

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS
REPRODUCTIVOS Y DE LOS MECANISMOS
DE DETERMINACIÓN SEXUAL EN EL
GÉNERO *RUMEX* (*POLYGONACEAE*)**

RAFAEL NAVAJAS PÉREZ
TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS
REPRODUCTIVOS Y DE LOS MECANISMOS
DE DETERMINACIÓN SEXUAL EN EL
GÉNERO *RUMEX* (*POLYGONACEAE*)**

Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por el licenciado
Rafael Navajas Pérez.

DIRECTORES:

Dr. Manuel Ángel Garrido Ramos

Dr. Manuel Ruiz Rejón

Granada, 2005

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados en los congresos:

- **XIV Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución, Gandía (Valencia) (Noviembre, 2002).**
- **XI International Conference on Plant Embriology, Brno (Septiembre 2003)**
- **IV Congreso de la Sociedad Española de Genética, Madrid (Septiembre 2003).**
 - **III Seminario Citogenética de la Sociedad Española de Genética, Bubión, Granada (Junio 2004)**
 - **15th Chromosome Conference, Londres (Septiembre 2004)**
 - **1st International Congress of the International Cytogenetics and Genome Society, Granada (Junio 2005)**
 - **XVII International Botanical Congreso, Viena (Junio 2005)**
- **V Congreso de la Sociedad Española de Genética. Aguadulce, Almería (Octubre 2005)**

Y publicados parcialmente en los siguientes artículos:

- **Navajas-Pérez, R., de la Herrán, R., González López, G., JAMILENA, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M.A. (2005a).** The Evolution of Reproductive Systems and Sex-Determining Mechanisms Within *Rumex* (*Polygonaceae*) Inferred from Nuclear and Chloroplastial Sequence Data. *Mol Biol Evol* 22,1929-1939.
- Navajas-Pérez, R., de la Herrán, R., JAMILENA, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M.A. (2005b).** Reduced rates of sequence evolution of Y-linked satellite DNA in *Rumex* (*Polygonaceae*). *J. Mol. Evol* 60(3), 391-399.
- Navajas-Pérez, R., Schwarzacher, T., de la Herrán, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M & Garrido-Ramos, MA. (200x).** The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives. *Gene*, *in press*.

La financiación del presente trabajo ha corrido a cargo de los siguientes proyectos de investigación:

“Análisis molecular del control genético, origen y evolución del dimorfismo sexual en Rumex acetosa. Ministerio de Ciencia y Tecnología D.G.I. (BXX2000-1144-C02). Universidades de Granada y Almería (2001-2003)”

“Evolución de la dioecia y del determinismo sexual en Rumex (Polygonaceae). Ministerio de Ciencia y Tecnología (BOS2003-08737-C02-01). Universidades de Granada y Almería (2004-2007)”

ÍNDICE.-

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- El Género *Rumex* L.

1.1.1.- Generalidades

1

1.1.2.- Clasificación

2

1.2.- Origen y Evolución de la dioecia y de los cromosomas sexuales de plantas

8

1.3.- El ADN repetido

14

1.3.1.- El ADN satélite

16

1.3.2.- El ADN ribosómico

19

1.3.3.- Evolución del ADN repetido

21

1.4.- El ADN cloroplastidial

24

1.5.- Uso del ADN ribosómico, el ADN cloroplastidial y el ADN satélite en estudios evolutivos y en análisis filogenéticos

25

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

29

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material Empleado y Procedencia del mismo

31

3.2.- Preparación del Material

31

3.3.- Aislamiento y clonación de las secuencias empleadas en esta Memoria

3.3.1.- Aislamiento y ligación de la familia de ADN satélite RUSI, obtenida mediante digestión de ADN genómico con enzimas de restricción

34

3.3.1.1.- Aislamiento del ADN mediante digestión con enzimas de restricción

34

3.3.1.2.- Ligación de unidades multiméricas de ADN satélite obtenidas mediante digestión con enzimas de restricción

36

3.3.2.- Aislamiento y clonación de las secuencias de ADN satélite, ADN ribosómico y ADN cloroplastidial obtenidas por PCR

37

3.3.2.1.- Diseño de cebadores específicos

38

3.3.2.2.- Protocolos de PCR

40

3.3.2.3.- Ligación de unidades multiméricas de ADN satélite obtenidas mediante PCR

40

3.4.- Purificación de ADN plasmídico y detección de plásmidos recombinantes

41

3.5.- Estudio de la presencia en el género *Rumex* de las cuatro familias de ADN satélite analizadas en esta Memoria mediante hibridación tipo Southern-blot y dot-blot

