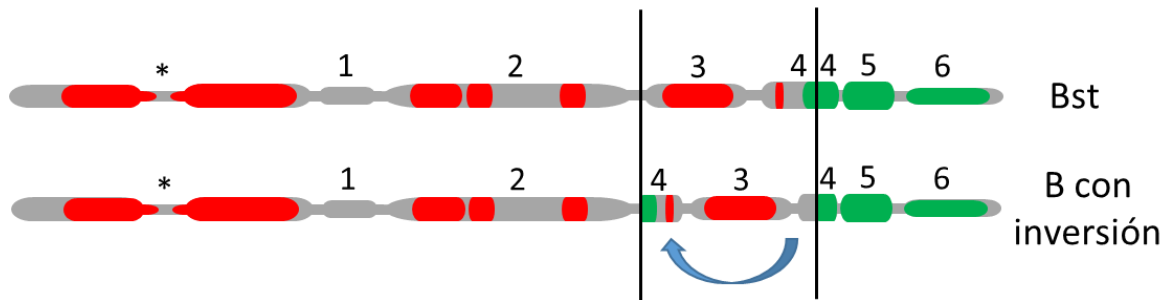


FIGURA 87. Esquemas de un cromosoma B estándar y un cromosoma B con inversión. El color rojo representa las señales de *ScCL11*, el verde las de *D1100* y las líneas negras las zonas por las que tuvieron que producirse las roturas que produjeron la inversión que afectó al bloque 3 y parte del bloque 4. Los bloques heterocromáticos están indicados y el centrómero está representado por un asterisco.

En **diplotena** y **diacinesis**, se pueden observar células en las que el B aparece estirado, con las regiones centromérica y pericentroméricas marcadas por *ScCL11* en un extremo y la región subteloamérica del brazo largo marcado por *D1100* en el otro, sin aparentes signos de autoapareamiento (FIGURA 88 A). Sin embargo, en otras células el B aparece retorcido, encontrándose las señales de *ScCL11* y *D1100* entremezcladas, con señales de *D1100* en las regiones intersticiales del brazo largo, lo cual puede ser debido a la formación de un quiasma intracromosómico o algún tipo de interacción física entre los extremos del propio cromosoma (FIGURA 88 B). Aparentemente estas observaciones estarían en concordancia con los datos obtenidos previamente en los univalentes para plantas con un cromosoma B.

En **metafase I**, las células observadas permiten confirmar los resultados obtenidos previamente en diplotena y diacinesis. En esta fase se pueden observar células en las que el cromosoma B aparece estirado, con las regiones centroméricas y pericentroméricas en un extremo y la región distal del brazo largo en el otro (FIGURA 88 C). Pero también se pueden observar células en las que el B aparece replegado sobre sí mismo con las señales de *ScCL11* y *D1100* cruzadas o intercaladas, pudiéndose observar en muchos casos la señal intersticial de *D1100* (FIGURA 88 D), lo cual pone de manifiesto

la posible existencia de un quiasma intracromosómico en este cromosoma B con una inversión paracéntrica.

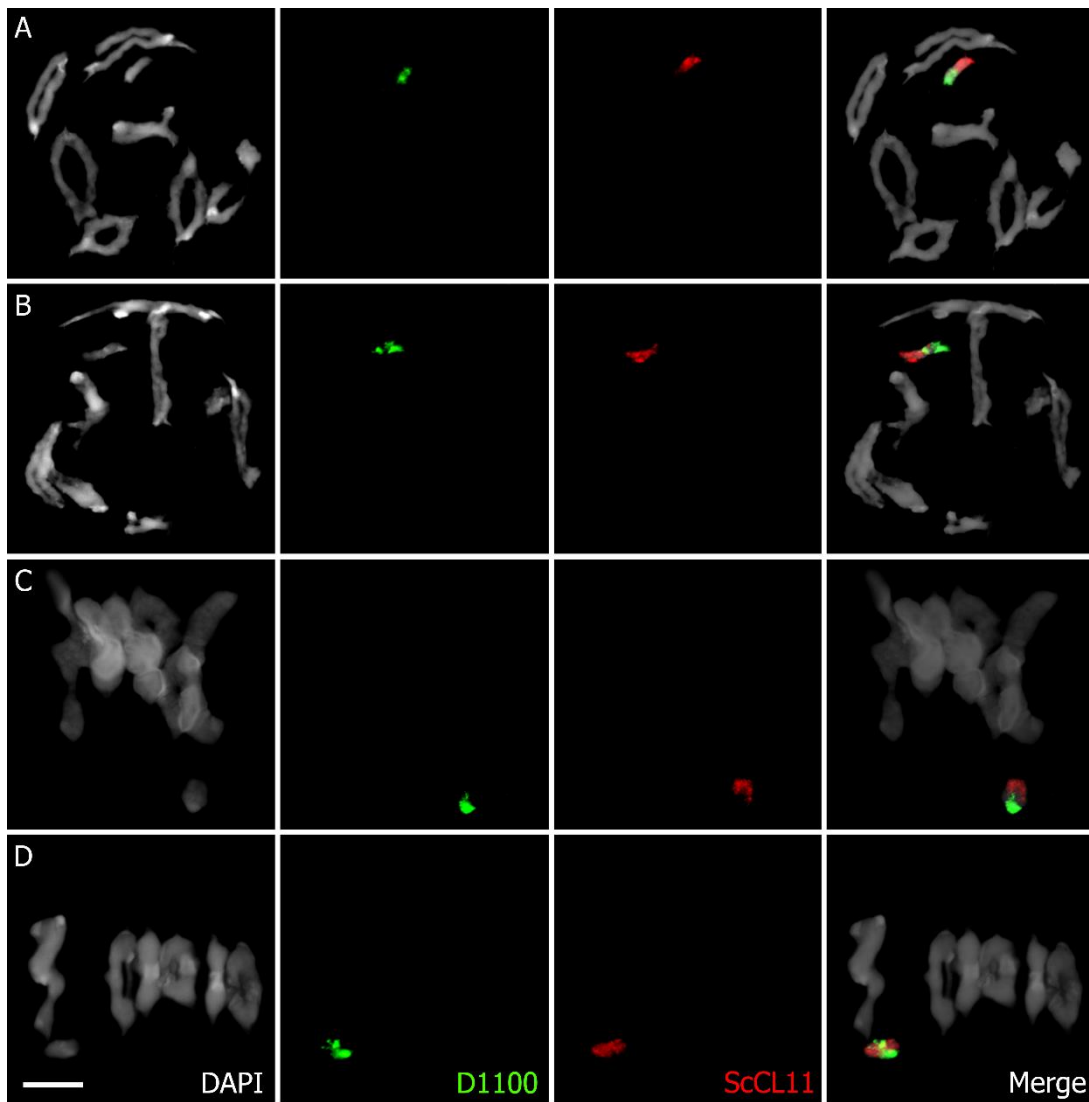


FIGURA 88. Meiocitos de centeno con 1B con una inversión en **Diplotena/Diacinesis** y **Metafase I** hibridados mediante FISH con la sonda subtelomérica *D1100* y la sonda centromérica y pericentromérica *ScCL11*. **(A)** Diacinesis donde se puede apreciar 1B invertido sin autoapareamiento. **(B)** Diplotena donde se puede apreciar un B invertido con autoapareamiento. **(C)** Metafase I con un B invertido sin autoaparear. **(D)** Metafase I con un B invertido autoapareando. Barra 10µm.

DISCUSIÓN



En el presente estudio, gracias a la menor condensación cromosómica que se da en paquitena, se ha podido desarrollar un modelo esquemático de la disposición de los bloques heterocromáticos del cromosoma B de centeno (FIGURA 15). Muy similar al modelo realizado por Carlson y Chou en 1981 para estudiar la no disyunción del cromosoma B de maíz (FIGURA 3); otro modelo similar fue el desarrollado por Lamb *et al.* en 2005, donde esquematiza la distribución relativa de secuencias repetidas en el cromosoma de maíz. Además, nuestro modelo cromosómico basado en los bloques de heterocromatina de las variedades Paldang y Puyo es casi igual a el patrón de cromómeros descritos por Lima-de-Faria (1963) para un cromosoma B de Corea (FIGURA 4 y 15 C).

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CROMOSOMA B DE CENTENO

Anteriormente, González-García en (2011) utilizó centeno de la variedad Imperial y líneas de trigo que portaban cromosomas de centeno, y observó que todas las secuencias repetidas del centrómero y de los pericentrómeros obtenidas en trigo, estaban también presentes en los As de centeno. En el presente estudio, se ha observado que todas las secuencias centroméricas y pericentroméricas de los As de centeno también están presentes en las regiones centroméricas y pericentroméricas del B de esta especie. Este hecho era esperado, debido a que los cromosomas B, derivan de los cromosomas A, por tanto, tienen las mismas secuencias o secuencias muy similares (Martis *et al.*, 2012). En los As, estas secuencias repetidas están localizadas a lo largo del centrómero y pericentrómeros, con diversas variaciones en longitud y en intensidad entre ellas. Sin embargo, en el cromosoma B, ha habido una acumulación evolutiva de estas repeticiones, que han resultado en unas regiones pericentroméricas más extensas, tal y como se puede apreciar en la presente tesis gracias a las sondas utilizadas.

Los resultados del presente estudio, coinciden con los resultados obtenidos por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012), donde cuantifican que la región ocupada por *Bilby* y demuestran que esta señal es más extensa en el cromosoma B que en los As. Esta acumulación de secuencias está involucrada en la formación de la heterocromatina pericentromérica, que a su vez está relacionada con la no disyunción y con la segregación cromosómica (Jones y Puertas, 1993). Yamagishi *et al.* (2008) propone que

la heterocromatina centromérica es necesaria para la cohesión de las cromátidas hermanas durante el reclutamiento de shugosina, proteína responsable del mantenimiento de la cohesión en los centrómeros de los eucariotas desde la profase hasta el inicio de anafase. Por otra parte, Gartenberg en 2009 propuso que el papel crítico de la heterocromatina pericentromérica en vertebrados podría prevenir la disociación prematura de la cohesión centromérica. Teniendo en cuenta que las regiones de heterocromatina pericentroméricas son más extensas en el B de centeno que en los As, es posible que el cromosoma B necesite más tiempo para resolver la cohesión en esta región, y este podría ser uno de los factores que favorecerían la no disyunción.

Con respecto a la intensidad de la señal de *Bilby*, los resultados de la presente tesis coinciden de nuevo con las observaciones realizadas por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012), donde aprecian que la intensidad de la señal de *Bilby* es menor en el B que en los As. Por tanto, esta secuencia está más dispersa en las regiones centromérica y pericentroméricas del B que en los As; probablemente, este hecho está relacionado con la inserción y amplificación en esa región de otras secuencias repetidas como pueden ser *ScCL11* y el ADN de orgánulos. También se puede observar que, tanto en As como en el B, las señales de *Bilby* son más estrechas en el *core* centromérico. Por otra parte, dicho *core* centromérico presenta una constricción más pronunciada en el B que en los As en paquitena, este hecho es visible tiñendo los cromosomas únicamente con DAPI. Esto indica que el cromosoma B posee una diferente organización del *core* centromérico que los As. La baja intensidad de señal de *Bilby* en el pericentrómero del B, está en contraposición con el resto de secuencias analizadas (*CRRye*, *ScCCS1*, *Sc192pb*, *ScCRW2*, *pBs301-1* y *Sc6C6-3*), las cuales tienen una similar intensidad tanto en Bs como en As; salvo *ScCL11*, que es específica del B. Además, *ScCCS1* y *Bilby* son las únicas secuencias que se extienden más en el pericentrómero del brazo corto que en el pericentrómero del brazo largo, mientras que, en los As las señales de ambas regiones pericentroméricas son de tamaño similar. Con respecto al resto de sondas, no parece haber diferencias aparentes en el tamaño de las señales entre regiones pericentroméricas de ambos brazos ni en el B ni en As. La única diferencia reseñable es que *CRRye* tiene al final de cada región pericentromérica una pequeña señal que la distingue del resto de secuencias.

En el presente estudio, de manera similar a las observaciones de Lamb *et al.* (2005) en el cromosoma B de maíz, se ha podido apreciar que salvo *pBs301-1* y *Sc6C6-3*, las demás secuencias centroméricas y pericentroméricas tienen señales intersticiales en el brazo largo del B. Estas señales siempre están localizadas en los mismos bloques heterocromáticos, más concretamente en la parte más distal del bloque 2 y en la parte proximal del bloque 3; este hecho permite sugerir que el presente cromosoma B podría derivar de un cromosoma dicéntrico. Este cromosoma B dicéntrico podría haberse formado de manera temprana cuando se produjo el reordenamiento entre los cromosomas 3RS y 7R propuesto por Martis *et al.* (2012), o podría haberse formado tardíamente a partir de 2Bs que formaron un sobrecruzamiento tipo U entre ellos (Lacadena, 1996); en ambas hipótesis, lo que habría ocurrido fue que, con el tiempo, las secuencias centroméricas degeneraron, y el centrómero secundario perdió su funcionalidad (FIGURA 89).

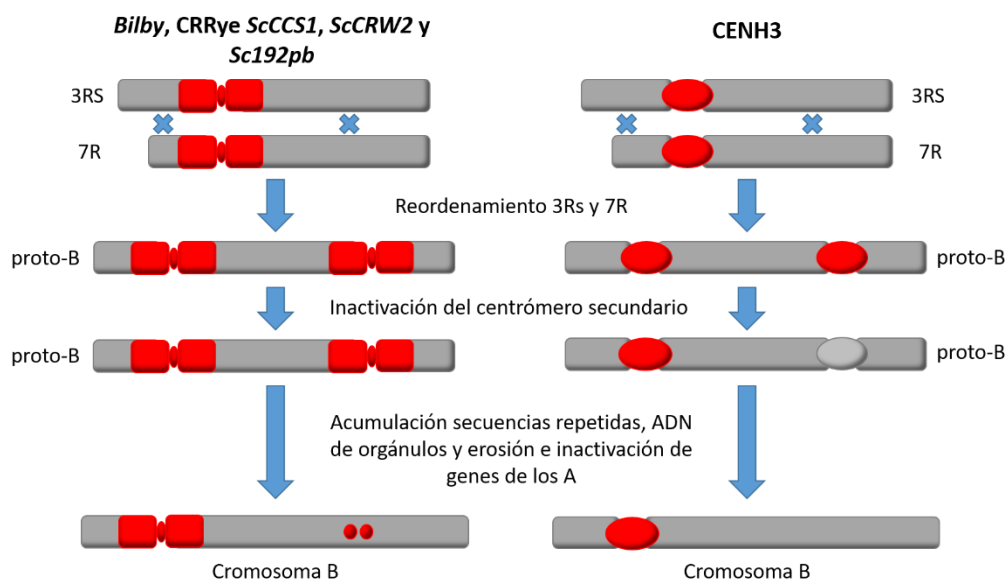


FIGURA 89. Esquema que representa el posible origen dicéntrico del cromosoma B de centeno. Ambas figuras muestran cómo pudo ser la evolución paralela de las secuencias localizadas en las regiones centroméricas y pericentroméricas del B que también marcan los bloques 2 y 3, en comparación con CENH3.

Al realizar la inmunodetección de CENH3 solo se revelaron señales en el centrómero del cromosoma B, no se detectó ninguna señal en los bloques heterocromáticos del brazo largo donde se habían localizado secuencias centroméricas y pericentroméricas. Esto determina que no hay reclutamiento de nucleosomas específicos del centrómero en los bloques heterocromáticos. Lo que coincide con las

observaciones de Lamb *et al.* (2005) en Bs de maíz, donde no se observó reclutamiento de nucleosomas específicos de centrómero en lugares fuera del propio centrómero, aún habiendo secuencias centroméricas y pericentroméricas en diferentes regiones de los brazos cromosómicos. Estos resultados indican que la secuencia de ADN por sí misma no determina la función centromérica, sino que debe estar relacionado con algún tipo de marca epigenética que reconoce CENH3 y que está presente únicamente en la región centromérica (Jin *et al.*, 2005).

Como se discutió anteriormente, el cromosoma B de centeno podría tener un origen dicéntrico, argumento basado en la existencia de secuencias centroméricas y pericentroméricas en la parte distal del bloque 2 y proximal del bloque 3. Sin embargo, no hay reclutamiento de CENH3 en esa región. Como normalmente los cromosomas dicéntricos se pierden, es probable que se produjera una inactivación del centrómero secundario. El mecanismo de transición de un centrómero activo a uno inactivo todavía es desconocido, pero numerosos ejemplos apoyan que la inactivación ocurre de una división celular a otra (Fu *et al.*, 2012). Koo *et al.* (2011) mediante *Fiber FISH* pudieron observar la metilación de un centrómero inactivo. Por otra parte, en trigo, la inactivación de los centrómeros secundarios del cromosoma tricéntrico mi7Bs, está asociada con las modificaciones histónicas H3K27me2 y H3K27me3 (Fu *et al.*, 2012), y estas modificaciones histónicas son características de la heterocromatina de las regiones distales de los cromosomas A y B de centeno (Carchilan *et al.*, 2007). Por tanto, se puede sugerir que la inactivación del centrómero secundario, ha permitido la acumulación de otras secuencias, entremezcladas con secuencias propias del centrómero en regiones intersticiales y subteloméricas del brazo largo, lo cual ha sido demostrado en el presente estudio, donde además se ha visto que CENH3 solo está localizada en el centrómero.