43

3.5.1.- Transferencia de ADN a membranas de nylon	43
3.5.2.- Hibridación tipo Southern-blot	44
3.6.- Secuenciación de los clones recombinantes positivos	45
3.7.- Análisis evolutivo de las secuencias	46
3.7.1.- Análisis de las secuencias de ADN satélite	46
3.7.2.- Análisis filogenéticos	51
3.7.2.1.- Análisis filogenéticos mediante el uso de secuencias de ADN satélite	51
3.7.2.2.- Análisis filogenéticos mediante el uso de secuencias de ADN ribosómico y cloroplastidial	51
3.8.- Técnicas citogenéticas	53
3.8.1.- Técnicas de campo claro	53
3.8.2.- Técnicas de spreading para la observación de los complejos sinaptonémicos	53
3.8.3.- Técnicas de fluorescencia	54
3.8.3.1.- Obtención de las preparaciones	54
3.8.3.2.- Localización de secuencias de ADN mediante técnicas de hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	54
3.8.4.- Visualización de las preparaciones y captura de las imágenes	58
4. RESULTADOS.-	
4.1.- Filogenia Molecular del género <i>Rumex</i>	59
4.1.1.- Análisis de las secuencias de espaciadores ribosómicos (ITS) en el género <i>Rumex</i>	59
4.1.2.- Análisis de las secuencias del intrón del gen cloroplastidial <i>trnL</i> y del espaciador entre los genes <i>trnL</i> y <i>trnF</i> en el género <i>Rumex</i> L.	62
4.1.3.- Filogenia del género <i>Rumex</i> utilizando conjuntamente el ADN ribosómico y cloroplastidial	63
4.2.- Aislamiento y caracterización de tres familias de ADN satélite de <i>Rumex acetosa</i> L.	65
4.2.1.- Familia de ADN satélite RAE180	66
4.2.2.- Familia de ADN satélite RAE730	69
4.2.3.- Familia de ADN satélite RAYSI	72
4.3.- Análisis comparativo de las diferentes familias de ADN satélite de <i>Rumex acetosa</i>	78
4.4.- Presencia de las familias de ADN satélite de <i>Rumex acetosa</i> en el género <i>Rumex</i>	80
4.4.1.- Distribución de la familia de ADN satélite RAE180	80
4.4.2.- Distribución de la familia de ADN satélite RAE730	81
4.4.3.- Distribución de la familia de ADN satélite RAYSI	81
4.4.4.- Detección de una nueva familia de ADN satélite en <i>Rumex</i>	84

4.5.- Evolución de las tres familias de ADN satélite aisladas en <i>Rumex acetosa</i>	84
4.5.1.- Familia de ADN satélite RAE180	85
4.5.1.1.- Especies con sistema cromosómico complejo XX/X ₁ Y ₂	85
4.5.1.2.- Especies con sistema cromosómico simple XX/X ₁ Y	88
4.5.2.- Familia de ADN satélite RAE730	93
4.5.3.- Familia de ADN satélite RAYSI	95
4.6.- Tasas evolutivas de las tres familias de ADN satélite RAE180, RAE730 y RAYSI	105
4.7.- Aislamiento, clonación y caracterización de la familia de ADN satélite RUSI	110
4.8.- Evolución carotípica de las especies representativas del género <i>Rumex</i> L.	116
4.8.1.- Caracterización citogenética de las especies <i>Rumex acetosa</i>, <i>Rumex acetosella</i> y <i>Rumex suffruticosus</i>	117
5. DISCUSIÓN.-	
5.1.- La evolución de los sistemas reproductivos y de los mecanismos de determinación sexual en el género <i>Rumex</i> utilizando marcadores nucleares y cloroplastidiales	125
5.2.- Utilidad del ADN satélite como marcador cladístico en el género <i>Rumex</i>	130
5.3.- Características generales de las familias de ADN satélite RAE180, RAE730, RAYSI y RUSI	133
5.4.- Evolución de los ADNs satélite RAE180, RAE730, RAYSI y RUSI	136
5.4.1.- Análisis comparativo de las tasas de evolución de RAE180, RAE730 y RAYS	136
5.4.2.- Análisis del origen y la evolución de la variabilidad de la familia de ADN satélite RAYSI en <i>Rumex acetosa</i> y especies emparentadas	140
5.4.3.- Análisis del origen y la evolución de la familia de ADN satélite RAE180 en las especies dioicas del género <i>Rumex</i>	145
5.4.4.- Equilocalidad y evolución concertada: la familia de ADN satélite RUSI	147
5.5.- Evolución de los sistemas de cromosomas sexuales en el género <i>Rumex</i>	149
6. CONCLUSIONES.-	
6.- Conclusiones	155
7. BIBLIOGRAFÍA	
7.- Bibliografía	161

8. APÉNDICES

8.1.- Apéndices	183
8.2.- Publicaciones	245

LISTADO DE FIGURAS.-

- Figura 1.** Representación esquemática de la unidad ribosómica 45S de plantas
- Figura2.** Representación esquemática de la distribución de los cebadores empleados para amplificar las regiones correspondientes **(A)** En la unidad 45S **(B)** En la zona de ADN cloroplastidial estudiada
- Figura3.** Representación esquemática del diseño de cebadores para la amplificación de unidades repetitivas de ADN satélite
- Figura 4.** Representación gráfica de los distintos estadios de transición en el proceso de homogenización de una familia de ADN satélite (modificado de Pons)
- Figura 5.** Archivo de salida del programa satDNA, en el que se muestra el alineamiento con las distintas posiciones indicadas según un código de colores y una tabla resumen
- Figura 6.** Alineamiento de las secuencias ITS1 analizadas en esta Memoria, indicando las deleciones diagnósticas de cada grupo
- Figura 7.** Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud usando las secuencias de ITS analizadas en esta Memoria
- Figura 8.** Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud usando las secuencias cloroplastidiales analizadas en esta Memoria
- Figura 9.** Árbol resumen de la filogenia molecular de *Rumex* (**lzqda.**) Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud combinando las secuencias nucleares y cloroplastidiales analizadas en esta Memoria (**Dcha.**) Árbol mostrando la correlación entre la filogenia y la evolución de los sistemas reproductivos y de los números cromosómicos básicos
- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de los distintos amplificados de PCR de las secuencias del ADN satélite RAE180 en *R. acetosa*
- Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa de los distintos amplificados de PCR de las secuencias del ADN satélite RAE730 en *R. acetosa*
- Figura 12.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre ADN genómico de machos y hembras de *R. acetosa* digerido con distintas enzimas de restricción