Con respecto a la señal de CENH3, no se encontraron diferencias en la intensidad o el tamaño entre los centrómeros de los cromosomas A y B de centeno ($t = -2,128$, P valor = 0,1004; $n = 10$ Bs y 59 As). Este dato es similar a los descritos por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012) en centeno, donde no observan diferencias entre las señales de CENH3 de As y Bs. En otras especies, como *Aegilops speltoides* (Ruban *et al.*, 2020) tampoco encontraron diferencias de tamaño entre las señales de CENH3 de Bs y As. Por el contrario, si difiere en el caso del maíz (Lamb *et al.*, 2005) donde sí se puede apreciar una diferencia en la señal de CENH3, siendo la señal del B más débil que las de los As.

Es importante destacar que la señal de *ScCL11* flanqueaba a la señal de CENH3, pero sin solapar en ningún momento con ella, lo cual sugiere que *ScCL11* no es parte del centrómero activo y que actúa como frontera de CENH3; la ausencia de *ScCL11* probablemente viene determinada por la presencia de *Bilby* en el *core* centromérico, ya que esta última ocupa la región más estirada del centrómero en metafase I, mientras que *ScCL11* ocupa principalmente los pericentrómeros. Estos resultados contrastan con los obtenidos en maíz, donde la señal de la secuencia *ZmBs* (secuencia muy similar a *ScCL11* que se localiza tanto en la región centromérica y pericentromérica como en la región subterminal del brazo largo del B) sí solapa con la señal de CENH3 (Jin *et al.*, 2005).

Otra posible explicación para la existencia de secuencias centroméricas y pericentroméricas en regiones intersticiales del brazo largo es que, el cromosoma B en algún momento de su evolución sufriera una inversión paracéntrica. Los puntos de rotura se encontrarían en el extremo de la región pericentromérica y en una región más distal del brazo largo (Klemme *et al.*, 2013) y daría lugar al B actual. Esta explicación estaría respaldada por Marques *et al.* (2013), quienes observaron un polimorfismo entre variedades del B de centeno, el cual pudo surgir a partir de una inversión pericéntrica; también estaría respaldada por el hecho de que, en la presente tesis se ha podido observar una inversión paracéntrica en el cromosoma B, que además se ha producido en la zona del brazo largo donde se encuentran localizadas las secuencias centroméricas.

En general, aunque todas las sondas utilizadas se localizan en las mismas regiones, el patrón de cada una es ligeramente diferente, indicando que estas secuencias derivadas de retroelementos se han amplificado de manera diferente. Cabe reseñar que *ScCL11-1* es la secuencia que tiene un marcaje más intenso y uniforme, ocupando toda la región centromérica y pericentromérica, excepto el propio *core* centromérico donde esta aparentemente ausente; además es la única secuencia que marca más de dos bloques heterocromáticos en el brazo largo.

Respecto a los resultados del análisis en metafase I, se observó que, en los As *Bilby* es la secuencia que aparece más estirada hacia los polos, siendo *ScCCS1* y *CRRye* muy similares en el estiramiento, pero con menos intensidad de señal. Estos resultados confirman las observaciones realizadas por González-García (2011) en centeno, donde usó las mismas secuencias, pero obtenidas en trigo, con las cuales realizó FISH e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), demostrando que las secuencias más activas

y que más se estiran en los centrómeros de los cromosomas A son *Bilby* y *ScCCS1*, además de *CRW2* y *Sc192pb*. Sin embargo, el centrómero de los Bs no se comporta como el de los As; en este trabajo se ha observado que el estiramiento que se produce en los centrómeros de los Bs, es menor que el de los As, y todas las secuencias analizadas se estiran hasta el mismo punto, indicando una diferente organización del centrómero del B. El menor estiramiento podría ser debido a que el *core* centromérico del cromosoma B es más largo que el de los cromosomas A. Este hecho permitiría que, al unirse los haces de microtúbulos al *core* y estirar de manera paralela a uno de los polos celulares, el centrómero no adquiriese una morfología tan estirada como la observada para los cromosomas A en metafase I. Sin embargo, tal y como se ha demostrado en los resultados de la presente tesis, el tamaño de la señal de CENH3 de los B no presenta diferencias significativas con respecto de los As, por tanto, refutaría la idea del mayor tamaño del *core* centromérico. Por otra parte, la diferente organización del centrómero podría estar relacionada con las diferencias de abundancia de las secuencias centroméricas descritas, ya que la señal de *Bilby* es más dispersa en el B que en los As, mientras que el resto de secuencias del retrotransposón centromérico (CR) están en la misma abundancia todas. Además, Banaei-Moghaddam *et al.* (2012) realizaron una ChIP en centeno con Bs y observaron que había una interacción significativa entre CENH3 y *Bilby*. También encontraron interacción de *ScCCS1* y *Sc192pb* con CENH3. Esto sugiere que, aunque *Bilby* siga siendo funcional en el centrómero del B, requeriría del reclutamiento de CENH3 por parte de otras secuencias del CR, al igual que pasa en los As (González-García, 2011).

Con respecto a la región distal del brazo largo del B, se pudo observar que está compuesta principalmente por secuencias repetidas; todas ellas (*E3900*, *D1100*, *ScCl11*, *Sc9*, *Sc21*, *Sc26*, *Sc55* y *Sc63*) podrían ser de gran utilidad para detectar y estudiar reorganizaciones estructurales en el B, por ejemplo, el mapeo de deleciones en la región subtelomérica del B, como la obtenida por Endo *et al.* (2008) usando cromosomas gametocidas de *Aegilops triuncialis* y *Ae. Cylindrica*.

La secuencia *Sc9* fue observada por primera vez por Klemme *et al.* (2013) en el final del brazo largo del B; la presente tesis permitió confirmar que *Sc9* está localizada en la región distal del brazo largo, más específicamente en el final del bloque 6.

Por otra parte, en estudios previos *Sc26* fue observada en la región subtelmérica, cercana a *D1100*, formando dos bandas distintas (Klemme *et al.*, 2013). En la presente tesis también se observaron 2 bandas de *Sc26*; la primera se encuentra en la zona media del bloque 5 donde se encuentra intercalada con *D1100*, mientras que la segunda marca más intensamente la región distal del bloque 4.

Con respecto a *Sc55* y *Sc63*, ambas secuencias fueron descritas por Klemme *et al.* (2013) como dos bandas intersticiales, estando *Sc63* entre *Sc55*. El presente estudio revela que estas sondas están localizadas en los bloques 2 y 4, estando intercaladas en el bloque 2 y contiguas en el bloque 4.

Las secuencias *Sc9*, *Sc26*, *S55* y *Sc63* no se transcriben, pero se encuentran rodeadas por *Sc21*, *E3900* y *D1100*, localizadas en el bloque 6, que sí se transcriben en anteras; aun estando situadas en regiones heterocromáticas (Carchilan *et al.*, 2007 y Klemme *et al.*, 2013).

En estudios previos, *ScCL11-1* fue localizada en las regiones centroméricas y en una segunda localización en el brazo largo (Klemme *et al.*, 2013). En la presente tesis se ha descubierto que *ScCL11*, además de estar localizada en las regiones centromérica y pericentroméricas, también se encuentra en los bloques 2, 3, 4, y también fue observada en el bloque 6, siendo la única secuencia repetida que se encuentra simultáneamente en las regiones donde ocurre y donde se controla la no disyunción. Estos resultados han podido ser observados gracias a la menor condensación cromosómica que se da en paquitena. Por el contrario, en metafase I, hay una mayor condensación cromosómica y las señales más pequeñas pueden observarse difusas o incluso no llegar a verse. De manera similar ocurre en metafase mitótica, donde la condensación es diferente, y las señales aparecen solapadas entre ellas, haciendo que las más pequeñas no sean observables.

Con respecto a la transcripción de *ScCL11*, Banaei-Moghaddam *et al.* (2012) observaron mediante RT-PCR que *ScCL11-3* es la única secuencia de la familia *ScCL11* que se transcribe en anteras, mientras que *ScCL11-1* y *ScCL11-2* no se transcriben. En estudios previos, las secuencias de la familia de *ScCL11* no han sido observadas en la región controladora de la no disyunción. Por este motivo, no se puede descartar que *ScCL11-2* y *ScCL11-3* pudieran encontrarse también en dicha región. Si no fuera el caso, los transcritos de *ScCL11-3* detectados por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012), podrían

producirse en el resto de bloques donde está presente *ScCL11* o en las regiones pericentroméricas. Varios estudios en diferentes especies, han demostrado que la actividad transcripcional del ADN repetido localizado en la heterocromatina centromérica es crucial para la función centromérica (Ekwall, 2004; Morey y Avner, 2004; Bouzinba-Segard *et al.*, 2006). Otros estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, demostraron que ARNs transcritos de satélites se unen a las regiones pericentroméricas permitiendo una estabilización de las proteínas cinetocóricas, favoreciendo la correcta segregación cromosómica (Rošić *et al.*, 2014). Por tanto, podría darse el caso de que los transcritos de *ScCL11*, además de los transcritos de *E3900*, *D1100* y *Sc21*, podrían estar actuando en las regiones pericentroméricas, controlando el mecanismo de no disyunción del B. Además, este mecanismo ayudado por *ScCL11*, podría ser similar a la propuesta realizada por Lamb *et al.* (2005), donde consideran la posibilidad de que el cromosoma B tenga un mecanismo que promovería el paso de este cromosoma a través de la meiosis, en el que participarían todas las secuencias que se encuentran a lo largo de él, como *ZmBs* (que es un satélite específico del B de maíz localizado en la región pericentromérica y en la región distal).

Por otra parte, tanto el ADN mitocondrial como el del cloroplasto se encuentran localizados en las regiones pericentroméricas de ambos brazos del cromosoma B, flanqueando al *core* centromérico y en los bloques heterocromáticos 1, 2, 3 y 4; únicamente el ADN mitocondrial se encuentra localizado en el *core* centromérico. Las inserciones de ADN de orgánulos en los pericentrómeros son frecuentes en muchos organismos, como por ejemplo el arroz (Matsuo *et al.*, 2005), donde estas inserciones han sido observadas en los cromosomas A o en ratas Wistar, donde las inserciones aumentan con la edad de los individuos (Caro *et al.*, 2010). Los pericentrómeros son normalmente regiones de baja densidad génica, lo cual facilitaría la repetida integración de ADN derivado de orgánulos (Matsuo *et al.*, 2005); este hecho ocurre especialmente en los Bs, que generalmente están considerados no funcionales, ya que no portan genes esenciales para la especie (Martis *et al.*, 2012).

Las secuencias de ADN mitocondrial y de cloroplasto son transferidas frecuentemente al genoma nuclear. Esta transferencia endosimbiótica es normalmente dependiente de inserciones basadas en la recombinación de largos fragmentos de ADN de orgánulos en el núcleo celular. Como resultado, las inserciones nucleares de ADN de

cloroplasto (NUPTs) o de ADN mitocondrial (NUMTs) ocurren con frecuencia (Hobza *et al.*, 2017). Para evitar el incremento del tamaño del genoma, la alta frecuencia de integración de ADN de orgánulos en el núcleo necesita un mecanismo de eliminación (Sheppard y Timmis 2009). Ruban *et al.* (2014) en *Aegilops speltoides*, sugieren que hay una inserción preferencial de ADN de orgánulos a los cromosomas supernumerarios, puesto que esto tendría unas menores consecuencias deletéreas que si ocurriese en los cromosomas A; las inserciones en los As podrían interrumpir genes con consecuencias letales para el organismo. Los cromosomas B no son necesarios para el desarrollo y crecimiento, y por tanto, pueden tolerar mayor cantidad de mutaciones. Esta puede ser la razón por la que, en el presente trabajo, se ha podido apreciar que el cromosoma B de centeno posee muchas más señales de ADN de orgánulos que los As. Similares resultados fueron obtenidos por Martis *et al.* (2012), los cuales sugieren que el equilibrio dinámico entre la frecuente integración y la rápida eliminación del ADN de orgánulos debe estar desbalanceada en los cromosomas B de centeno, siendo mayor la integración que la eliminación.

Otra posibilidad, tal y como sugieren Ruban *et al.* 2014, es que la integración nuclear de estas secuencias procedentes de orgánulos, dependa de la formación de roturas de doble cadena (DSB) y, si el cromosoma B fuera particularmente propenso a estas roturas, esto facilitaría la integración preferencial de este ADN promiscuo en los Bs.

Marques *et al.* (2013) estudiaron las inserciones de ADN de orgánulos en los Bs de centeno de diferentes variedades geográficas, y no encontraron diferencias en contenido y distribución, excepto por una inversión pericéntrica detectada mediante FISH. Este estudio fue realizado en metafase mitótica, mientras que en la presente tesis fue realizado en paquitena para obtener una mayor resolución. Como se ha visto en apartados anteriores, el ADN de orgánulos fue localizado en las regiones pericentroméricas adyacentes al centrómero, pero únicamente el ADN mitocondrial se encuentra en el core centromérico; sin embargo, en estudios previos no mostraron interacciones significativas con CENH3 (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012). Por otra parte, el ADN de orgánulos también se encuentra en los bloques heterocromáticos 1, 2, 3 y 4. En *Aegilops* las localizaciones del ADN mitocondrial y de cloroplasto indican que ambos pudieron integrarse bajo similares condiciones (Ruban *et al.*, 2014), tal y como

observamos en la presente tesis en centeno, donde estas secuencias tienen similares localizaciones también.

MINICROMOSOMA B

El minicromosoma B observado en la presente tesis es el primer minicromosoma documentado derivado del cromosoma B de centeno. El único caso en el que el miniB se transmitió sin ser por autofecundación fue en el año 2016, en el que se cruzó una planta portadora de un miniB con una planta con 2Bs. En la descendencia se encontraron 3 plantas portadoras de un miniB de un total de 14 (21,42%). En este caso la planta actuaba como parental femenino. Este dato nos ha permitido comparar el comportamiento del miniB de centeno con el comportamiento de un minicromosoma A de maíz (obtenido mediante truncamiento de los brazos con secuencias teloméricas) que se transmite a un 29,4% de la descendencia por vía femenina (Gaeta *et al.*, 2013). La comparación de los datos permite ver la similitud de ambas frecuencias de transmisión de estos minicromosomas por vía materna entre especies, e indica que la transmisión de minicromosomas sin brazos por esta vía es en torno al 25%. Por otro lado, el miniB se transmite con una frecuencia del 31,57% mediante autofecundación de un individuo monosómico. Este porcentaje de transmisión es muy similar a los observados para minicromosomas del B y de los As de maíz obtenidos por ciclos de BFB (Han *et al.*, 2007) o mediante truncamiento con secuencias teloméricas (Yu *et al.*, 2007; Gaeta *et al.*, 2013).

Con respecto a su origen, gracias al control y estudio de las descendencias de las plantas se conoce que el miniB proviene de una planta portadora de 2Iso-BL. Con la técnica de FISH, se pudo comprobar que provenía de un Iso-BL; ya que sus dos regiones pericentroméricas se corresponden con las regiones pericentroméricas de un brazo largo del B. Este hecho sugiere la siguiente hipótesis sobre cómo pudo formarse el miniB (FIGURA 90): se produjo apareamiento intracromosómico entre los dos brazos del isocromosoma (como se puede apreciar en la presente tesis; FIGURA 80 B), de manera que el centrómero podría haberse unido a microtúbulos procedentes de ambos polos, produciéndose una misdivisión que escindiera la región centromérica y pericentroméricas de los brazos cromosómicos. El análisis con *ScCL11* y el ADN

mitocondrial en paquitena ha permitido demostrar que las regiones pericentroméricas del miniB no son simétricas, por tanto, las roturas se debieron producirse en diferentes puntos en la región pericentromérica de cada uno de los brazos cromosómicos. Por último, en estas regiones centromérica y pericentroméricas del B escindidas, se produciría una adición de secuencias teloméricas en los extremos que permitirían la estabilización del cromosoma y su posterior transmisión (FIGURA 90).

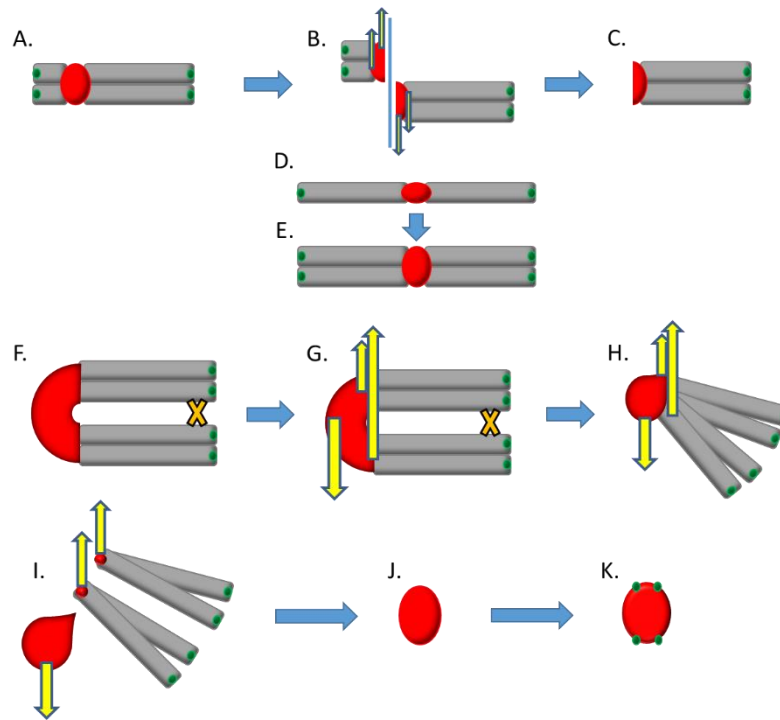


FIGURA 90. Esquema del posible origen del minicromosoma B, donde la región roja representa al centrómero marcado con *Bilby* y los puntos verdes representan los telómeros marcados con *pAtT4*. **(A)** Cromosoma B normal. **(B)** Rotura transversal del centrómero o misdivisión del cromosoma B. **(C)** Resultado de la misdivisión, ambos brazos largos quedan juntos. **(D)** Iso-BL formado de la reparación del centrómero después de la misdivisión. **(E)** Iso-BL normal. **(F)** En una meiosis posterior, el Iso-BL forma un quiasma intracromosómico de manera que adopta una configuración cerrada o en anillo. **(G)** El centrómero se une a microtúbulos de polos opuestos. **(H)** Se produce una tensión entre el centrómero y los brazos cromosómicos. **(I)** Misdivisión que escinde las regiones centroméricas y pericentroméricas de los brazos cromosómicos. **(J)** Resultado de la misdivisión, quedando únicamente parte de las regiones centroméricas y pericentroméricas. **(K)** Posterior adición de telómeros y estabilización del minicromosoma.