- Figura 13.** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre cromosomas metafásicos de *R. acetosa*
- Figura 14.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición RAE730 sobre ADN genómico de machos y hembras de *R. acetosa* digerido con distintas enzimas de restricción
- Figura 15.** Análisis de la evolución de las unidades de repetición de RAE730 **(A)** Alineamiento de un monómero RAE730 en subunidades de 120 pb **(B)** Árbol neighbor joining (NJ) usando las subrepeticiones de 120 pb
- Figura 16.** Alineamiento de la primera parte de un monómero de RAE730 con la segunda, en unidades de aproximadamente 360 pb
- Figura 17.** **(A)** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE730 sobre cromosomas metafásicos de *R. acetosa* **(B)** Cromosomas metafásicos de *R. acetosa* contrateñidos con DAPI
- Figura 18.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición RAYSI sobre ADN genómico de machos y hembras de *R. acetosa* digerido con distintas enzimas de restricción
- Figura 19.** Árbol NJ de las secuencias de RAYSI de *R. acetosa*, indicando la presencia de dos tipos de subfamilia, RAYSI-S y RAYSI-J
- Figura 20.** Análisis de la evolución de las unidades de repetición de RAYSI **(A)** Alineamiento de un monómero RAYSI en subunidades de 120 pb **(B)** Árbol NJ usando las subrepeticiones de 120 pb
- Figura 21.** **(A)** Hibridación *in situ* de utilizando como sonda las unidades de repetición de RAYSI-S y RAYSI-J y contrateñición con yoduro de propidio **(B-E)** Hibridación *in situ* utilizando las sondas pertenecientes a cada subfamilia marcadas diferencialmente
- Figura 22.** Árbol NJ de las unidades de 360 pb procedentes de RAE730 (rae) y RAYSI (ray)
- Figura 23.** Esquema evolutivo de la aparición de las actuales familias de ADN satélite RAE730 y RAYSI
- Figura 24.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RAE180 sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*

- Figura 25.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RAE730 sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*
- Figura 26.** **(A)** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RAE180 sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex* **(B)** Hibridación tipo *dot-blot*
- Figura 27.** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*
- Figura 28.** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre cromosomas meióticos de *R. suffruticosus*
- Figura 29.** Electroforesis en gel de agarosa del amplificado de PCR de 800 pb correspondiente a la unidad de repetición del ADN satélite RAE180 en *R. acetosella*
- Figura 30.** Representación esquemática de la estructura de la unidad de repetición de RAE180 en *R. acetosella*
- Figura 31.** Árbol NJ de todas las subunidades que constituyen las repeticiones de 800 pb de RAE180 de *R. acetosella* que se han analizado en esta Memoria
- Figura 32.** **(A)** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE730 sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris* **(B)** Cromosomas metafásicos de *R. papillaris* contrateñidos con DAPI
- Figura 33.** Árbol NJ de todas las secuencias de RAE730 de *R. acetosa* y *R. papillaris* analizadas en esta Memoria
- Figura 34.** Electroforesis en gel de agarosa en la que se muestran los amplificados de PCR del ADN satélite RAYSI según la combinación de cebadores utilizada en las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*
- Figura 35.** Árbol NJ de todas las secuencias de RAYSI de *R. papillaris* analizadas en esta Memoria
- Figura 36.** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAYSI sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*
- Figura 37.** Hibridación *in situ* fluorescente doble usando como sondas las unidades de repetición RAE180 u RAYSI sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*

- Figura 38.** Árbol NJ de las secuencias de RAYSI de *R. intermedius*, indicando la presencia de dos tipos de subfamilia, INT-A e INT-B
- Figura 39.** Alineamiento de las secuencias consenso de cada una de los tipos de RAYSI analizados en esta Memoria (RAYSI-J de *R. acetosa* y *R. papillaris*, RAYSI-S de *R. acetosa* e INT-A e INT-B de *R. intermedius*) indicando las posiciones fijadas (**cajas**) y las posiciones polimórficas (**sombreado**).
- Figura 40.** Alineamiento de las subunidades de 120 pb de RAYSI en las especies *R. papillaris* y *R. intermedius*
- Figura 41.** Árbol NJ de todas las secuencias de RAYSI procedentes de *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius* analizadas en esta Memoria
- Figura 42.** Árbol NJ de todas las secuencias de RAE180 aisladas de *R. acetosa* y *R. papillaris* analizadas en esta Memoria
- Figura 43.** Árbol NJ de todas las secuencias de RAYSI-J aisladas de *R. acetosa* y *R. papillaris* analizadas en esta Memoria
- Figura 44.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RUSI sobre ADN genómico de *R. induratus* y *R. scutatus* digerido con distintas enzimas de restricción
- Figura 45.** Electroforesis en gel de agarosa de los distintos amplificadores de PCR de las secuencias del ADN satélite RUSI en *R. induratus* y *R. scutatus*
- Figura 46.** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RUSI sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*
- Figura 47.** Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición de RUSI sobre cromosomas metafásicos de *R. induratus*
- Figura 48.** Árbol NJ de todas las secuencias de RUSI aisladas de *R. induratus* y *R. scutatus* analizadas en esta Memoria
- Figura 49:** Placas metafásicas **(A)** del nivel diploide de la especie *R. maderensis* y **(B)** del nivel tetraploide de la especie *R. induratus*. **(C)** Anafase I de *R. bucephalophorus*.
- Figura 49.** **(A-B)** Cariotipo de la especie tetraploide *R. induratus* **(B)** Cariotipo de la especie diploide *R. maderensis*