En plantas, la forma más eficiente de obtener minicromosomas es por medio de ciclos puente-rotura-fusión (BFB) (Mette y Houben, 2015). Han *et al.* en 2007 obtuvieron una gran colección de minicromosomas B de maíz a partir de un B y el brazo corto del cromosoma 9. El BFB implica la obtención previa de un cromosoma dicéntrico en el que al migrar cada uno de los centrómeros a polos opuestos en anafase, se producen puentes de cromatina, que posteriormente se rompen obteniéndose cromosomas

truncados. Con respecto al miniB de centeno, no se puede descartar que haya podido producirse por un ciclo BFB, ya que en la presente tesis se ha podido observar como existe autoapareamiento en los cromosomas B e Iso-BL, lo cual implicaría que hay segmentos homólogos repetidos, y que podría producirse un sobrecruzamiento dando lugar a un cromosoma dicéntrico (FIGURA 47 B), que migraría íntegro a un polo en anafase I y que daría lugar a un puente en anafase II, con una posterior rotura y fusión (Gaeta *et al.*, 2012).

Con respecto a la estructura y composición del miniB, estudios previos han descrito que la señal de FISH de *Bilby* es más larga pero menos intensa en el cromosoma B que en los As (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012). Sin embargo, observamos que la señal de *Bilby* del miniB es de mayor tamaño y tiene una intensidad similar a la de los cromosomas A. Que el tamaño de la señal de *Bilby* sea más grande sería esperado, puesto que, *Bilby* es más larga en el B que en los As; sin embargo, en el miniB la intensidad es similar a la de los As, cuando lo esperado es que fuera de menor intensidad como ocurre en el cromosoma B normal. Este hecho, permite sugerir que la heterocromatina pericentromérica ha podido amplificarse al originarse el miniB, al igual que ocurre con el bloque 4 en el brazo deleciónado del adIso-BL. Otra posible explicación es que tiene una diferente condensación que hace que *Bilby* parezca de similar intensidad a la de los As.

Respecto al comportamiento y segregación del miniB, en estudios previos, se ha podido observar como los minicromosomas que conservan íntegro el centrómero de un cromosoma de los que deriva, se transmiten bien en mitosis, pero dependiendo de su tamaño, pueden segregarse mal y perderse en meiosis (Han *et al.*, 2007). Sin embargo, los datos obtenidos en la presente tesis, nos permiten conocer que en el miniB existe una inestabilidad mitótica. Este hecho ha sido demostrado mediante FISH de la planta 2014-IsoC-13A-3, donde se pudo comprobar que tanto en núcleos interfásicos como en metafases mitóticas, había células que portaban 0, 1 ó 2 miniBs (FIGURA 35), cuando únicamente se esperaban células portadoras de un miniB. Este hecho permitiría explicar porque hay ausencia de miniBs en muchos de los cruzamientos realizados (TABLA 2). Aunque en las raíces se pueda observar al menos un minicromosoma B, estos podrían perderse durante el desarrollo vegetativo que da lugar a los diferentes hijuelos de la planta donde posteriormente se van a desarrollar las espigas. Por otra parte, en las

células binucleadas del tapete ocurre que esta inestabilidad se hace más patente, viéndose mayor número de segregaciones incorrectas (48%) con respecto a las células en interfase y metafase (18,75% y 11,95%). De nuevo en algunos casos podría estar dándose no disyunción, pero también hay que tener en cuenta que las células binucleadas del tapete pueden tener otras alteraciones como por ejemplo la poliploidía. Observando el comportamiento en los núcleos interfásicos, metafase mitótica y células binucleadas del tapete, se podría sugerir que el aumento del tamaño de las regiones centromérica y pericentroméricas del miniB, podría estar actuando sobre la cohesión de las cromátidas hermanas, aumentándola y favoreciendo que no se separasen en anafase mitótica. Los datos obtenidos permiten sugerir que se produce no disyunción, y esta podría estar dándose en el miniB en mitosis somáticas, y no únicamente en la primera mitosis del polen (línea germinal) como ha sido descrito previamente (Hasegawa, 1934).

El análisis del comportamiento meiótico, permite observar que en metafase I también se aprecia el resultado de la inestabilidad mitótica, puesto que en la misma planta se han encontrado metafases I que poseen 0, 1, 2 o 3 miniBs. Por tanto, se está produciendo no disyunción mitótica previa a la meiosis, de manera que a esta llegan células con diferente dotación cromosómica. Otro hecho destacable en la metafase I, es que cuando hay 2 o 3 miniBs, en ocasiones aparecen juntos formando una estructura similar a un bivalente. Han *et al.* (2007) también observan apareamiento y formación de bivalentes de minicromosomas B en metafase I en plantas de maíz portadoras de 2 minicromosomas. En el presente caso, es muy poco probable que el miniB, estando formado únicamente por regiones centromérica y pericentroméricas, pueda formar quiasmas, puesto que en centeno, así como en la mayoría de las gramíneas, la formación de los quiasmas suele ser distal (Lukaszewski, 2008). Además, la frecuencia de quiasmas aumenta con la distancia al centrómero, tal y como ha sido descrito en numerosas especies como trigo (Lukaszewski y Curtis, 1993). Por estos motivos, la unión de ambos miniBs debe estar relacionada con algún tipo de interacción entre las regiones pericentroméricas similar a la que ocurre en la no disyunción, y permite que en algunos casos estas permanezcan unidas. Este hecho estaría de acuerdo con lo propuesto por Yamagishi *et al.* en 2008, puesto que el miniB, al tener solo regiones pericentroméricas, podría mantener una mayor cohesión de las cromátidas hermanas por estas regiones.

En anafase I y diadas, de nuevo se confirman los resultados obtenidos en metafase I, ya que se han encontrado células que no poseen ningún miniB y otras en las que hay 1 o 2 miniBs. En la mayoría de los casos (92%), el miniB en una sola dosis sufre una segregación incorrecta con respecto a lo esperado para un cromosoma univalente. El caso más frecuente es la separación de cromátidas hermanas (68%), lo cual coincide con el comportamiento de los minicromosomas de maíz cuando son univalentes (Han *et al.*, 2007). De nuevo, esto podría estar relacionado con la cohesión de las cromátidas, la cual se vería afectada debido a la reorganización estructural del miniB. En otros casos las cromátidas (20%) o los miniBs enteros (4%) quedan rezagados formándose micronúcleos, que no se incorporarán finalmente a uno de los productos de la diada y se perderán. Todas estas observaciones podrían ser debidas a la modificación de la estructura del pericentromero y a la del centrómero, lo cual afectaría a la formación del cinetocoro y la unión al huso mitótico. Estos datos explicarían la baja transmisión de este minicromosoma.

En anafase II y tétradas al igual que como pasaba en anafase I y diadas, sigue viéndose un comportamiento inestable y una segregación incorrecta del miniB en la mayoría de las células, ya fueran portadoras de 1 o 2 minicromosomas. Se observa tanto separación de cromátidas, como de miniBs que migran con sus dos cromátidas al mismo polo. En algunos casos, tanto si los miniBs se separan o no, pueden formar micronúcleos. También hay tétradas sin minicromosoma en ninguno de sus núcleos, al igual que ocurría en las diadas, por tanto, estos hechos confirman que puede producirse no disyunción previa a la meiosis y que hay problemas en la segregación del minicromosoma en ambas divisiones meióticas.

La inestabilidad observada durante la mitosis y la meiosis puede estar relacionada con la región funcional del centrómero. En la presente tesis se observó que la variante histórica CENH3, se localiza en el centrómero del miniB. Por tanto, se demuestra que el minicromosoma recluta nucleosomas centroméricos que serían responsables del ensamblaje del cinetocoro y de la transmisión en mitosis y meiosis. Con respecto a la señal de CENH3 del miniB, esta es de menor tamaño que la observada en el cromosoma B y los As, lo cual puede ser una de las causas de que, en ocasiones, su segregación no sea la correcta para cada fase. El dato del menor tamaño de la señal de CENH3 del miniB difiere de los resultados descritos para el cromosoma B en la presente

tesis y por Banaei-Moghaddam *et al.* (2012), donde no observan diferencias entre las señales de As y Bs. Por el contrario, sí tiene similitud con los estudios llevados a cabo en maíz por Lamb *et al.* (2005), donde sí se puede apreciar una diferencia en la señal de CENH3, siendo la señal del B más débil que las de los As. Este hecho puede parecer contradictorio con el hecho antes indicado de que el minicromosoma pueda tener una mayor cantidad de secuencias centroméricas y pericentroméricas que el cromosoma B y los As. Se podría pensar que la reducción de la cantidad de CENH3 se pudo dar en el origen del miniB, cuando pudo haberse producido una misdivisión asimétrica, quedando uno de los brazos largos del Iso-BL, con una porción más pequeña del centrómero funcional. Alternativamente, pudo producirse un cambio estructural en el minicromosoma B que favoreciera su transmisión. Si el minicromosoma tiene un centrómero activo demasiado grande podría unirse con frecuencia a microtúbulos procedentes de ambos polos y producirse nuevos eventos de misdivisión o incluso de pérdida en la placa metafásica por ser incapaz de migrar antes de anafase. Si, por el contrario, el minicromosoma redujera el número de nucleosomas con CENH3 en su centrómero, disminuiría también la probabilidad de unirse a microtúbulos procedentes de distintos polos, asegurando así su correcta segregación. Pero si el número de nucleosomas se redujese demasiado, este hecho tendría como consecuencia que los microtúbulos no se ensamblen adecuadamente en algunos casos, de tal manera que el miniB quedaría rezagado en anafase en la placa ecuatorial y sería eliminado en forma de micronúcleo (FIGURA 91).

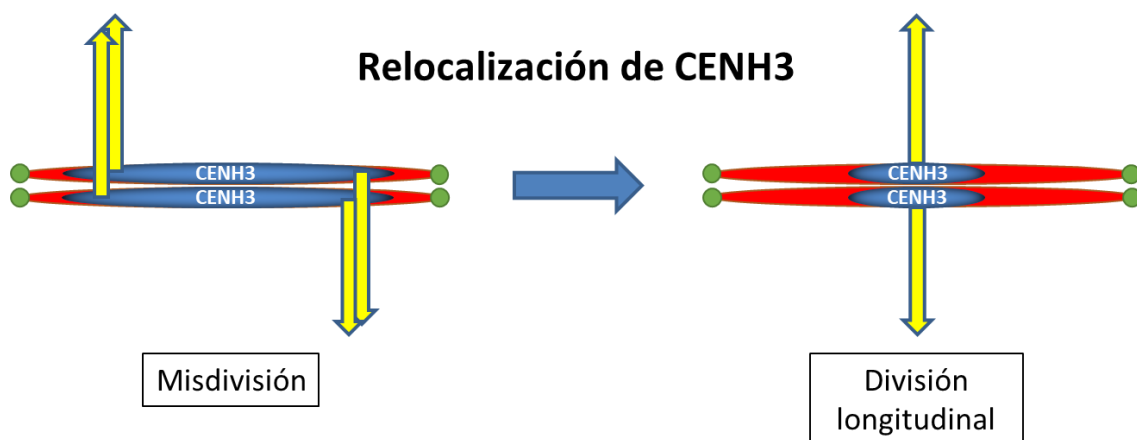


FIGURA 91. Esquema que representa el posible cambio estructural que pudo sufrir el miniB para que su transmisión se viera favorecida. Al reducir el número de nucleosomas de CENH3 podría unirse únicamente a microtúbulos procedentes de polos opuestos y así tener una segregación correcta.

En mitosis, si el ensamblaje al cinetocoro es correcto, la separación de las cromátidas hermanas se produce de manera temprana debido a la ausencia de brazos. Sin embargo, tanto en la segunda división meiótica como en mitosis, el miniB puede tener tendencia a sufrir no disyunción de las cromátidas hermanas debido a que se mantenga su cohesión por tener una región pericentromérica más grande. Estas razones pueden explicar porque en algunas ocasiones en meiosis y en mitosis el miniB separa cromátidas y en otras se mantiene unido, e incluso se mantiene junto a otro miniB formando un bivalente como ocurre en meiosis. Pero si la cantidad de CENH3 se ha reducido mucho, también puede ocurrir que los microtúbulos no se unan correctamente, y puede ocurrir que el miniB se pierda en la placa al quedar rezagado. En todo caso, el miniB tiene inestabilidad tanto mitótica como meiótica, lo cual hace que su transmisión sea similar a la de otros minicromosomas, pero inferior a la del cromosoma B de centeno.

Por otra parte, el minicromosoma B de centeno podría ser útil a nivel biotecnológico como vector autónomo en centeno, pero para poder usarlo habría que conseguir una mayor estabilidad, lo cual se podría conseguir mediante la inserción de un gen de selección gametofítica (Birchler y Han, 2013). El ejemplo sería utilizar plantas con un sistema citoplasmático de esterilidad masculina S (*cms-S*) que hace que el polen no tenga viabilidad. Si se introduce en el minicromosoma el restaurador de la fertilidad (*Rf3*), los granos de polen con el minicromosoma sobrevivirían, mientras que los que carecieran de él no. De esta manera, cruzando un parental masculino con *Rf3* con un parental femenino que porte el sistema *cms-S*, permitiría conseguir una completa representación del minicromosoma en la siguiente generación (Birchler y Han, 2013). Por otro lado, el miniB también podría ser de gran utilidad para estudiar la función centromérica y como modelo para el estudio de la meiosis en minicromosomas.

ISO-BL ASIMÉTRICO DE DELECCIÓN

Este nuevo derivado del cromosoma B de centeno, se observó en las anteras de planta 2015-IJ1-9. Tanto sus plantas hermanas, como la planta de la que derivó eran portadoras de 2Iso-BL en raíces y en anteras. Sin embargo, en las raíces de la planta 2015-IJ1-9 pudieron observarse diferentes tipos de cromosomas: Iso-BL monocéntricos

con una gran región centromérica, Iso-BL dicéntricos, Iso-BL tricéntricos e Iso-BL asimétricos de diferentes tamaños. Como se ha comentado anteriormente, todos estos derivados provienen de una planta con 2 Iso-BL, a partir de los cuales es posible explicar la formación de los derivados de la raíz. Lo que posiblemente ocurrió fue que en la meiosis de la planta 13-IsoC-10 se diera reorganización estructural de los Iso-BL, que dió lugar a un Iso-BL dicéntrico, que a su vez dio lugar los 2adIso-BL observados en la planta 2015-IJ1-9. A partir de este Iso-BL dicéntrico, se formarían puentes anafásicos o se producirían misdivisiones que llevarían a la obtención de los derivados observados. A continuación, se presentan los dos modelos más posibles de cómo pudo formarse el Iso-BL dicéntrico:

- Modelo de sobrecruzamiento tipo U. Este tipo de sobrecruzamiento ha sido descrito en centeno por diversos autores (Rees y Thompson, 1955; Jones, 1969; Giráldez y Lacadena, 1978) y puede ocurrir por errores en la unión de hélices de ADN rotas o por un apareamiento poco efectivo. Este tipo de sobrecruzamiento entre 2Iso-BL tiene como resultado la formación de 4 productos meióticos entre los que se encuentran dos cromátidas normales del Iso-BL, un fragmento acéntrico que se perdería en forma de micronúcleo y un Iso-BL dicéntrico (FIGURA 92). También puede darse un sobrecruzamiento tipo U entre cromátidas homólogas, lo cual fue descrito por Jones y Brumpton (1971). En los sobrecruzamientos de tipo U, el tamaño de los fragmentos puede variar de un meiocito a otro, puesto que hay una correlación inversa entre el tamaño del fragmento y la distancia al centrómero del punto donde se produjo el sobrecruzamiento erróneo (Lacadena, 1996). Además, Giráldez y Lacadena (1978) vieron que estos sobrecruzamientos no eran al azar, sino que se acumulaban en la zona distal, coincidiendo con las observaciones de Rees y Thompson (1955), lo cual también encaja con nuestro Iso-BL dicéntrico.