- Figura 50.** *R. acetosa* **(A)** Placa metafísica de un macho de *R. acetosa* **(B)** Diplotene de un macho de *R. acetosa* **(C)** Detalle de los cromosomas Y de *R. acetosa*, mostrando hibridación positiva con las distintas subfamilias RAYSI **(E)** Hibridación de la unidad ribosómica 45S en cromosomas meióticos de *R. acetosa*.
- Figura 51.** **(A)** Visualización de los complejos sinaptonémicos de *R. acetosa* y **(B)** su interpretación
- Figura 52:** *R. acetosella* **(A)** Placa metafísica del nivel tetraploide de *R. acetosella* **(B-D)** Cromosomas meióticos de *R. acetosella* (4n) **(E)** Hibridación *in situ* sobre cromosomas meióticos empleando como sondas la unidad ribosómica 45S completa y la unidad ribosómica 5S.
- Figura 53.** **(A)** Visualización de los complejos sinaptonémicos de *R. acetosella* y **(B)** su interpretación
- Figura 54:** *R. suffruticosus* **(A)** Metafase meiótica de *R. suffruticosus* **(B)** Diplotene de macho de *R. suffruticosus* **(C-D)** Hibridación *in situ* sobre cromosomas meióticos empleando como sonda la unidad repetitiva del ADN satélite RAE180 y su contratinción con DAPI. **(E)** empleando como sondas la unidad ribosómica 45S completa y la unidad ribosómica 5S
- Figura 55.** **(A)** Visualización de los complejos sinaptonémicos de *R. suffruticosus* y **(B)** su interpretación
- Figura 56.** Representación esquemática de los pasos evolutivos que la teoría de la evolución de los cromosomas sexuales predice
- Figura 57.** Esquema evolutivo de la evolución de los sistemas de cromosomas sexuales en el género *Rumex*

Listado de Tablas.-

- Tabla 1.-** Tabla de la clasificación actual del género *Rumex*.
- Tabla 2.-** Tabla con las especies empleadas en esta Memoria.
- Tabla 3.-** Secuencia de los cebadores empleados en esta Memoria.
- Tabla 4.-** Tabla resumen del estatus presencia/ausencia de todas las familias de ADN satélite analizadas en esta Memoria
- Tabla 5.-** Resumen de las posiciones Strachan encontradas en el análisis interespecífico de las secuencias de la familia de ADN satélite RAE180 aisladas a partir de cromosomas Y de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*
- Tabla 6.-** Resumen de las posiciones Strachan encontradas en el análisis interespecífico de las secuencias de la familia de ADN satélite RAE180 aisladas a partir de autosomas de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*
- Tabla 7.-** Matriz de valores medios de variabilidad entre los distintos monómeros que constituyen las unidades superiores de RAE180 en *R. acetosella*
- Tabla 8.-** Resumen de las posiciones Strachan encontradas en el análisis interespecífico de las secuencias de la familia de ADN satélite RAE730 aisladas a partir de las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*
- Tabla 9.-** Tabla resumen del análisis comparativo de las tasas de evolución de RAE180, RAE730 y RAYSI, considerando los polimorfismos compartidos
- Tabla 10.-** Tabla resumen del análisis comparativo de las tasas de evolución de RAE180, RAE730 y RAYSI, eliminando los polimorfismos compartidos

Listado de Apéndices.-

- Apéndice 1.-** Alineamiento combinado de los marcadores ribosómicos ITS y del intrón y el espaciador intergénico cloroplastidiales
- Apéndice 2.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite R180 procedentes de cromosomas Y, aisladas a partir de individuos macho de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*.
- Apéndice 3.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite R180 procedentes de autosomas, aisladas a partir de individuos hembra de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*.
- Apéndice 4.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite R180 procedentes de la especie *R. acetosella*
- Apéndice 5.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite R180 procedentes de la especie *R. suffruticosus*
- Apéndice 6.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite R730 procedentes de las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*
- Apéndice 7.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite RAYSI procedentes de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*.
- Apéndice 8.-** Alineamiento de todas las secuencias de la familia de ADN satélite RUSI procedentes de las especies *R. induratus* y *R. scutatus*.

RESUMEN.-

En esta Tesis Doctoral hemos analizado en profundidad el género *Rumex* (*Polygonaceae*) en relación con los sistemas reproductivos que presenta, así como en relación con sus sistemas de cromosomas sexuales.

El género *Rumex* se divide en cuatro subgéneros que incluyen especies hermafroditas, polígamas, ginodioicas, monoicas y dioicas. Asimismo, las especies dioicas presentan sistemas de cromosomas sexuales en distintos estadios evolutivos, simples (XX/XY) y complejos (XX/XY₁Y₂). En esta Memoria hemos comparado las secuencias ribosómicas ITS, así como el intrón del gen trnL y el espaciador intergénico entre éste y el gen trnF procedentes de 31 especies de *Rumex*, y hemos utilizado estas secuencias como marcadores para inferir las relaciones filogenéticas entre ellas. Nuestra clasificación apoya una nueva sistemática, distinta a la actual, basada en caracteres morfológicos. Así, esta nueva filogenia apoya un origen común de todas las especies dioicas del grupo con distribución euroasiática y americana, con la ginodioecia como un estadio intermedio en la transición hermafroditismo-dioecia. Asimismo, nuestros resultados apoyan la idea de que el sistema de control genético del sexo basado en el balance entre juegos autosómicos y cromosomas X (X/A) es más reciente y derivado del basado en la presencia de un Y activo (X/Y). Además, demostramos que los sistemas de cromosomas sexuales múltiples (XX/XY₁Y₂) en *Rumex* habrían evolucionado a partir de los sistemas simples (XX/XY) dos veces a lo largo de la evolución del género. Nuestra filogenia es, además, consistente con la evolución del número básico de las especies de *Rumex*, lo que implicaría una reducción cromosómica desde el nivel $x=10$ de hermafroditas hasta $x=8$ y $x=7$, propio de especies dioicas, con la aparición de estadios intermedios de especies polígamas-ginodioicas $x=9$.

Por otra parte, hemos caracterizado cuatro familias de ADN satélite presentes en el género *Rumex*. Por un lado, la familia RAYSI, específica de cromosomas Y, y la familia RAE730, presente en segmentos heterocromáticos en la pareja autosómica VI, ambas exclusivas de especies dioicas con sistemas complejos. Por otro, la familia RAE180, constituyente mayoritario de la heterocromatina de los cromosomas Y y presente en un reducido locus autosómico, que caracteriza a todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas de *Rumex*. Asimismo, hemos caracterizado por primera vez la familia de ADN satélite RUSI, a partir de las especies *R. scutatus* y *R. induratus*, localizada en regiones subtelméricas y pericentroméricas de varios cromosomas del cariotipo de *R. induratus*. Hemos analizado la secuencia de estas familias de ADN satélite, para comprender cómo se originan y cuales son sus patrones evolutivos. De esta forma, hemos comprobado que las secuencias de RAYSI y RAE730 presentan un origen común y que se habrían formado a partir de la amplificación de un satélite ancestral de 120 pb, a través de dos satélites intermediarios de 360 pb. Las otras dos familias no han mostrado relación de parentesco entre sí, ni con RAYSI o RAE730.

Además, dada la característica distribución de estos ADN_s satélite en grupos restringidos de especies, ha sido posible su uso como marcadores cladísticos, reforzando la filogenia molecular obtenida. Pero además, la comparación de las secuencias de estos ADN_s satélite entre especies emparentadas nos ha permitido analizar la dinámica evolutiva de los mismos. Así, establecemos que las familias de ADN satélite relacionadas con los cromosomas Y, RAE180 y RAYSI, que no recombinan entre sí, presentan unas tasas de cambio y de evolución concertada con valores que son aproximadamente la mitad de los que presenta otro satélite distribuido en loci autosómicos, RAE730, que presentan comportamientos normales en cuanto a la recombinación se refiere. Esto se pone claramente de manifiesto en familias de ADN satélite como RAYSI (exclusiva de cromosomas Y) y RAE730 (exclusiva de autosomas), que a pesar de tener un origen común, presentan patrones evolutivos marcadamente diferentes en función de su localización. Asimismo, hemos detectado la presencia de varias subfamilias de la familia RAYSI, lo que supone un dato adicional de la naturaleza no recombinante de los cromosomas Y de sistemas múltiples, y de cómo esto afecta a la dinámica evolutiva de los ADN_s que portan. Se presentan hipótesis evolutivas de cómo ha ocurrido el proceso de aparición y expansión de dichas subfamilias de ADN satélite.

Por último, hemos analizado estructural y molecularmente los distintos sistemas de cromosomas sexuales existentes en el género. De esta manera, hemos comprobado que la especie *Rumex acetosa* y especies emparentadas se caracterizan por ser portadoras de un sistema cromosómico complejo XX/X₁Y₂. Los cromosomas sexuales de estos sistemas aparecen constituyendo un trivalente sexual durante la meiosis masculina en el que los extremos del cromosoma X aparecen asociados a cada uno de los Y por una pequeña región homóloga, existiendo una amplia región con ausencia de complejo sinaptonémico que incluye la región intersticial del cromosoma X, así como el resto de los cromosomas Y. Estas especies parecen estar en un estadio evolutivo muy avanzado considerando la teoría actual de los cromosomas sexuales. Así, hemos demostrado que los cromosomas Y de estos sistemas se encuentran altamente degenerados por la acumulación de al menos dos familias de ADN satélite, las familias RAE180 y RAYSI. Por otro lado, hemos analizado especies como *R. acetosella* y *R. suffruticosus*, con sistemas de cromosomas sexuales simples, XX/X₁Y. Estas especies se encuentran en un estadio intermedio en cuanto a la evolución de sus cromosomas sexuales se refiere. Concretamente, hemos observado la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos, que presentan una marcada zona no homóloga de asinapsis. Podemos, por tanto, asumir que existen mecanismos que impiden la recombinación de este par cromosómico generando una región diferencial entre ambos cromosomas sexuales. Sin embargo, por los datos obtenidos en esta Memoria no parecen haber iniciado el proceso de degeneración que acompaña a la evolución de los cromosomas sexuales, pues no existen en ellos familias de ADN satélite.