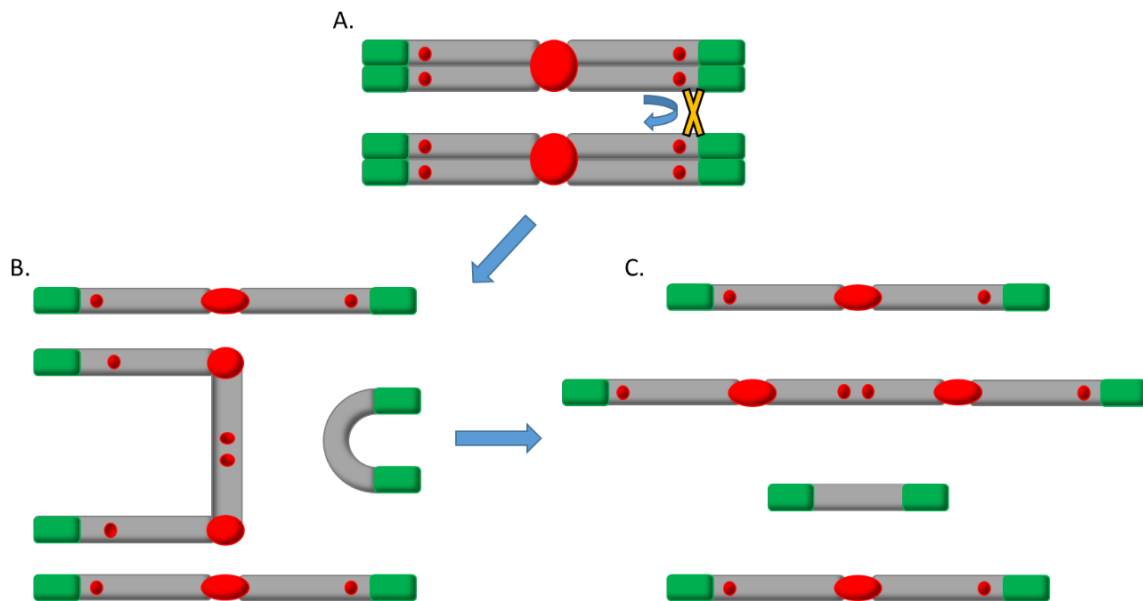


FIGURA 92. Esquema del modelo de sobrecruzamiento tipo U propuesto para la formación del Iso-BL dicéntrico. La región distal verde representa la localización de *D1100* y las regiones rojas marcadas por *ScCL11* representan el centrómero y pericentromeros y el bloque heterocromático 4. **(A)** 2 Iso-BL sufren un sobrecruzamiento tipo U. **(B)** Se forma un puente entre los 2 Iso-BL. **(C)** Resultado del sobrecruzamiento, dando lugar a dos cromátidas de Iso-BL, un fragmento acéntrico que se perdería y una cromátida de Iso-BL dicéntrico.

- Modelo de inversión paracéntrica. Las inversiones paracéntricas son un cambio estructural en el que un segmento cromosómico, que no incluye el centrómero, cambia de sentido. Cuando en un individuo heterocigoto para la inversión paracéntrica se produce el apareamiento de los homólogos en la profase meiótica, se origina un lazo en el que pueden darse uno o dos sobrecruzamientos (FIGURA 93). Como resultado a un sobrecruzamiento, en anafase I se forma un puente dicéntrico y un fragmento acéntrico. El fragmento tiende a perderse, mientras que el cromosoma dicéntrico puede formar un puente anafásico y romperse, o cabe la posibilidad de que el cromosoma dicéntrico no forme puentes y migre a uno de los polos celulares, de manera que pase entero a la descendencia. Este modelo tiene altas probabilidades de producirse, ya que el B de centeno posee gran número de secuencias repetidas distribuidas a lo largo de su longitud (Klemme *et al.*, 2013) y la probabilidad de que se encuentren en sentido contrario es muy alta. Esta explicación de las inversiones paracéntricas también es usada por Klemme *et al.* (2013) para dar explicación a la formación de la actual estructura del B de centeno. Además, cabe destacar que en la

presente tesis también ha se descrito una inversión paracéntrica en un B de centeno, cuyos puntos de rotura coinciden con la región donde se ha producido la deleción en el adlso-BL. Por otra parte, también se han descrito inversiones pericéntricas como posible origen de diferentes polimorfismos del B en varios cultivares de centeno (Marques *et al.*, 2013).

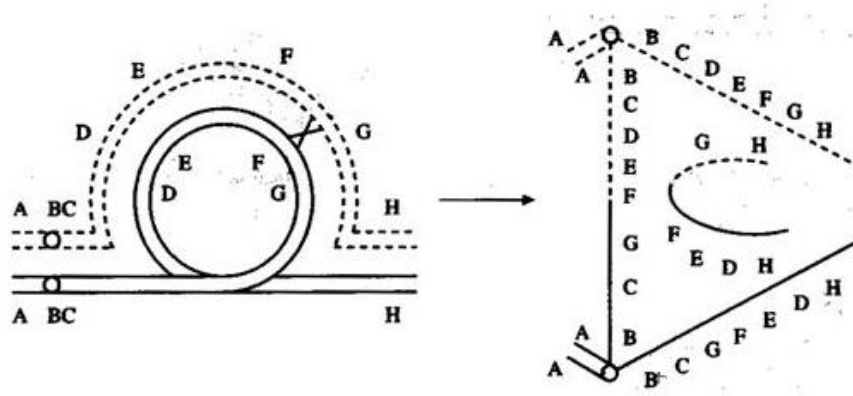


FIGURA 93. Modelo de inversiones paracéntricas y configuraciones en profase meiótica y anafase I, cuando se da un único cruzamiento intersticial. Lacadena (1996).

Los cromosomas dicéntricos no son fáciles de encontrar en la naturaleza, puesto que generalmente llevan a cambios genómicos deletéreos; además son inestables en su transmisión porque ambos centrómeros pueden unirse a fibras del huso procedentes de polos opuestos (Fu *et al.*, 2013). Los cromosomas dicéntricos, por lo general, pueden seguir dos destinos distintos (Stimpson *et al.*, 2012):

- El primero es que pueden sufrir cambios epigenéticos que inactiven uno de los centrómeros, tal y como se postula en la presente tesis de cómo pudo ser el origen del cromosoma B de centeno (FIGURA 89); además se piensa que el cromosoma 2 humano pudo surgir así (Chiatante *et al.*, 2017). También se ha descrito estos cambios epigenéticos en cromosomas de maíz (Han *et al.*, 2006) y en cromosomas de trigo, donde Zhang *et al.* 2010 observaron como el cromosoma tricéntrico (mi7BS) sufría inactivación de sus centrómeros más pequeños para transmitirse a la descendencia.
- El segundo destino que pueden sufrir los cromosomas dicéntricos es que se produzcan roturas de dicho cromosoma cuando ambos centrómeros están

migrando hacia polos celulares opuestos. Este último caso es él podría haber sufrido el presente Iso-BL dicéntrico para dar lugar a los diferentes derivados observados.

El adIso-BL es el único derivado que pasó a la descendencia, por tanto, lo que habría ocurrido es que el Iso-BL dicéntrico (FIGURA 94 A) formaría un puente en anafase al unirse cada uno de los centrómeros a microtúbulos procedentes de diferentes polos celulares, produciendo una tensión, que acabaría por romper el cromosoma justo en la región del bloque heterocromático 4 (FIGURA 94 B). Los recién rotos adIso-BL migrarían a polos opuestos (FIGURA 94 C). Posteriormente se producirían dos eventos importantes que estabilizarían el cromosoma: se repararía la rotura, amplificándose las secuencias adyacentes, en este caso amplificando 4 veces el bloque heterocromático 4, y la telomerasa formaría nuevas repeticiones teloméricas en el extremo de este nuevo derivado (FIGURA 94 D). Con respecto a otros Iso-BL asimétricos de diferentes tamaños encontrados en las raíces, se formarían de manera similar a la descrita, con la diferencia que el punto de rotura se daría en otro lugar. A parte, ninguno de ellos paso a la descendencia, ya fuera porque no se estabilizaron o por otras razones que se desconocen.

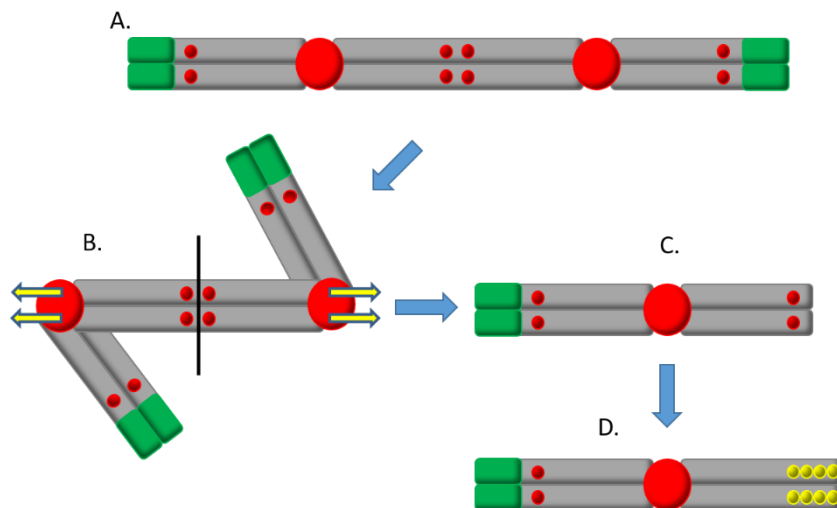


FIGURA 94. Esquema de la posible formación de los adIso-BL a partir del Iso-BL dicéntrico. La región distal verde representa la localización de *D1100*, las regiones rojas marcadas por *ScCL11* representan el centrómero, pericentrómeros y el bloque heterocromático 4; las regiones amarillas representan *Sc55* y *Sc63* y la amplificación del bloque 4. **(A)** Iso-BL dicéntrico. **(B)** Iso-BL dicéntrico en anafase, donde los centrómeros de cada cromátida migran a polos opuestos produciendo la tensión que llevara a la rotura del cromosoma dicéntrico. **(C)** 2adIso-BL resultantes de la rotura de las cromátidas del Iso-BL dicéntrico. **(D)** Amplificación del bloque 4 y estabilización del adIso-BL mediante la formación de telómeros.

El Iso-BL tricéntrico y el Iso-BL monocéntrico con las regiones centroméricas y pericentroméricas más grandes de lo normal pudieron formarse en una misma división o en diferentes divisiones, también a partir de un Iso-BL dicéntrico. Para su formación se debe haber producido una misdivisión de uno de los centrómeros del cromosoma dicéntrico (FIGURA 95 A y B) al unirse las diferentes subunidades centroméricas a microtúbulos de polos opuestos (FIGURA 95 C). De manera que al repararse los extremos rotos con la cromátida hermana, de forma similar a como se formaría un isocromosoma, podría dar lugar a un cromosoma tricéntrico y a un Iso-BL (FIGURA 95 D). Que el Iso-BL monocéntrico tenga más grandes las regiones centroméricas y pericentroméricas puede deberse a una amplificación de la cromatina tras la rotura como pensamos que ocurrió en el miniB o debido a que la rotura hubiera sido asimétrica; en este último caso, implicaría que la formación del Iso-BL monocéntrico habría sido independiente del Iso-BL tricéntrico, puesto que este último debería haber perdido parte de las regiones centromérica o pericentromérica en favor del Iso-BL monocéntrico.

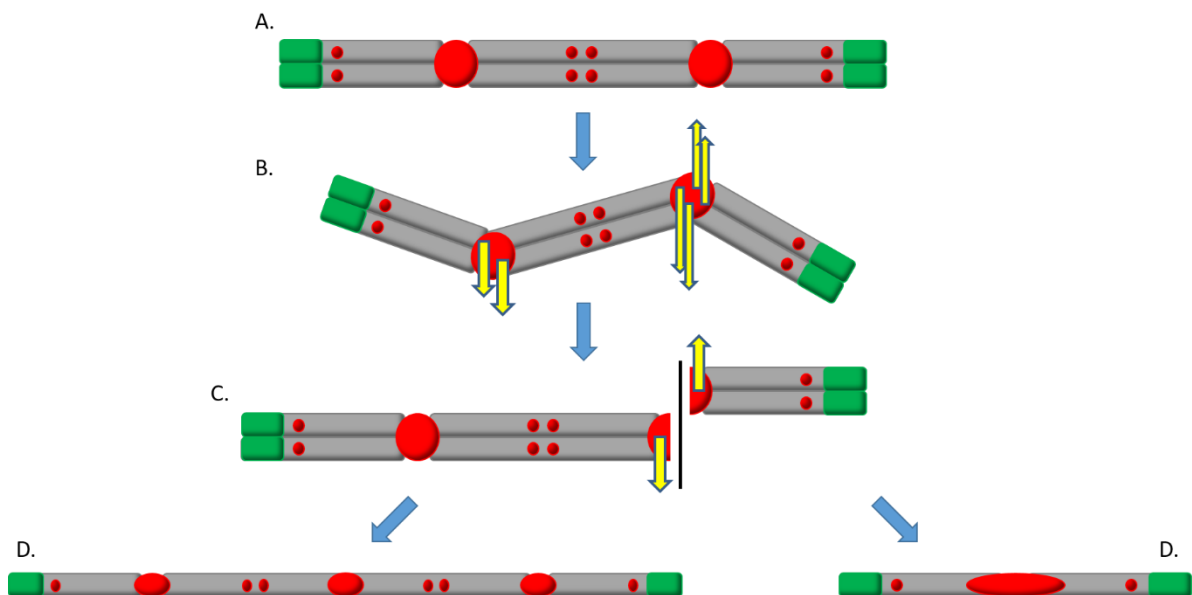


FIGURA 95. Esquema de la posible formación del Iso-BL tricéntrico y del Iso-BL monocéntrico con las regiones centromérica y pericentromérica más grandes, a partir de un Iso-BL dicéntrico. La región distal verde representa la localización de *D1100* y las regiones rojas marcadas por *ScCL11* representan el centrómero y pericentrómeros y el bloque heterocromático 4. **(A)** Iso-BL dicéntrico. **(B)** Microtúbulos procedentes de polos opuestos se unen a uno de los centrómeros produciendo tensión **(C)** La tensión produce la misdivisión del centrómero. **(D)** Los fragmentos de la misdivisión se reparan con la cromátida hermana dando lugar un Iso-BL tricéntrico y un Iso-BL monocéntrico con las regiones centromérica y pericentromérica más grandes.

Con respecto a la estructura del adlso-BL en paquitena, se ha podido determinar el punto exacto donde se produjo la rotura de uno de los brazos largos. La deleción se ha producido entre las señales de *ScCL11* y *D1100* del bloque heterocromático 4, eliminando aproximadamente un tercio del brazo. Además, se pudo observar que, a causa de la deleción, se produjeron unas duplicaciones en la región distal del brazo. Las duplicaciones surgen cuando un segmento cromosómico se replica más de una vez por error en la replicación del ADN, como producto de una reorganización cromosómica de tipo estructural o relacionado con un proceso de sobrecruzamiento desigual. En el caso del adlso-BL, se ha producido una duplicación debido a una deleción cromosómica. Se ha dado la amplificación de las secuencias *Sc55* y *Sc63*, que son las que han quedado más distales en el brazo después de la deleción, y esta amplificación, además de la adición de telómeros, ha permitido que el cromosoma pudiera seguir siendo estable y transmitirse a la descendencia. Estas amplificaciones, tienen cierta similitud morfológica a las producidas por Csonka *et al.* (2000) en cromosomas humanos, donde de manera artificial amplifican la región NOR para producir la formación de un nuevo brazo cromosómico heterocromático, al cual denominan cromosoma salchicha (*sausage chromosome*).

ANÁLISIS MEIÓTICO DEL CROMOSOMA B DE CENTENO Y DERIVADOS

Respecto a los resultados del análisis meiótico de **2Bs** obtenidos mediante FISH con las sondas *ScCL11* y *D1100*, se observó que en leptotena temprana, ya es posible observar como en un 31,25% de las células los extremos cromosómicos del B confluyen en una determinada región, donde aparecen juntos o muy cercanos entre sí, aunque todavía no se haya formado el *bouquet*.

El apareamiento de 2Bs se observa por primera vez en leptotena tardía. Como se puede apreciar, el porcentaje de extremos cromosómicos que se observan juntos en leptotena temprana es muy similar a los que posteriormente se encuentra de apareamiento en leptotena tardía (29,03%) (FIGURA 96). A partir de este momento, el porcentaje de Bs apareados aumenta considerablemente hasta paquitena (85,42%). Este incremento se debe al desarrollo del proceso sináptico, ya que a medida que avanza la profase I va progresando la sinapsis, alcanzando el máximo al final de paquitena

(Pradillo *et al.*, 2007; Naranjo, 2012). Por otra parte, en todas las células en leptotena tardía, las regiones distales de los brazos largos de los cromosomas B estaban incluidas en el *bouquet*. Sin embargo, únicamente en el 12,90% de los meiocitos, también estaban incluidas en el *bouquet* las regiones distales de los brazos cortos. Naranjo (2014) observó en centeno que los extremos distales de los brazos cortos alcanzan el *bouquet* más tarde que los extremos distales de los brazos largos, lo que reduce el porcentaje de apareamiento de los brazos cortos respecto a los largos. Por tanto, propuso que la sinapsis se iniciaría en menor proporción en el brazo corto por falta de interacciones físicas. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos en la presente tesis en el B de centeno, donde se puede observar que desde leptotena a metafase I, existe una mayor frecuencia de apareamiento por el brazo largo que por el brazo corto del B. Esto es debido a que hay una acentuada diferencia en el tamaño de los dos brazos siendo el brazo largo cinco veces mayor que el corto. Por otra parte, las observaciones obtenidas en leptotena tardía, demuestran que los cromosomas B pueden comenzar la sinapsis antes que los As, los cuales comienzan en cigotena hasta completarse en paquitena (Zickler y Kleckner, 2015). Otro dato importante es que, se ha podido observar autoapareamiento en el 7,23% de los Bs que se encuentran como univalentes. Estas observaciones de autoapareamiento coinciden con lo descubierto por Santos *et al.* (1993), quienes realizaron varios estudios de sinapsis del cromosoma B, donde analizaban las proteínas del complejo sinaptonémico por medio de una tinción con sales de plata en un microscopio electrónico de transmisión. La hipótesis que sugirieron es que el autoapareamiento del B se explicaría por la ocurrencia de sinapsis no homóloga, o por sinapsis homóloga entre secuencias repetidas invertidas localizadas en distintas regiones del B. El autoapareamiento del B podría impedir que se diera sinapsis entre los 2Bs y ser uno de los motivos por los que permanecen como univalentes.