ABSTRACT.-

In this Doctoral Thesis we have analysed the mating systems and the reproductive mechanisms in the genus *Rumex* (*Polygonaceae*).

The genus *Rumex* includes hermaphroditic, polygamous, gynodioecious, monoecious, and dioecious species, with the dioecious species being represented by different sex-determining mechanisms and sex-chromosome systems. Therefore, this genus represents an exceptional case study to test several hypotheses concerning the evolution of both mating systems and the genetic control of sex determination in plants. Here, we compare nuclear intergenic transcribed spacers and chloroplast intergenic sequences of 31 species of *Rumex*. Our phylogenetic analysis supports a systematic classification of the genus, which differs from that currently accepted. In contrast to the current view, this new phylogeny suggests a common origin for all Eurasian and American dioecious species of *Rumex*, with gynodioecy as an intermediate state on the way to dioecy. Our results support the contention that sex determination based on the balance between the number of X chromosomes and the number of autosomes (X/A balance) has evolved secondarily from male-determining Y mechanisms and that multiple sex-chromosome systems, XX/XY_1Y_2 , were derived twice from an XX/XY system. The resulting phylogeny is consistent with a classification of *Rumex* species according to their basic chromosome number, implying that the evolution of *Rumex* species might have followed a process of chromosomal reduction from $x=10$ toward $x=7$ through intermediate stages ($x=9$ and $x=8$).

On the other hand, we have characterised four satellite DNA families in the genus *Rumex*. Firstly, the RAYSI family is Y-linked and, the RAE730 family heterochromatic segments specific, and both of them are related to complex chromosomal systems species. Secondly, the family RAE180 is a major constituent of Y heterochromatin and it is also harboured in a minor autosomal locus. This latter family characterizes all Laurasian (Euroasiatic and American) dioecious species of *Rumex*. Finally, we have characterized for the first time in this work the RUSI family. RUSI is exclusively in *R. induratus* and *R. scutatus* and it is co-located in pericentromeric and subtelomeric regions. We have comparatively analysed the sequence of all these satellite DNAs to contribute to the understanding of their origin and evolution processes. So, we have demonstrated that RAYSI and RAE730 sequences are related in origin and they would be constructed from a 120 bp-satellite DNA family, through an intermediate of 360 bp. The other two families did not show to be related between them or with RAYSI and RAE730.

Additionally, since these four satellite DNAs have demonstrated to be distributed in small groups of species we have used them as cladistic markers in *Rumex* as an alternative support to our phylogeny. Furthermore, the comparative study of these satellite DNAs have permitted to analyse the evolutionary pathway of them. So, we have found that Y-linked satellite DNAs show reduced rates of change and concerted evolution, approximately a half with respect to autosomal satellite DNAs. This is an additional support to the

idea that Y chromosomes do not recombine. In fact, we have found two subfamilies of sequences in Y-linked RAYSI. We present here evolutionary hypothesis to explain their origin and expansion.

Finally, we have analysed the different sex-chromosome systems of *Rumex*. So, we have demonstrated that *Rumex acetosa* and related species have an XX/XY₁Y₂ system. The sex chromosomes constitute a sexual trivalent during male meiosis where Y chromosomes only pair with both X terminal regions with lack of synaptonemal complex in most of interstitial region. These species could represent a very advanced evolutionary stage in the evolution of sex chromosomes. Furthermore, we have demonstrated that both Y chromosomes are highly degenerated by the accumulation of two satellite DNA families, RAE180 and RAYSI. On the other hand, we have also analysed species such as *R. acetosella* and *R. suffruticosus*, both with XX/XY system. These species represent an intermediate stage in the evolution of sex chromosomes. Concretely, we have found heterochromatic sex chromosomes with a long region in which no synaptonemal complex can be observed. So, we can assume that mechanisms avoiding recombination are acting with the result above mentioned. However, we can assure a genetic degeneration for these sex chromosomes from the data gathered in this work, since we have not detected satellite DNA accumulation.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. El Género *Rumex* L.-

1.1.1. *Generalidades.*-

El término *Rumex* proviene de un vocablo latino utilizado para designar un tipo de lanza de aspecto semejante al de la típica *hoja hastada*, que gran parte de las especies integrantes del grupo poseen (Font Quer, 2000), y también se puede considerar derivado de la raíz indogermánica *sru* (ácido), por el sabor de sus hojas. A estas plantas, la sabiduría popular las ha dado en llamar *vinagreras*, *romazas* o *acederas*. Género de Joseph Pitton de Tournefort (*Lapathum* Tourn.) al que Linneo le cambió el nombre, dándole una delimitación más amplia, que incluía *Acetosa* Tourn.

Las propiedades que sus componentes químicos les confieren a estas plantas, principalmente vitamina C y ácido oxálico u oxalatos (Duke, 1992), han propiciado su empleo culinario o como hierba medicinal por los primeros moradores neolíticos de las Alpujarras granadinas, de los habitantes de los Montes toledanos del siglo XVIII o de los primeros pobladores del actual País Vasco, por poner algunos ejemplos (Rudley, 1990; Peña-Chocarro y Zapata Peña, 1997), estando su distribución relacionada en general con actividades antrópicas. Su uso se ha extendido hasta nuestros días. De hecho, ha sido incluso indicado para combatir procesos tumorales (Tai y Cheung, 1995) o como inhibitorio del virus del VIH (el-Mekawy et al., 2005). Su repercusión ha llegado a tan diversos sectores, que ya se ha comenzado la comercialización a gran escala del híbrido *Rumex k-1* (Aviaagroservices) para su explotación industrial y con fines forrajeros.