Con respecto a los datos obtenidos en cigotena, estos muestran que en el 60% de las células analizadas (FIGURA 96), los Bs aparecen apareados, ya sea por el brazo corto, por el largo o por ambos. Lo cual es aproximadamente el doble de los que fueron observados en leptotena tardía (29,03%). Con respecto a los 2 cromosomas B desapareados, se pudo observar que 7,14% de ellos se encontraban autoapareando; en esta fase el número de Bs autoapareados es similar que en leptotena tardía (7,23%), lo

cual confirmaría que autoapareamiento del B podría impedir que se diera sinapsis entre los 2B.

Los resultados obtenidos en paquitena indican que la sinapsis alcanza sus valores más altos en esta fase con un 85,42% de los cromosomas B apareados, encontrándose un 69,79% de los B con una sinapsis completa, un 15,63% de sinapsis parcial (12,50% con sinapsis en el brazo largo y 3,13% con sinapsis únicamente por el brazo corto) y un 14,58% de cromosomas asinápticos (FIGURA 96). Estos datos obtenidos en el cultivar Paldang tienen una cierta similitud a los datos obtenidos por Santos *et al.* (1993) en 2Bs del cultivar Puyo, donde observaron un 70% sinapsis total, un 26,7% de sinapsis parcial y un 3,3% de asinapsis. Por tanto, teniendo en cuenta que los As muestran sinapsis total en paquitena (Zickler y Kleckner, 2015) se puede concluir que en algunas ocasiones los Bs del cultivar Paldang muestran retraso en la sinapsis. Con respecto a los cromosomas desapareados, se observó que en paquitena el 25% de ellos se encontraban autoapareando, este hecho de nuevo confirmaría que el autoapareamiento del B podría impedir que se diera sinapsis entre los 2Bs, favoreciendo que queden como univalentes.

Con la información obtenida hasta paquitena, se puede decir que el cromosoma B de centeno es asincrónico respecto a los As tanto en el inicio como en el progreso de la sinapsis; puesto que puede adelantar el inicio de su sinapsis a leptotena, puede no completar la sinapsis en paquitena, y puede ser asináptico. Además, dentro de los Bs que estaban desapareados se ha podido observar como un pequeño número de ellos autoaparean.

Tanto en diplotena y diacinesis como en metafase I, el número de células que portan cromosomas B apareados disminuye con respecto a paquitena. En diplotena y diacinesis se puede observar un ligero descenso, pudiéndose observar el 73,33% de los Bs apareados formando bivalentes frente a los 26,67% que están como univalentes. En metafase I hay un drástico descenso encontrando únicamente un 37,96% de los Bs formando bivalentes (FIGURA 96) frente al 62,04% que se encuentran como univalentes. Esto es debido a que en diplotena el complejo sinaptonémico se desensambla y las uniones entre cromosomas homólogos que se pueden observar a partir de ese momento serán únicamente consecuencia de la formación de los quiasmas (Pradillo *et al.*, 2007). Además, en paquitena podría no observarse quiasma debido a que entra en acción el mecanismo de corrección del apareamiento, ya sea debido a que no se ha

formado bien el complejo sinaptonémico, o bien porque no se ha producido recombinación (Naranjo, 2012).

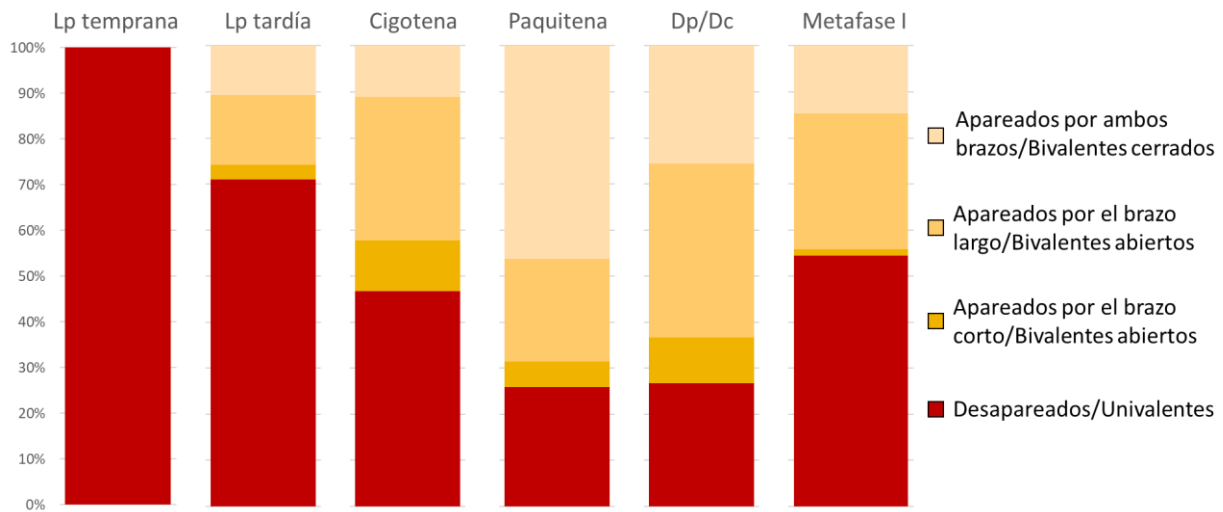


FIGURA 96. Porcentajes de las diferentes configuraciones de apareamiento de 2Bs desde leptotena temprana hasta metafase I.

En díadas, se pudo observar como el 74,68% de los cromosomas B se comportaron de la manera esperada, segregando un B a cada uno de los núcleos de la diada. Sin embargo, cabe destacar que en el 25,32% de los casos restantes el B se retrasaba con respecto de los As, quedando como micronúcleo, o separaba cromátidas (tanto formando micronúcleos como migrando a polos opuestos). Como resultado final, encontramos que el B se pierde en el 27,22% de los núcleos de díadas, cuando lo esperado sería encontrar un B en todos los núcleos.

En tétradas, se pudo observar como el 43,84% de los Bs se comportaban de manera esperada, separando cromátidas y migrando cada una de estas a polos opuestos de la tétrada. Sin embargo, hay un 56,16% de ocasiones en las que el B separa cromátidas, pero estas quedan retrasadas formando micronúcleos; y otras ocasiones en las que el B no separa cromátidas, y puede migrar a uno de los polos con ambas unidas o quedar como micronúcleo. Estos casos en los que se forman micronúcleos y la segregación no es la correcta, hacen que el porcentaje de núcleos de tétrada sin cromosomas B suba hasta el 31,85%, cuando lo esperado sería que todos los núcleos de tétrada portasen un B.

Con los datos obtenidos en diadas y tétradas, se puede confirmar que hay una cierta inestabilidad en las regiones centroméricas y pericentroméricas del B, que hace que, en ocasiones, cuando tiene que separar cromátidas, se produzca no disyunción y estas permanezcan unidas, de manera similar a lo que ocurre en el miniB. Al mismo tiempo y aunque parezca contradictorio, el B también muestra falta de cohesión entre cromátidas hermanas, lo cual hace que estas se separen en la primera división meiótica. Se puede concluir que tanto la no disyunción como la falta de cohesión, son los responsables de que en ocasiones el B tenga una segregación incorrecta y se pierda, ya sea en forma micronúcleo o porque algunos núcleos quedan sin B frente a otros que puedan tener más de una copia.

El estudio del comportamiento meiótico de plantas portadoras de **1B** ha permitido demostrar que este cromosoma autoaparea con una alta frecuencia cuando se encuentra en una única dosis. El autoapareamiento del B aumenta considerablemente desde leptotena (7,23%) a cigotena (33,34%) y paquitena (49,18%) donde alcanza valores máximos. Este incremento es esperable, y se debe al desarrollo del proceso sináptico, el cual alcanza sus valores máximos al final de paquitena (Pradillo *et al.*, 2007; Naranjo, 2012). En leptotena no cabría esperar sinapsis, pero al igual que ocurre en el análisis de plantas con 2Bs de la presente tesis, se observa que en los univalentes de B ya existe sinapsis en este estadio, aunque en muy baja frecuencia. Este hecho confirma que el B de centeno, en algunas ocasiones, adelanta la sinapsis respecto a los As.

Los datos de autoapareamiento obtenidos en plantas con 1B confirman las observaciones realizadas por Santos *et al.* (1993). Estos autores encontraron 4 configuraciones de autoapareamiento de 1B en paquitena (FIGURA 7), mientras que en este trabajo hemos podido apreciar 1 configuración de autoapareamiento en leptotena (TABLA 18), 5 en cigotena (TABLA 19) y 4 en paquitena (TABLA 20). Con respecto a las configuraciones de autoapareamiento en paquitena, la configuración A de Santos *et al.* (1993) es la única que coincide con varias de las configuraciones observadas en la presente tesis. Esta es una configuración con forma de horquilla asimétrica, donde tanto las regiones pericentroméricas como la región distal del brazo largo pueden aparear parcialmente entre sí o con regiones intersticiales del brazo largo. En el caso de Santos *et al.* (1993) este tipo de configuración A se puede encontrar en un 55% de las

paquitenas donde hay autoapareamiento, mientras que en la presente tesis esta configuración se puede encontrar en un 80% de las paquitenas donde existe autoapareamiento (configuraciones A, B y C, TABLA 20), en un 88,89% de las cigotenas (configuraciones A, B y C, TABLA 19) y en un 100% de las leptotenas donde el cromosoma B se encuentra autoapareando (configuración A, TABLA 18). Las diferencias observadas entre ambos estudios pueden deberse a múltiples factores, tales como que Santos *et al.* (1993) usan Puyo, mientras que en el presente estudio se usa el cultivar Paldang. También podrían deberse a que el tamaño de la muestra es diferente en ambos casos, siendo un total de 20 las células analizadas por Santos *et al.* (1993), frente a 61 células en paquitena analizadas en la presente tesis. Por último, las diferencias podrían deberse también a la técnica utilizada, puesto que en el presente estudio se han utilizado diferentes sondas en FISH que han permitido identificar las diferentes regiones implicadas en el autoapareamiento con mayor detalle, frente las observaciones realizadas con microscopía electrónica de transmisión y con tinción de sales de plata que permiten observar mejor la formación del complejo, pero no tanto distinguir las regiones implicadas en él.

Con respecto al autoapareamiento del B desde leptotena hasta paquitena, se ha podido observar que el autoapareamiento de 1B es significativamente superior que el de plantas con 2Bs, tanto en cigotena ($\chi^2=16,77$, $p<0,001$, $g.l=1$) (FIGURA 71) como en paquitena ($\chi^2=4,59$, $p<0,05$, $g.l=1$) (FIGURA 71), lo cual puede ser debido a la falta de cromosoma homólogo, de manera que el B tiende a autoaparear. En leptotena al estar comenzando la sinapsis en los Bs, el número de casos con autoapareamiento es muy bajo, por ello no hay diferencias significativas. Como ya se dijo previamente, el autoapareamiento podría darse por la existencia de sinapsis no homóloga, o por sinapsis homóloga entre secuencias repetidas invertidas localizadas en distintas regiones del B (Santos *et al.*, 1993). Estudios previos realizados con centeno haploide (Santos *et al.*, 1994) muestran que existe autoapareamiento (self-synapsis) y sinapsis no homóloga en situaciones de haploidía, y que puede incluso llegar a producirse un quiasma entre cromosomas no homólogos. Por otro lado, el B posee numerosas secuencias repetidas en distintas regiones del mismo (Klemme *et al.*, 2013), las cuales podrían favorecer sinapsis homóloga en caso de encontrarse en sentido contrario. Estas secuencias repetidas invertidas pasarían a estar en el mismo sentido al formarse una horquilla, lo

cual propiciaría la formación del complejo sinaptonémico y el autoapareamiento del B. De hecho, la mayoría de las secuencias repetidas específicas del B se han encontrado en las regiones implicadas en los autoapareamientos descritos de la presente tesis (región pericentromérica y región distal del brazo largo). Por ejemplo, el satélite *ScCL11* es muy abundante en la región pericentromérica del B, pero también está presente en los bloques heterocromáticos 2, 3, 4 y 6 (FIGURA 29). Es muy probable que conjuntos de secuencias de *ScCL11* estén orientados en sentido contrario en dichas regiones, por lo que es un buen candidato para ser una de las secuencias responsables del autoapareamiento del B.

En las fases de diplotena/diacinesis y metafase I, el porcentaje de células con 1B autoapareado es del 13,10% y 18,87% respectivamente, lo cual supone una gran disminución con respecto a paquitena donde había un 49,18% de autoapareamiento. Este hecho, se explicaría por el desensamblaje del complejo sinaptonémico, que comienza al final de paquitena. Aun así, existe un número bastante alto de células con 1B autoapareado en metafase I, en las cuales el univalente B no tiene la típica forma de “vara alargada” observada en el resto de células y por Santos *et al.* (1993). La presente tesis es el primer trabajo donde se describe apareamiento intracromosómico del B cuando está presente en una copia y se encuentra como univalente en metafase I. El hecho de que no se haya descrito con anterioridad, probablemente se deba a que no se disponía de sondas específicas del B que permitieran un análisis detallado mediante FISH. La disposición relativa de las sondas hace pensar la existencia de un quiasma intracromosómico. Sin embargo, la existencia de dicho quiasma implicaría la formación de puentes y fragmentos en anafase I, los cuales no han sido observados.

Con respecto a la comparación de plantas con 1B y con 2Bs en diplotena/diacinesis y metafase I, el número de autoapareamientos en células con 2Bs es 0 en ambas fases, por tanto, comparándolo con células con 1B, en ambos casos debería haber diferencias significativas. Sin embargo, en diplotena no las hay, lo que se debe probablemente al bajo número muestral de células con 2Bs desapareados en esta fase.

En el comportamiento de 1B en diadas, se pudo observar como en todas las ocasiones el B migra con sus dos cromátidas a uno de los polos, pudiendo sin embargo no ser total esta migración y quedar como micronúcleo. Dicho micronúcleo podría

degradarse y no observarse en tétradas, o en otras ocasiones podría finalmente incorporarse al núcleo. De cualquier modo, únicamente el 15,38% de los núcleos de diada portan el B.

Por otra parte, en tétradas el B tiende a separar cromátidas como comportamiento mayoritario (57,14%), aunque en la mayoría de ocasiones el B quedó como micronúcleo (45,71%) y por tanto solo segrega bien un 11,43% de las ocasiones. Dentro de las tétradas se ha podido observar que en 27,14% de las células, las cromátidas están en núcleos transversamente opuestos y no adyacentes, lo que únicamente se pudo originar si se produjo separación de cromátidas en la primera división. Las discrepancias entre las observaciones de diadas y tétradas podrían deberse al bajo tamaño muestral de meiocitos analizados en estos estadios, debido a la falta de material. Como resultado de la segregación anormal de 1B en primera y segunda división meióticas, este solamente se observó en el 20% de los núcleos de tétradas, cuando lo esperado sería 50%.

Con respecto a la comparación 1B con 2Bs, tanto en diadas como en tétradas hay diferencias muy significativas en la segregación ($\chi^2=16,3$, $p<0,001$, $g.l=1$) y ($\chi^2=14,60$, $p<0,001$, $g.l=1$) respectivamente, siendo mucho mayor la presencia de cromosomas B en núcleos de plantas con una dotación de 2Bs que en plantas con solo 1B (FIGURA 72). Estos datos estadísticos, nos indican que el apareamiento con un cromosoma homólogo es muy importante para la posterior segregación cromosómica. Además, los datos obtenidos mediante FISH permiten confirmar que, el principal factor que influye en la pérdida del B es el retraso de la migración respecto a los As en anafase, lo que resulta en la formación de micronúcleos. Este retraso está directamente relacionado con la falta de cromosoma homólogo, puesto que cuando hay 2Bs, esto no ocurre de una manera tan recurrente. Por otro lado, otros factores que influyen en la inestabilidad del B cuando se encuentra en una copia, son la no disyunción y la separación precoz de las cromátidas del B, aunque esta afectaría de una manera menos relevante.

El estudio del comportamiento meiótico de plantas con **2adiso-BL** ha permitido observar como en cigotena un 84,07% de los adiso-BL se encuentran apareados. Esta frecuencia de apareamiento, al igual que en plantas con 2Bs aumenta hasta paquitena, donde alcanza los niveles máximos (93,10%). Por otra parte, se puede observar como en cigotena hay un mayor número de adiso-BL que comienzan el apareamiento por el

brazo intacto (18,58%) que por el brazo delecionado (2,65%). Que el porcentaje de apareamiento sea mayor en el brazo intacto puede ser debido a su longitud, lo cual haría que llegara antes al *bouquet* e iniciara antes el proceso de reconocimiento y apareamiento de homólogos (Naranjo, 2012). En estudios posteriores, Naranjo (2014) utilizó líneas de adición trigo-centeno, demostrando que cuando un cromosoma de centeno tiene un brazo delecionado, y por tanto más corto, dicho brazo se retrasa a la hora de alcanzar el *bouquet*, lo que provoca que aparea con menor frecuencia que el brazo intacto. Sin embargo, en el presente estudio, las frecuencias de apareamiento en ambos brazos son similares en paquitena, observándose un 5,17% de adlso-BL apareando por el brazo intacto frente a un 2,59% que lo hacen por el brazo delecionado. Es posible que parte de las diferencias observadas para el brazo delecionado puedan deberse a la dificultad para identificar dicho brazo en cigotena, donde los cromosomas están menos condensados y en ocasiones la señal de *ScCL11* en el bloque 4 no es tan patente.

Comparando el comportamiento de 2adlso-BL con el de 2Bs, se ha demostrado que el adlso-BL aparea más que el cromosoma B tanto en cigotena ($\chi^2=36,11$, $p<0,001$, $g.l=3$) como en paquitena ($\chi^2=7,98$, $p<0,05$, $g.l=1$) (FIGURA 79). Esto se explicaría por la propia estructura del adlso-BL, puesto que, al tener dos brazos largos se esperaría el doble de apareamiento que el B, que tiene un brazo largo y uno corto, el cual aparea en raras ocasiones.

Por otra parte, al igual que ocurre con los Bs, existe un retraso en el apareamiento de los adlso-BL con respecto de los As, lo cual parece ser una característica común a los B de casi todas las plantas (Jones, 1995). Sin embargo, el análisis de la sinapsis de 2Bs ha permitido demostrar que en algunas ocasiones el inicio de la sinapsis se adelanta a leptotena, mientras que la progresión de la sinapsis se retrasaría, llegando incluso a no concluir en paquitena. El hecho de que solo se haya descrito el retraso respecto a los As, y no se haya descrito que en ocasiones se adelanten, puede ser debido a que los estudios de sinapsis del B han sido principalmente realizados en cigotena y paquitena, ya que es en estos estadios donde se puede visualizar correctamente con las tinciones clásicas de nitrato de plata (Santos *et al.*, 1993; Khazanehdari y Jones, 1996; Jimenez *et al.*, 2000; Puertas *et al.*, 2000).

Con respecto al análisis de 2Bs y de 2adlso-BL en paquitena, indica que la sinapsis es incompleta en algunos casos, ya que solamente uno de los brazos está apareado, mientras que en otros casos no se da sinapsis y los dos cromosomas homólogos se encuentran como univalentes. Se puede concluir que el apareamiento del B de centeno y sus derivados es asincrónico respecto a los cromosomas A, pudiendo adelantar o retrasar su sinapsis, y en algunas ocasiones esta es incompleta e incluso puede no darse. Los adlso-BL muestran un menor retraso en el apareamiento que los 2Bs, ya que presentan un mayor porcentaje de células donde esta sinaptando en cigotena y paquitena, fenómeno que posteriormente se relaciona con el elevado número de bivalentes en metafase I.

En las fases de diplotena/diacinesis y metafase I se observó un porcentaje de bivalentes de un 80% y un 70,77% respectivamente. Lo cual concuerda con los datos obtenidos en plantas con 2Bs, donde hay un descenso del número de bivalentes en estas fases, debido a que en diplotena el complejo sinaptonémico se desensambla, quedando los cromosomas únicamente unidos por los quiasmas. Con respecto a la observación de quiasmas, los bivalentes cerrados con quiasmas en ambos brazos son los más frecuentes en diplotena/diacinesis (44%), seguidos de los bivalentes abiertos con quiasma en el brazo intacto (24%) y de los bivalentes abiertos con quiasma en el brazo delecionado (12%). Estos datos difieren de los obtenidos en metafase I, donde los bivalentes cerrados con quiasmas en ambos brazos representan únicamente el 12,31% y donde las frecuencias de bivalentes abiertos con quiasma en el brazo intacto (27,69%) o en el brazo delecionado (30,77%) son mayores y muy similares entre sí. El hecho de que haya tantas diferencias entre ambas fases puede ser debido al tamaño muestral, puesto que el número de células contadas en diplotena/diacinesis es bajo debido a la limitación de material del adlso-BL. Respecto a la similitud de frecuencias de bivalentes abiertos con quiasma en el brazo intacto y en el brazo delecionado, esto difiere con lo esperado, que sería que el adlso-BL se comportará como el B, ya que, al tener un brazo más corto, llegaría más tarde al bouquet, habría menos frecuencia de apareamiento y por tanto eso se traduciría en una menor frecuencia de bivalentes. Müntzig y Lima de Faria (1953), observaron un cromosoma B de centeno que poseía una deleción de la mitad de su brazo largo, y este no apareaba. Por otra parte, Lukaszewski (1997) analizó varios isocromosomas asimétricos para el brazo largo del cromosoma 1B (1BL) de trigo

hexaploide, y observó que si tenían una deficiencia inferior al 50% de la longitud del brazo, no se reducía significativamente la capacidad de este brazo para aparear en metafase I. En el caso del adIso-BL, ha perdido alrededor de un tercio del brazo. Por lo tanto, la deficiencia no sería lo suficiente para que afecte al apareamiento de los brazos deficientes. Además, Lukaszewski (1997) llegó a la conclusión de que el apareamiento siempre se producía entre brazos de la misma longitud, es decir, el brazo intacto apareaba siempre con su homólogo intacto, y los brazos deficientes apareaban siempre entre ellos. También afirma que, si no existe homología en las regiones terminales durante su interacción en el *bouquet*, los brazos cromosómicos no inician la sinapsis y por tanto no se formará un quiasma que los mantenga unidos en metafase I. Todas estas conclusiones coinciden con los datos obtenidos para el adIso-BL, cuyos extremos cromosómicos son diferentes, y por tanto el brazo intacto nunca apareaba con el brazo delecionado, de manera que no se ha observado en el adIso-BL ningún caso de autoapareamiento ni univalentes en anillo.

En diplotena y diacinesis no existen diferencias significativas entre plantas con 2adIso-BL y 2Bs, la cual si existe en el resto de estadios. Este hecho puede ser debido al bajo número de diplotenas/diacinesis contabilizadas debido al escaso material del adIso-BL. Por otra parte, en metafase I hay unas diferencias muy significativas entre ambos tipos de plantas ($\chi^2=51,01$, $p<0,001$, $g.l=3$), siendo mayor el apareamiento de los 2 adIso-BL que de los 2Bs (FIGURA 79).

Al incorporar al estudio los 2Iso-BL en metafase I, siguieron observándose diferencias significativas entre los 3 tipos de cromosomas ($\chi^2=14,01$, $p<0,001$, $g.l=2$) (FIGURA 81), siendo la frecuencia de bivalentes de los adIso-BL la más alta (70,77%), muy superior a la frecuencia de bivalentes Iso-BL (46,77%) y casi el doble que la de 2Bs (37,96%). Con respecto a la comparación con el Iso-BL normal, se esperaría que el adIso-BL tuviera un menor número de bivalentes, puesto que la formación de quiasmas en el B de centeno se produce principalmente en la zona distal del brazo largo (Santos *et al.*, 1993). Este comportamiento no es único del B de centeno, puesto que se observa también en los cromosomas A de centeno y en otros cereales (Lukaszewski y Curtis, 1993; Naranjo, 2015). Presumiblemente, al haber perdido esta región distal, la formación de quiasma en el brazo delecionado del adIso-BL debería verse comprometida. Otro factor a tener en cuenta es que, al ser el brazo delecionado más

corto, también tardaría más en llegar al *bouquet*, sin embargo, estos hechos no se ven reflejados en los datos obtenidos. Por tanto, la mayor frecuencia de bivalentes de adlso-BL puede deberse a la existencia de una zona intersticial de inicio de sinapsis, la cual fue descrita durante el estudio de la sinapsis en paquitena en cromosomas B de centeno (Jiménez *et al.*, 1994). Esta región podría dar lugar a un quiasma, tal y como se ha visto en la presente tesis, tanto en el cromosoma B de centeno (FIGURA 59 C) como en el Iso-BL (FIGURA 80 D). Este quiasma sería el observado en el brazo delecionado del adlso-BL, que al carecer de parte distal, forzaría la formación de un quiasma intersticial, de manera similar a lo observado por Naranjo (2015) en cromosomas de trigo, donde deleciones distales obligaban a que el quiasma se forme en posiciones más intersticiales. Otro hecho a tener en cuenta es que, al ser los brazos del adlso-BL de tamaño y composición en su región terminal diferentes, evitarían el autoapareamiento y posterior formación de un quiasma intracromosómico que da a lugar a los univalentes en anillo observados en las plantas portadoras de 2Iso-BL (FIGURA 80 B). De esta forma se reduce el número de univalentes permitiendo que los homólogos apareen entre sí. En resumen, los datos obtenidos convierten al adlso-BL en el cromosoma más estable en metafase I dentro de los diferentes tipos de cromosomas analizados en la presente tesis.

En díadas, los resultados obtenidos muestran que, en la mayoría de las células analizadas, el adlso-BL se ha comportado según lo esperado, sin separar cromátidas y sin formar micronúcleos (83,33%), lo cual está directamente relacionado con el alto porcentaje de bivalentes en metafase I, que aseguran la correcta segregación cromosómica. Esto se ve reflejado en el alto número de núcleos de díadas con adlso-BL (99,02%).

En tétradas se observó que el adlso-BL había separado cromátidas en la mayoría de los casos (70,79%), pero en ocasiones se perdía una de ellas como micronúcleo (4,5%). También se pudo observar que el adlso-BL no se había comportado según lo esperado y no separado cromátidas en un 29,21% de los casos. Esto, sumado a los micronúcleos observados previamente, disminuye el porcentaje de núcleos de tétradas que contienen el adlso-BL hasta el 82,02%.

Comparando la segregación y el número de núcleos que portan al menos un adlso-BL con respecto a las plantas con 2Bs, se puede observar como existen diferencias muy significativas siendo en plantas con adlso-BL muy superior al B tanto en díadas

($\chi^2=29,33$, $p<0,001$, $g.l=1$) como en tétradas ($\chi^2=16,79$, $p<0,001$, $g.l=1$) (FIGURA 82). Esto pone de manifiesto que la capacidad para formar bivalentes en metafase I está estrechamente relacionada con la segregación cromosómica en ambas divisiones meióticas. Por tanto, el adlso-BL al tener un mayor número de tétradas portadoras de al menos un cromosoma accesorio, también va a tener una mayor cantidad de granos de polen con el adlso-BL. De esta manera, se esperaría que la transmisión del adlso-BL, al menos por vía paterna, sea más elevada que la del B estándar.

NUEVAS VARIACIONES CROMOSÓMICAS

En las células donde se encontró el **adlso-BL translocado**, además de este nuevo tipo de adlso-BL, también se observaron dos translocaciones producidas de manera natural, en las cuales está implicada la parte final del bloque heterocromático 6, que incluiría *Sc9* y una pequeña parte de *D1100*, que es la señal que se puede observar en las fotografías (FIGURA 81). Esta translocación es la primera observada entre el cromosoma B y los As en centeno de variedades coreanas. Estudios previos de Schelegel y Pohler (1994), observaron translocaciones espontaneas entre el B y el cromosoma 3R de la variedad japonesa de centeno JNK. También se han observado translocaciones naturales entre Bs y As en otras especies, como en ortópteros: saltamontes (Warchalowska *et al.*, 2001) o weta (Morgan-Richards, 2000). Por otra parte, Endo *et al.* (2008) obtuvieron translocaciones del B de centeno con As de trigo por medio de la utilización de un sistema gametocida, que induce reordenaciones cromosómicas del B.

Con respecto a cómo pudieron formarse estas translocaciones entre As y Bs, Klemme *et al.* (2013) describieron que la secuencia *Sc21c67* (*Sc21*) además de estar colocalizando con *E3900* en la región distal del B, también produce señales difusas en un par de As (lo cual no se ha observado en la presente tesis). Además, Klemme *et al.* (2013), vieron que en los As la señal de *Sc21* a su vez colocaliza con *pSc200*, que marca exclusivamente la heterocromatina subterminal. González-García *et al.* en (2006) observaron que, tanto en Paldang como en Puyo, se producen en meiosis conexiones en la heterocromatina subterminal entre diferentes pares de cromosomas A no homólogos. Además, al comprobar el final de la meiosis de células de esas mismas plantas pudieron comprobar que se había producido intercambio de estos bloques de heterocromatina

subtelomérica entre los diferentes cromosomas. Estas regiones de heterocromatina que forman las conexiones están compuestas principalmente por *pSc200*. Por tanto, en el caso observado en la presente tesis, se podría sugerir que al encontrarse *Sc21* en la región subterminal de As y Bs, podrían reconocerse, de manera que pudieran darse conexiones entre la heterocromatina subtelomérica, y producirse una translocación de manera que los A quedaron con *D1100* y el B pudo quedar con *pSc200* o no, dependiendo si la translocación fue recíproca.

Por otra parte, en la comparación del comportamiento en metafase I del adlso-BL translocado con los adlso-BL, pudimos comprobar que había diferencias significativas ($\chi^2=12,455$, $p<0,01$, $g.l=3$; FIGURA 84) entre ambos, siendo menor el porcentaje de bivalentes del adlso-BL translocado (43,01%) que el porcentaje de bivalentes del adlso-BL (70,77%). Por otro lado, la frecuencia de bivalentes del adlso-BL translocado es menor, pero similar a la frecuencia de bivalentes de Iso-BL (46,77%) y mayor que la de los B estándar (37,96%). Por tanto, la translocación está afectando a la formación de bivalentes, y por tanto afectará a la posterior segregación de este nuevo derivado. Este hecho es corroborado por las observaciones realizadas en la planta 19-2T-1-24, descendiente de la planta donde se han descrito las translocaciones, y que no porta ningún adlso-BL translocado, pero si mantiene las translocaciones en 2 pares de cromosomas A.

Por otra parte, el menor porcentaje de bivalentes del adlso-BL translocado, puede ser debido a que en la translocación está implicada la región distal del bloque 6. Como se ha comentado en la sinapsis del adlso-BL, en el B de centeno la formación del quiasma se produce principalmente en la zona distal del brazo largo (Santos *et al.*, 1993); este comportamiento también se observa en los As, y es propio de los cromosomas de centeno y otros cereales (Lukaszewski y Curtis, 1993; Naranjo, 2015). Por tanto, si se ha translocado parte de esta región distal, el brazo que ha perdido dicha región podría perder la capacidad de formar quiasmas distales, y esto se vería reflejado en un menor número de bivalentes en metafase I. Sin embargo, tal y como se ha discutido en la sinapsis del adlso-BL, esta carencia de formación de quiasma distal podría suplirse con la formación de un quiasma intersticial. Sin embargo, en este caso existe una diferencia, y es que en el brazo deleciónado del adlso-BL ha perdido aproximadamente un tercio del brazo, dejando la región de inicio de sinapsis intersticial descrita por Jimenez *et al.*

(1994) en la zona distal de este brazo delecionado. Pero en el caso del adlso-BL translocado, la parte translocada es muy pequeña y se da en el lugar por el que comienza el reconocimiento de homólogos y lugar de inicio de sinapsis, de manera que el punto de inicio de sinapsis intersticial queda lejos del extremo cromosómico, de manera que cuando estos confluyen en el *bouquet*, tengan mayor dificultad para iniciar la sinapsis.

El estudio del comportamiento meiótico de plantas con 1B ha permitido observar un **cromosoma B con una inversión paracéntrica**, que incluye el bloque heterocromático 3 y parte del 4. Como se ha descrito previamente en la presente tesis, el B centeno autoaparea cuando se encuentra en una única dosis, y además posee numerosas secuencias repetidas que podrían favorecer la sinapsis homóloga dentro de un mismo cromosoma. Klemme *et al.* (2013) propone que la localización de estas secuencias repetidas podría haberse originado por una inversión que tendría uno de sus puntos de rotura en el pericentrómero y el otro en la región distal del brazo largo. En la inversión paracéntrica observada en la presente tesis, ambos puntos de rotura se encuentran en el brazo largo del B. Uno de los puntos de rotura se encuentra en la zona media del bloque 4, región donde se encuentran la mayor parte de las sondas subteloméricas estudiadas (FIGURA 29), que está implicada en la mayoría de los autoapareamientos observados en univalentes del cromosoma B, y que además es donde se ha producido el truncamiento que dio lugar al adlso-BL (FIGURAS 51 y 52). Por tanto, se podría sugerir que la zona media del bloque heterocromático 4 del B de centeno es susceptible de sufrir diferentes reordenaciones cromosómicas.

Marques *et al.* (2013) realizaron un análisis mediante FISH de la estructura de los Bs de centeno de diferentes procedencias geográficas, en el cual descubrieron que había una inversión pericéntrica que diferenciaba las variedades asiáticas, de las encontradas en oriente próximo. Con estos datos y con los aportados en la presente tesis, se podría sugerir que el cromosoma B de centeno al no ser esencial para la planta, podría sufrir reordenaciones que, al no ser letales, quedarán fijadas en las poblaciones. Dichas reordenaciones ahora podrán ser más fácilmente descritas, gracias al conocimiento de la localización de las diferentes secuencias repetidas que lo componen.