Como datos curiosos apuntaremos a la referencia que la Biblia hace de esta planta, cuyo empleo se recomienda como condimento en la Cena Pascual (Duke, 1983). Además, según Plinio, los soldados de Julio César habrían sido curados de escorbuto con la llamada "*Erba britannica*", posteriormente identificada como *Rumex aquaticus* L.

No obstante sus propiedades beneficiosas, son varias las patologías recogidas en la literatura relacionadas con el consumo de estas hierbas, como daños pancreáticos, renales y hepáticos e intoxicaciones en hombre y animales (Degirmenci et al., 2005; Khalaf, 2005), procesos alérgicos variados (Kwaasi et al., 1998; Mueller et al., 2000; Celenk y Bcakci, 2005) e incluso la muerte en casos extremos (Reig et al., 1990). En determinados países africanos algunas especies de *Rumex* son aún utilizadas con fines abortivos (Gebrie et al., 2005; Gebrie et al., 2005).

Por otro lado, desde que Kiara y Ono (1925) describieron la existencia de un sistema de cromosomas sexuales complejo en la especie *Rumex acetosa* L., ésta y otras integrantes del género han centrado estudios genéticos de distinta índole. Así, los trabajos de Yamamoto (1938), Löve (1944), Löve y Kapor (1967), Smith (1964 y 1968), Singh (1968), Kuroki y Kurita (1969, 1970a, b, 1971), Stebbins (1971), Degraeve (1974, 1975a, b, 1980), Wilby y Parker (1989) y Masuoka y Fujishima (1994), son estudios citogenéticos fundamentalmente descriptivos, en los que se analizan los cariotipos de los

distintos grupos en que se divide el género *Rumex* (ver el apartado siguiente de esta Memoria). Otros estudios se han centrado en aspectos relacionados con la evolución cromosómica (Smith, 1969; Wilby y Parker, 1988), los mecanismos de determinación sexual del género (Ono, 1935; Löve, 1957; Westergaard, 1958; Kurita y Kuroki, 1970; Ainsworth, 1999) y la proporción de sexos de las poblaciones de algunas de las especies dioicas (Korpelainen, 2002; Stehlik y Blattner, 2005). El ADN ribosómico en *Rumex* también ha sido analizado en profundidad (Opiola et al., 1996; Lengerova y Vyskot, 2001; Koo et al 2004).

A pesar de todo, si hubiera que resaltar el tema que más atención ha centrado dentro del género, éste sería sin discusión la caracterización molecular fundamentalmente de la heterocromatina en general y la de los cromosomas Y en particular de *R. acetosa* (Kurita y Kuroki 1970). Los múltiples estudios llevados a cabo, han dado lugar al aislamiento y caracterización de secuencias repetitivas de distinta índole asociadas o no a los cromosomas sexuales, principalmente ADNs satélite y secuencias retrotransponibles, por medio de muy distintas aproximaciones: digestión con enzimas de restricción (Ruiz Rejón et al., 1994), microdissección y DOP-PCR (Shibata 1999; Mariotti et al., 2005), AFLPs (Rottenberg y Parker, 2003; Rahman y Ainsworth, 2004; Park et al, 2004) y SCARs (Stehlik y Blattner, 2004). Asimismo, han sido descritos algunos genes que podrían estar involucrados de una u otra manera en el proceso de determinación sexual (Ainsworth et al., 1999; Stokes et al., 2003a, b; Ainsworth et al., 2005). Sin embargo, este último punto aún presenta muchos enigmas y centrará seguramente futuras investigaciones que ayudarán a desentrañar los mecanismos que gobiernan este proceso en vegetales.

El género *Rumex* es, por todo lo expuesto, un modelo ideal para el análisis de la arquitectura molecular de los cromosomas sexuales, principalmente de los Y, con especial interés en su origen y evolución (cf. Crossley y Ainsworth, 1994; Ainsworth, 2000; Ruiz Rejón, 2004; Vyskot y Hobza, 2004). La presente Memoria pretende arrojar algo de luz en cada uno de estos aspectos. Pero también, como veremos a continuación, el género *Rumex* constituye un buen modelo para analizar el origen y la evolución de la dioecia y de los distintos sistemas de determinismo genético del sexo.

1.1.2. Clasificación.-

El género *Rumex* L. (Polygonaceae) incluye unas 200 especies y está compuesto por hierbas anuales o perennes, con flores hermafroditas o unisexuales dispuestas en inflorescencias más o menos ramosas. Son muy frecuentes como malas hierbas nitrófilas, componentes pratenses e incluso como rupestres y desde zonas de alta montaña hasta arenas litorales. Estas plantas son de distribución euroasiática, estando ampliamente representadas en la región mediterránea, centro y norte de Europa hasta el sudoeste asiático y África (Rechinger, 1964). Asimismo, el grupo se encuentra representado por varios integrantes en el continente americano (Smith, 1969) y Australiano (Willis, 1972; Webb et al., 1988).