CONCLUSIONES



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CROMOSOMA B

- El cromosoma B de centeno muestra en paquitena un brazo largo formado por 6 bloques heterocromáticos, un centrómero con un marcado estrechamiento y unas regiones pericentroméricas más extensas que las presentes en los cromosomas A.
- Todas las secuencias centroméricas y pericentroméricas de los cromosomas A también se encuentran en el B. Además, *Bilby*, *CRRye*, *ScCCS1*, *Sc192pb* y *ScCRW2* también se localizan en el brazo largo, más concretamente en los bloques heterocromáticos 2 y 3. Sin embargo, únicamente se ha detectado CENH3 en la región centromérica del B.
- En metafase I en centrómero del B todas las secuencias estudiadas se estiran de manera similar y está menos estirado hacia los polos que los centrómeros de los As.
- Las secuencias *E3900*, *D1100*, *Sc9*, *Sc21*, *Sc26*, *Sc55* y *Sc63* se localizan en la región subteloamérica del brazo largo del cromosoma B: *Sc9* es totalmente distal, *Sc21* colocaliza a nivel citológico con *E3900* en el bloque 6, *Sc26* marca los bloques 4 y 5, donde colocaliza con *D1100* que marca los bloques 4, 5 y 6, *Sc55*; *Sc63* se encuentran en los bloques 2 y 4.
- La sonda pericentromérica *ScCL11-1* además de encontrarse en los bloques 2, 3 y 4, se encuentra intercalada con *E3900* en el bloque heterocromático 6, donde se localiza la región controladora de la no disyunción. *ScCL11-1* es el único satélite descrito hasta el momento que localiza tanto en la región controladora, como en la región donde se produce la no disyunción, por tanto, es posible que esta secuencia esté relacionada con dicho mecanismo.
- El ADN mitocondrial y el del cloroplasto colocalizan a los lados del centrómero y en los bloques 1, 3 y 4. El ADN mitocondrial también se encuentra en el brazo corto, en el centrómero y en el extremo proximal del bloque 2; mientras que el ADN del cloroplasto está en la zona pericentromérica distal del brazo largo y en el extremo distal del bloque 2.

MINICROMOSOMA B

- El miniB deriva de una planta portadora de 2Iso-BL, es un cromosoma lineal, su estructura es asimétrica y está formado por secuencias que se localizan en el centrómero y regiones pericentroméricas del cromosoma B.
- Los diferentes cruzamientos realizados han demostrado que la transmisión del miniB es baja, además muestra inestabilidad mitótica en células del tapete y en células del meristemo apical radicular. También sufre inestabilidad mitótica previa a la meiosis, además de inestabilidad meiótica. La inestabilidad tanto mitótica como meiótica es debida principalmente a no disyunción de las cromátidas hermanas y la formación de micronúcleos.
- No se han observado diferencias significativas en el tamaño ni en la intensidad de las señales de CENH3 entre los centrómeros de los cromosomas A y el centrómero del cromosoma B. Sin embargo, las señales de CENH3 en el miniB son más pequeñas pudiendo ser una de las razones de sus problemas para migrar a los polos.

ISOCROMOSOMA-BL ASIMÉTRICO DE DELECCIÓN

- El adIso-BL tiene una estructura similar a un Iso-BL pero tiene una deficiencia de aproximadamente un tercio en uno de sus brazos.
- El adIso-BL se formó a partir de un Iso-BL dicéntrico, que a su vez se formó a partir de 2Iso-BL. El punto de rotura se encuentra en la zona media del bloque heterocromático 4, entre las señales de *ScCL11* y *D1100*.
- Como consecuencia de la rotura, se produjo una amplificación de la heterocromatina, quedando ese extremo formado por cinco repeticiones de la parte proximal del bloque heterocromático 4, lo cual fue detectado por medio de *Sc55* y *Sc63*.

ANÁLISIS MEIÓTICO DEL CROMOSOMA B DE CENTENO Y DERIVADOS

- La sinapsis del cromosoma B de centeno es asincrónica respecto a los cromosomas A. Puede adelantar el inicio de la sinapsis a leptotena, puede no completarla en paquitena y puede ser asináptico.
- Cuando dos cromosomas B se encuentran desapareados durante la profase I, se puede dar autoapareamiento en baja frecuencia, alcanzando valores máximos en paquitena. En plantas con un único cromosoma B, el autoapareamiento aumenta significativamente a partir de leptotena, pudiéndose apreciar diferentes configuraciones de autoapareamiento en las cuales están implicadas tanto la región distal del brazo largo como la región centromérica y pericentromérica.
- En plantas con 2Bs, en metafase I se han observado quiasmas en el brazo corto, quiasmas distales e intersticiales en el brazo largo y quiasmas en ambos brazos. Sin embargo, el porcentaje de bivalentes con quiasma en el brazo largo es muy superior a los que tienen el quiasma en el brazo corto.
- En diadas y tétradas de plantas con 2Bs el porcentaje de núcleos con el cromosoma accesorio es menor del esperado, debido a que los Bs en ocasiones separan cromátidas en anafase I o se pierden como micronúcleos. En plantas con 1B el número de núcleos que portan el cromosoma accesorio es significativamente menor. Esto es debido a la falta de cromosoma homólogo y al autoapareamiento.
- La frecuencia de apareamiento del adIso-BL durante la profase I es significativamente mayor a la frecuencia de apareamiento observada en el cromosoma B y el adIso-BL muestra un menor retraso en el progreso de la sinapsis respecto a los As.
- La delección distal y posterior amplificación de secuencias en uno de los brazos largos, suprime el apareamiento intracromosómico del adIso-BL evitando la formación de univalentes en anillo. Por tanto, la frecuencia de bivalentes es significativamente mayor que la frecuencia de bivalentes que forman 2Iso-BL y más del doble que la frecuencia de

bivalentes del cromosoma B estándar. La frecuencia de quiasmas en el brazo delecionado y en el brazo intacto del adlso-BL son muy similares.

- En diadas y tétradas, la frecuencia de núcleos con adlso-BL es significativamente mayor que la frecuencia de núcleos portadores del cromosoma B estándar, de manera que el adlso-BL se transmitirá mejor a la descendencia.

NUEVAS VARIACIONES CROMOSÓMICAS

- El estudio de la sinapsis ha permitido detectar una translocación natural entre el adlso-BL y dos cromosomas A, en la que está implicada la región distal del adlso-BL marcada por *D1100*. Esta translocación está disminuyendo la tasa de transmisión del adlso-BL y en metafase I hay un significativo descenso en el número de bivalentes totales.
- Se ha descubierto un B con una inversión paracéntrica que implica la región media del brazo largo, más concretamente el bloque 3 y la mitad del bloque 4.

BIBLIOGRAFÍA



Abbo, S., Dunford, R. P., Foote, T. N., Reader, S. M., Flavell, R. B., & Moore, G. (1995). Organization of retro-element and stem-loop repeat families in the genomes and nuclei of cereals. *Chromosome research*, 3(1), 5–15.

Alfenito, M. R., & Birchler, J. A. (1993). Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics*, 135(2), 589–597.

Allshire, R. C., & Karpen, G. H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature reviews. Genetics*, 9(12), 923–937.

Aragón-Alcaide, L., Miller, T., Schwarzacher, T., Reader, S., & Moore, G. (1996). A cereal centromeric sequence. *Chromosoma*, 105(5), 261–268.

Bhalla, N., & Dernburg, A. F. (2008). Prelude to a division. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 397–424.

Banaei-Moghaddam, A. M., Meier, K., Karimi-Ashtiyani, R., & Houben, A. (2013). Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *The Plant cell*, 25(7), 2536–2544.

Banaei-Moghaddam, A. M., Schubert, V., Kumke, K., Weiß, O., Klemme, S., Nagaki, K., Macas, J., González-Sánchez, M., Heredia, V., Gómez-Revilla, D., González-García, M., Vega, J. M., Puertas, M. J., & Houben, A. (2012). Nondisjunction in favor of a chromosome: the mechanism of rye B chromosome drive during pollen mitosis. *The Plant cell*, 24(10), 4124–4134.

Barra, V., & Fachinetti, D. (2018). The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nature communications*, 9(1), 4340.

Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P., & Allshire, R. C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), 2539–2542.

Birchler J. A. (2014). Engineered minichromosomes in plants. *Current opinion in plant biology*, 19, 76–80.

Birchler, J. A., & Han, F. (2013). Meiotic behavior of small chromosomes in maize. *Frontiers in Plant Science*, (4): 505.

Blunden, R., Wilkes, T. J., Forster, J. W., Jimenez, M. M., Sandery, M. J., Karp, A., & Jones, R. N. (1993). Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome*, 36(4), 706–711.

Bouzinba-Segard, H., Guais, A., & Francastel, C. (2006). Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8709–8714.

Brar, G. A., & Amon, A. (2008). Emerging roles for centromeres in meiosis I chromosome segregation. *Nature reviews. Genetics*, 9(12), 899–910.

Cahoon, C. K., & Hawley, R. S. (2016). Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nature structural & molecular biology*, 23(5), 369–377.

Camacho, J. P., Sharbel, T. F., & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1394), 163–178.

Carchilan, M., Delgado, M., Ribeiro, T., Costa-Nunes, P., Caperta, A., Morais-Cecílio, L., Jones, R. N., Viegas, W., & Houben, A. (2007). Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *The Plant cell*, 19(6), 1738–1749.

Carlson, W. R., & Chou, T. S. (1981). B Chromosome Nondisjunction in Corn: Control by Factors near the Centromere. *Genetics*, *97*(2), 379–389.

Caro, P., Gómez, J., Arduini, A., González-Sánchez, M., González-García, M., Borrás, C., Viña, J., Puertas, M. J., Sastre, J., & Barja, G. (2010). Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion*, *10*(5), 479–486.

Cheng Y. M. (2010). Evolution of the heterochromatic regions on maize B long arm based on the sequence structure of CL-repeat variants. *Chromosome research*, *18*(5), 605–619.

Cheng, Z. J., & Murata, M. (2003). A centromeric tandem repeat family originating from a part of Ty3/gypsy-retroelement in wheat and its relatives. *Genetics*, *164*(2), 665–672

Cheng, Y. M., & Lin, B. Y. (2003). Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*, *164*(1), 299–310.

Cheng, Y. M., & Lin, B. Y. (2004). Molecular organization of large fragments in the maize B chromosome: indication of a novel repeat. *Genetics*, *166*(4), 1947–1961.

Chiatante, G., Giannuzzi, G., Calabrese, F. M., Eichler, E. E., & Ventura, M. (2017). Centromere destiny in dicentric chromosomes: new insights from the evolution of human chromosome 2 ancestral centromeric region. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(7), 1669–1681.

Csonka, E., Cserpán, I., Fodor, K., Holló, G., Katona, R., Keresö, J., Praznovszky, T., Szakál, B., Telenius, A., deJong, G., Udvardy, A., & Hadlaczky, G. (2000). Novel generation of human satellite DNA-based artificial chromosomes in mammalian cells. *Journal of cell science*, *113* (Pt 18), 3207–3216.

D'Ambrosio, U., Alonso-Lifante, M. P., Barros, K., Kovařík, A., Mas de Xaxars, G., & Garcia, S. (2017). B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *The New phytologist*, *216*(3), 635–642.

Endo, T. R., Nasuda, S., Jones, N., Dou, Q., Akahori, A., Wakimoto, M., Tanaka, H., Niwa, K., & Tsujimoto, H. (2008). Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background. *Genes & genetic systems*, *83*(1), 23–30.

Earnshaw, W. C., & Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, *91*(3-4), 313–321.

Ekwall K. (2004). The roles of histone modifications and small RNA in centromere function. *Chromosome research*, *12*(6), 535–542.

Feng, C., Yuan, J., Bai, H., Liu, Y., Su, H., Liu, Y., Shi, L., Gao, Z., Birchler, J. A., & Han, F. (2019). The deposition of CENH3 in maize is stringently regulated. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *102*(1), 6–17.

Francki M. G. (2001). Identification of Bilby, a diverged centromeric Ty1-copia retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). *Genome*, *44*(2), 266–274.

Fu, S., Gao, Z., Birchler, J., & Han, F. (2012). Dicentric chromosome formation and epigenetics of centromere formation in plants. *Journal of genetics and genomics*, *39*(3), 125–130.

Fu, S., Lv, Z., Guo, X., Zhang, X., & Han, F. (2013). Alteration of terminal heterochromatin and chromosome rearrangements in derivatives of wheat-rye hybrids. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, *40*(8), 413–420.

Gaeta, R. T., Masonbrink, R. E., Krishnaswamy, L., Zhao, C., & Birchler, J. A. (2012). Synthetic chromosome platforms in plants. *Annual review of plant biology*, *63*, 307–330.

Gaeta, R. T., & Krishnaswamy, L. (2011). Engineered plant minichromosomes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *701*, 131–146.

Gaeta, R. T., Masonbrink, R. E., Zhao, C., Sanyal, A., Krishnaswamy, L., & Birchler, J. A. (2013). In vivo modification of a maize engineered minichromosome. *Chromosoma*, *122*(3), 221–232.

Gao, J., & Colaiácovo, M. P. (2018). Zipping and Unzipping: Protein modifications regulating synaptonemal complex dynamics. *Trends in genetics: TIG*, *34*(3), 232–245.

Gartenberg M. (2009). Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosome research*, *17*(2), 229–238.

Giraldez, R., Lacadena, J.R. (1978). Relationships between frequency, localization and errors in chiasma formation in desynaptic rye. *Chromosoma* *66*: 193-204

González-García M. (2011). Análisis funcional y estructural de los centrómeros de trigo y centeno. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

González-García, M., González-Sánchez, M., & Puertas, M. J. (2006). The high variability of subtelomeric heterochromatin and connections between nonhomologous chromosomes, suggest frequent ectopic recombination in rye meiocytes. *Cytogenetic and genome research*, *115*(2), 179–185.

Gotoh K. (1924). Über die Chromosomenzahl von *Secale cereale*, L. Bot. Mag. (Tokyo) *38*:135-152.

Gregory T. R. (2005). The evolution of the genome. *Elsevier*.

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

Han, F., Lamb, J. C., & Birchler, J. A. (2006). High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3238–3243.

Han, F., Gao, Z., Yu, W., & Birchler, J. A. (2007). Minichromosome analysis of chromosome pairing, disjunction, and sister chromatid cohesion in maize. *The Plant cell*, 19(12), 3853–3863.

Han, F., Lamb, J. C., McCaw, M. E., Gao, Z., Zhang, B., Swyers, N. C., & Birchler, J. A. (2018). Meiotic studies on combinations of chromosomes with different sized centromeres in maize. *Frontiers in plant science*, 9, 785.

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

Henikoff, S., Ahmad, K., & Malik, H. S. (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1098–1102.

Hobza, R., Cegan, R., Jesionek, W., Kejnovsky, E., Vyskot, B., & Kubat, Z. (2017). Impact of repetitive elements on the Y chromosome formation in plants. *Genes*, 8(11), 302

Ito, H., Nasuda, S., & Endo, T. R. (2004). A direct repeat sequence associated with the centromeric retrotransposons in wheat. *Genome*, 47(4), 747–756.

Jensen C. G. (1982). Dynamics of spindle microtubule organization: kinetochore fiber microtubules of plant endosperm. *The Journal of cell biology*, 92(2), 540–558.

Jiménez, M., Díez, M., & Santos, J. L. (1994). Synaptic patterns of rye B chromosomes. III. The deficient B. *Chromosome research*, 2(2), 93–98.

Jiménez, G., Manzanero, S., & Puertas, M. J. (2000). Relationship between pachytene synapsis, metaphase I associations, and transmission of 2B and 4B chromosomes in rye. *Genome*, 43(2), 232–239.

Jiménez, M., Romera, F., González-Sánchez, M., & Puertas, M.J. (1997). Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. III. Male meiosis and gametogenesis. *Heredity* 78, 636–644.

Jin, W., Melo, J. R., Nagaki, K., Talbert, P. B., Henikoff, S., Dawe, R. K., & Jiang, J. (2004). Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *The Plant cell*, 16(3), 571–581.

Jin, W., Lamb, J. C., Vega, J. M., Dawe, R. K., Birchler, J. A., & Jiang, J. (2005). Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere. *The Plant cell*, 17(5), 1412–1423.

Jones, G.H. (1969). Further correlations between chiasma and U-type exchanges in rye meiosis. *Chromosoma*, 26:105-118

Jones, G.H., Brumpton, R.J. (1971). Sister and non-sister chromatid U-type exchange in rye meiosis. *Chromosoma*, 33:115-128.

Jones, R.N. (1991). B-Chromosome drive. *The American Naturalist*, a 137:430–442.

Jones, R.N. (1995). B chromosomes in plants. *New Phytologist*, 131:411–434.

Jones, R.N. (2018). Transmission and drive involving parasitic B chromosomes. *Genes*, 9(8): 388.

Jones, R. N., González-Sánchez, M., González-García, M., Vega, J. M., & Puertas, M. J. (2008). Chromosomes with a life of their own. *Cytogenetic and genome research*, 120(3-4), 265–280.

Jones, R.N., & Rees, H. (1982). B chromosomes. Academic Press, London.

Jones, R.N., & Puertas, M.J. (1993). The B-chromosomes of rye (*Secale cereale* L.). *Frontiers in plant science research*. (Delhi, India: Bhagwati Enterprises). 81–112.

Kapusi, E., Ma, L., Teo, C. H., Hensel, G., Himmelbach, A., Schubert, I., Mette, M. F., Kumlehn, J., & Houben, A. (2012). Telomere-mediated truncation of barley chromosomes. *Chromosoma*, 121(2), 181–190.

Kaszás, E., & Birchler, J. A. (1996). Misdivision analysis of centromere structure in maize. *The EMBO journal*, 15(19), 5246–5255.

Kato, A., Lamb, J. C., & Birchler, J. A. (2004). Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13554–13559.

Kato, A., Zheng, Y. Z., Auger, D. L., Phelps-Durr, T., Bauer, M. J., Lamb, J. C., & Birchler, J. A. (2005). Minichromosomes derived from the B chromosome of maize. *Cytogenetic and genome research*, 109(1-3), 156–165.

Khazanehdari, K. A., & Jones, G. H. (1996). Meiotic synapsis of the *Allium porrum* B chromosome: evidence for a derived isochromosome origin. *Genome*, 39(6), 1199–1204.

Kishikawa H. (1965). Cytogenetic studies of B-chromosomes in rye, *Secale cereale* L. *Agric. Bull. Saga Univ.* 21:1-81.

Kleckner N. (1996). Meiosis: how could it work? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8167–8174.

Klemme, S., Banaei-Moghaddam, A. M., Macas, J., Wicker, T., Novák, P., & Houben, A. (2013). High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *The New phytologist*, 199(2), 550–558.

Koo, D. H., Han, F., Birchler, J. A., & Jiang, J. (2011). Distinct DNA methylation patterns associated with active and inactive centromeres of the maize B chromosome. *Genome research*, 21(6), 908–914.

Kuwada Y. (1925). On the number of chromosomes in maize. *Bot. Mag. (Tokyo)* 39:227-234.

Lacadena J.R. (1996). Citogenética. Editorial Complutense.

Lamb, J. C., Kato, A., & Birchler, J. A. (2005). Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma*, 113(7), 337–349.

Leach, C. R., Houben, A., Field, B., Pistrick, K., Demidov, D., & Timmis, J. N. (2005). Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics*, 171(1), 269–278.

Lee WJ. (1963). Frequency and geographical distribution of rye (*Secale cereale*) with accessory chromosomes in Korea. Preliminary report. *Kor. J. Bot.* 6, 15-17.

Lee WJ. (1966). On accessory chromosomes in *Secale cereale*. III. Relationship between the frequency of accessory chromosomes in rye and soil properties. *Kor. J. Bot.* 9,33–38.

Lee WJ. (1976). Frequency of rye (*Secale cereale*) with B chromosomes in Yechon Area. *Kor. J. Breeding* 8, 153-155.

Lee WJ. (1981). Frequency of B chromosomes in rye (*Secale cereale*) cultivated in Paldang. *Kor. J. Bot.* 24, 181—190.

Lee, W.J., & Min, B.R. (1965). On accessory chromosomes in *Secale cereale*. I. Frequency and geographical distribution of plants with accessory chromosomes in Korea. *Kor. J. Bot.* 8, 41-46.

Lee, W.J., Min, B.R. (1966). Frequency and geographical distribution of rye with accessory chromosomes in Korea. *Wheat 1nJ Ser.* 21, 27-29.

Lee, W.J., Min, B.R. (1968). On accessory chromosomes in *Secale cereale*. IV. Further study on frequency and geo-graphical distribution of rye with accessory chromosomes in Korea. *Kor. J. Bot.* 11, 71—35.

Lima-de-Faria A. (1952). Chromomere analysis of the chromosome complement of rye. *Chromosoma.* 5(1):1-68.

Lima-de-Faria A. (1962). Genetic interaction in rye expressed at the chromosome phenotype. *Genetics* 47:1455-1462.

Lima-de-Faria A. (1963). The evolution of the structural pattern in a rye B chromosome. *Evolution* 17(3): 289-295.

Liu, Z., Yue, W., Li, D., Wang, R. R., Kong, X., Lu, K., Wang, G., Dong, Y., Jin, W., & Zhang, X. (2008). Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma*, 117(5), 445—456.

Liu, W., Yuan, J. S., & Stewart, C. N., Jr (2013). Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nature reviews. Genetics*, 14(11), 781—793.

Longley A. E. (1927). Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. *Journal of Agriculture Research.* 35:769-784.

Lukaszewski A. J. (1997). The development and meiotic behavior of asymmetrical isochromosomes in wheat. *Genetics*, 145(4), 1155–60.

Lukaszewski A. J. (2008). Unexpected behavior of an inverted rye chromosome arm in wheat. *Chromosoma*, 117(6), 569–578.

Lukaszewski, A.J., & Curtis, C.A. (1993). Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theoretical and Applied Gen.*, 86(1), 121–7.

Ma, W., Gabriel, T. S., Martis, M. M., Gursinsky, T., Schubert, V., Vrána, J., Doležel, J., Grundlach, H., Altschmied, L., Scholz, U., Himmelbach, A., Behrens, S. E., Banaei-Moghaddam, A. M., & Houben, A. (2017). Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog. *The New phytologist*, 213(2), 916–928.

Manzanero, S., Arana, P., Puertas, M. J., & Houben, A. (2000). The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma*, 109(5), 308–317.

Manzanero, S., Vega, J. M., Houben, A., & Puertas, M. J. (2002). Characterization of the constriction with neocentric activity of 5RL chromosome in wheat. *Chromosoma*, 111(4), 228–235.

Marques, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S., Blattner, F. R., Niwa, K., Guerra, M., & Houben, A. (2013). B chromosomes of rye are highly conserved and accompanied the development of early agriculture. *Annals of botany*, 112(3), 527–534.

Marques, A., Klemme, S., & Houben, A. (2018). Evolution of plant B chromosome enriched sequences. *Genes*, 9, 515. *Genes*, 10(2), 85.

Marschner, S., Meister, A., Blattner, F. R., & Houben, A. (2007). Evolution and function of B chromosome 45S rDNA sequences in *Brachycome dichromosomatica*. *Genome*, *50*(7), 638–644.

Martis, M. M., Klemme, S., Banaei-Moghaddam, A. M., Blattner, F. R., Macas, J., Schmutzer, T., Scholz, U., Gundlach, H., Wicker, T., Šimková, H., Novák, P., Neumann, P., Kubaláková, M., Bauer, E., Haseneyer, G., Fuchs, J., Doležel, J., Stein, N., Mayer, K. F., & Houben, A. (2012). Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(33), 13343–13346.

Matsuo, M., Ito, Y., Yamauchi, R., & Obokata, J. (2005). The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *The Plant cell*, *17*(3), 665–675.

McClintock B. (1931). Cytological observations of deficiencies involving know genes, translocations and an inversion in *Zea mais*. *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn.* 163:1-30.

McClintock B. (1933). The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Cell and Tissue Research*.

McClintock B. (1938). The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn.* 290:1-48.

Mette, M. F., & Houben, A. (2015). Engineering of plant chromosomes. *Chromosome research*, *23*(1), 69–76.

Mercier, R., Mézard, C., Jenczewski, E., Macaisne, N., & Grelon, M. (2015). The molecular biology of meiosis in plants. *Annual review of plant biology*, *66*, 297–327.

Morgan-Richards M. (2000). Robertsonian translocations and B chromosomes in the Wellington tree weta, *Hemideina crassidens* (Orthoptera: Anostostomatidae). *Hereditas*, 32(1):49-54.

Morey, C., & Avner, P. (2004). Employment opportunities for non-coding RNAs. *FEBS letters*, 567(1), 27–34.

Muntzig A. (1944). Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. I. Isofragments produced by misdivisión. *Hereditas* 30,231-248.

Müntzing A. (1948). Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye V: A new fragment type arisen by deletion. *Hereditas*, 34(1), 435–442.

Muntzing A. (1954). Cytogenetics of accessory chromosomes (B-chromosomes). *Caryologia*, Vol. Suppl. 6, 282—301.

Muntzing A. (1957a). Frequency of accessory chromosomes in rye strains from Iran and Korea. *Hereditas*, 43: 682-685.

Muntzing A. (1957b). Frequency of accessory chromosomes in rye from Korea. *Wheat Inf Ser.*, 5, 16-18

Muntzig, A., & Lima-De-Faria, A. (1953). Pairing and transmission of a small accessory iso-chromosome in rye. *Chromosoma*, 6(2), 142–148.

Murata M. (2014). Minichromosomes and artificial chromosomes in Arabidopsis. *Chromosome Research*. 22(2), 167-178.

Nagaki, K., Cheng, Z., Ouyang, S., Talbert, P. B., Kim, M., Jones, K. M., Henikoff, S., Buell, C. R., & Jiang, J. (2004). Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature genetics*, 36(2), 138–145

Nakata, N., Yasumuro, Y., & Sasaki, M. (1986). Midget chromosome found in common wheat cv. Chinese Spring with rye cytoplasm. *Wheat Inf. Serv.* 63: 39–41.

Naranjo T. (2012). Finding the correct partner: the meiotic courtship. *Scientifica*, 509073.

Naranjo T. (2014). Dynamics of rye telomeres in a wheat background during early meiosis. *Cytogenetic and Genome Research*, 143(1–3), 60–68.

Naranjo, T. (2015). Forcing the shift of the crossover site to proximal regions in wheat chromosomes. TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik*, 128(9), 1855–1863.

Navarro-Domínguez, B., Ruiz-Ruano, F.J., Cabrero, J., Corral, J.M., López-León, M.D., Sharbel, T.F., & Camacho, J.P. (2017). Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Scientific reports*, 7, 45200.

Parker, J.S., Ainsworth, C.C. & Taylor, S. (1978). The B-chromosome system of *Hypochoeris maculata*. *Chromosoma* 67, 123–143.

Pattabiraman, D., Roelens, B., Woglar, A., & Villeneuve, A. M. (2017). Meiotic recombination modulates the structure and dynamics of the synaptonemal complex during *C. elegans* meiosis. *PLoS genetics*, 13(3), e1006670.

Perpelescu, M., & Fukagawa, T. (2011). The ABCs of CENPs. *Chromosoma*, 120(5), 425–446.

Peterson, J. B., & Ris, H. (1976). Electron-microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 22(2), 219–242.

Pradillo, M., López, E., Romero, C., Sánchez-Morán, E., Cuñado, N., & Santos, J. L. (2007). An analysis of univalent segregation in meiotic mutants of *Arabidopsis thaliana*: a possible role for synaptonemal complex. *Genetics*, 175(2), 505–511.

Puertas, M.J., González-Sánchez, M., Manzanero, S., Romera, F., & Jiménez, M.M. (1998). Genetic control of the rate of transmission of the rye B chromosome. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. *Heredity*. 80:208-213.

Puertas, M.J., Jiménez, G., Manzanero, S., Chiavarino, A.M., Rosato, M., Naranjo, C.A., & Poggio, L. (2000). Genetic control of B chromosome transmission in maize and rye. *In Chromosomes Today* (pp. 79–92).

Rees, H., & Thompson, J.B. (1955). Localisation of chromosome breakeage at meiosis. *Heredity* 9:399-407.

Richards, E. J., & Ausubel, F. M. (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 53(1), 127–136.

Riera, L., Petitpierre, E., Juan, C., Cabrero, J., & Camacho, J. P. (2004). Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Journal of evolutionary biology*, 17(3), 716–719

Roman H. (1947). Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. *Genetics*. 32(4):391-409.

Roman H. (1948). Directed Fertilization in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 34(2), 36–42.

Romera, F., Vega, J. M., Diez, M., & Puertas, M. J. (1989). B chromosome polymorphism in Korean rye populations. *Heredity*, 62 (Pt 1), 117–121.

Rosato, M., Chiavarino, A., Naranjo, C., Hernandez, J., & Poggio, L. (1998). Genome size and numerical polymorphism for the B chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *American journal of botany*, 85(2), 168.

Rošić, S., Köhler, F., & Erhardt, S. (2014). Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *The Journal of cell biology*, 207(3), 335–349.

Ruban, A., Fuchs, J., Marques, A., Schubert, V., Soloviev, A., Raskina, O., Badaeva, E., & Houben, A. (2014). B chromosomes of *Aegilops speltoides* are enriched in organelle genome-derived sequences. *PloS one*, 9(2), e90214.

Ruban, A., Schmutzer, T., Wu, D. D., Fuchs, J., Boudichevskaia, A., Rubtsova, M., Pistrick, K., Melzer, M., Himmelbach, A., Schubert, V., Scholz, U., & Houben, A. (2020). Supernumerary B chromosomes of *Aegilops speltoides* undergo precise elimination in roots early in embryo development. *Nature communications*, 11(1), 2764.

Ruiz-Estévez, M., López-León, M. D., Cabrero, J., & Camacho, J. P. (2012). B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PloS one*, 7(5), e36600.

Ruiz-Estévez, M., Badisco, L., Broeck, J.V., Perfectti, F., López-León, M.D., Cabrero, J., & Camacho, J.P. (2014). B chromosomes showing active ribosomal RNA genes contribute insignificant amounts of rRNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Molecular genetics and genomics: MGG*, 289(6), 1209–1216.

Sandery, M.J., Forster, J.W., Blunden, R., & Jones, R.N. (1990). Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome* 33:908-913.

Santos, J.L., Jiménez, M.M. & Díez, M. (1993). Synaptic patterns of rye B chromosomes. I: The standard type. *Chromosome Research*, 1(3), 145–52.

Santos, J. L., Jiménez, M. M. & Díez, M. (1994). Meiosis in haploid rye: extensive synapsis and low chiasma frequency. *Heredity*, 73(6), 580–588.

Santos, J.L., Jimenez, M. & Díez, M. (1995). Synaptic patterns of rye B chromosomes. IV. The B isochromosomes. *Heredity*, 74, 100–107.

Schlegel, R., & Pohler, W. (1994). Identification of an A-B translocation in diploid rye. *Breed. Sci.* 44:279-283.

Schubert I. (2001). Alteration of chromosome numbers by generation of minichromosomes -- is there a lower limit of chromosome size for stable segregation? *Cytogenetics and cell genetics*, 93(3-4), 175–181.

Sheppard, A. E., & Timmis, J. N. (2009). Instability of plastid DNA in the nuclear genome. *PLoS genetics*, 5(1), e1000323.

Stark, E. A., Connerton, I., Bennett, S. T., Barnes, S. R., Parker, J. S., & Forster, J. W. (1996). Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome research*: 4(1), 15–23.

Stimpson, K. M., Matheny, J. E., & Sullivan, B. A. (2012). Dicentric chromosomes: Unique models to study centromere function and inactivation. *Chromosome Research*, 20(5), 595–605.

Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2009). Chromatin-based transcriptional punctuation. *Genes & development*, 23(9), 1037–1041.

Teo, C. H., Ma, L., Kapusi, E., Hensel, G., Kumlehn, J., Schubert, I., Houben, A., & Mette, M. F. (2011). Induction of telomere-mediated chromosomal truncation and stability of truncated chromosomes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal*, 68(1), 28–39.

Vega, J. M., & Feldman, M. (1998). Effect of the pairing gene Ph1 on centromere misdivision in common wheat. *Genetics*, 148(3), 1285–1294.

Vega, J. M., Yu, W., Han, F., Kato, A., Peters, E. M., Zhang, Z. J., & Birchler, J. A. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of maize (*Zea mays*) with Cre-lox site specific recombination cassettes in BIBAC vectors. *Plant Molecular Biology*, 66(6), 587–598.

Warburton, P. E., Cooke, C. A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B. A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., Sullivan, K. F., Poirier, G. G., & Earnshaw, W. C. (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Current biology: CB*, 7(11), 901–904.

Warchałowska-Sliwa, E., Bugrov, A. G., Tatsuta, H., & Akimoto, S. (2001). B chromosomes, translocation between B and autosomes, and C-heterochromatin polymorphism of the grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, Acrididae) in Hokkaido, northern Japan. *Folia biologica*, 49(1-2), 63–75.

Ward E. J. (1973). The heterochromatic B chromosome of maize: The segments affecting recombination. *Chromosoma* 43: 177–186.

Wilson E. B. (1907a). The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science* 26:870-871.

Wilson E. B. (1907b). Note on the chromosome groups of *Metapodius* and *Banasa*. *Biol. Bull.* 12:303-313.

Xu, C., Cheng, Z., & Yu, W. (2012). Construction of rice mini-chromosomes by telomere-mediated chromosomal truncation. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 70(6), 1070–1079.

Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M., & Watanabe, Y. (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature*, 455(7210), 251–255.

Yu, W., Han, F., Gao, Z., Vega, J. M., & Birchler, J. A. (2007). Construction and behavior of engineered minichromosomes in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(21), 8924–8929.

Zhang, H., & Dawe, R. K. (2012). Total centromere size and genome size are strongly correlated in ten grass species. *Chromosome research*: *20*(4), 403–412.

Zhang, W., Friebe, B., Gill, B. S., & Jiang, J. (2010). Centromere inactivation and epigenetic modifications of a plant chromosome with three functional centromeres. *Chromosoma*, *119*(5), 553–563.

Zhang, P., Li, W., Fellers, J., Friebe, B., & Gill, B. S. (2004). BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*, *112*(6), 288–299.

Zickler, D., & Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual review of genetics*, *32*, 619–697.

Zickler, D., & Kleckner, N. (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *7*(6), a016626.

Zhong, X. B., Hans de Jong, J., & Zabel, P. (1996). Preparation of tomato meiotic pachytene and mitotic metaphase chromosomes suitable for fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome research*, *4*(1), 24–28.