Especie	Sistema Reproductivo	X
Subgénero Acetosa		
Sección Acetosa		
<i>Rumex acetosa</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex arifolius</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex intermedius</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex nivalis</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex papillaris</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex rothschildianus</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex thyrsoides</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex tuberosus</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
Sección Americanae		
<i>Rumex hastatulus (RNC)</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	4
<i>Rumex hastatulus (RTX)</i>	Dioecia (XX/XY)	5
<i>Rumex paucifolius</i>	Dioecia (XX/XY)	7
Sección Scutati		
<i>Rumex induratus</i>	Hermafroditismo-Poligamia	10
<i>Rumex roseus</i>	Hermafroditismo-Poligamia	10
<i>Rumex scutatus</i>	Hermafroditismo-Poligamia	10
<i>Rumex suffruticosus</i>	Dioecia (?)	?
Sección Hatati		
<i>Rumex hastatus</i>	Poligamia-Ginodioecia	9
<i>Rumex maderensis</i>	Poligamia-Ginodioecia	10
<i>Rumex lunaria</i>	Poligamia-Ginodioecia	9
Sección Vesicarii		
<i>Rumex cyprius</i>	Hermafroditismo-Poligamia	9
<i>Rumex vesicarius</i>	Hermafroditismo-Poligamia	9
Sección Afroacetosa		
<i>Rumex abyssinicus (SsA)</i>	Poligamia	9
<i>Rumex sagittatus (SsS)</i>	Dioecia	9
Subgénero Acetosella		
<i>Rumex acetosella</i>	Dioecia (XX/XY)	7
<i>Rumex graminifolius</i>	Dioecia (XX/XY)	7
Subgénero Rumex		
<i>Rumex albescens</i>	Monoecia	10
<i>Rumex alpinus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex aquaticus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex aquitanicus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex confertus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex conglomeratus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex crispus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex cristatus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex densiflorus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex dentatus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex frutescens</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex giganteus</i>	Monoecia	10
<i>Rumex hydrolapathum</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex japonicus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex longifolius</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex obtusifolius</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex patientia</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex pulcher</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex rupestris</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex sanguineus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex skottsbergii</i>	Monoecia	10
...		
Subgénero Platypodium		
<i>Rumex bucephalophorus</i>	Hermafroditismo	8

Tabla 1: Clasificación actual de las especies del género *Rumex*. (x) Número cromosómico básico

A pesar de que algunos autores han considerado que las especies del género *Rumex* pueden clasificarse en cuatro géneros independientes (Degraeve, 1975a, 1975b, 1976), nosotros en esta Memoria, y como punto de referencia, seguiremos la clasificación actualmente reconocida, propuesta por Rechinger (En: Flora Europaea, 1964) y López González (En: Flora Iberica 1990) (ver **Tabla 1**).

Esta clasificación asume una división del género *Rumex* en cuatro subgéneros. Según ella, todas las especies dioicas del grupo se encuentran incluidas en los subgéneros *Acetosella* (Meissner) Rech. fil. y *Acetosa* (Miller) Rech. fil. Los otros dos subgéneros restantes, *Rumex* L. y *Platypodium* (Willk.) Rech. fil., incluyen exclusivamente especies hermafroditas o monoicas. Asimismo, en el subgénero *Acetosa*, encontramos además especies ginodioicas, hermafroditas o polígamas repartidas en distintas secciones. A continuación, aportamos una visión más detallada de la clasificación a nivel mundial de cada uno de estos subgéneros:

Subgénero Acetosella (Meissner) Rech. fil.-

El subgénero *Acetosella* representa un grupo monotípico en la Península Ibérica (López González, 1990), cuyo único integrante es la especie *Rumex acetosella* L. Esta especie se encuentra distribuida en zonas templadas y frías del Hemisferio Norte, encontrándose además en Norteamérica central y septentrional y naturalizada en otras muchas partes del globo. *Rumex graminifolius* Rudolph ex Lamb. es el otro representante del subgénero de distribución fundamentalmente ártica. El número cromosómico básico del grupo es $x=7$.

Estas especies constituyen un complejo poliploide con poblaciones que varían desde el nivel diploide hasta el octoploide, incluyendo estadios tetraploides, pentaploides o hexaploides (Singh, 1968; López González, 1990). Esta variabilidad con respecto a los niveles de ploidía es compatible con el sistema de determinación sexual basado en la presencia de un cromosoma Y activo que posiblemente presentan (Löve, 1944). Estas especies tendrían un sistema cromosómico simple de determinismo del sexo XX/XY, si bien los cromosomas sexuales aún no estarían muy diferenciados desde el punto de vista morfológico y genético, por lo que ha sido un aspecto ampliamente discutido (Singh, 1964; Smith, 1972).

Subgénero Acetosa (Miller) Rech. fil.-

El subgénero *Acetosa* engloba seis secciones.

Sección Acetosa:

Las características cariotípicas de las especies del subgénero *Acetosella* contrastan con las que presentan las especies del grupo *Acetosa* (subgénero

Acetosa, sección *Acetosa*) representado por la especie tipo *Rumex acetosa* L. Dicho grupo engloba el resto de especies dioicas del género, con escasas excepciones como veremos más adelante. Para este grupo los fenómenos de poliploidía han sido raramente descritos (Ainsworth et al., 2005). De hecho, ésta sería incompatible con el sistema de determinación sexual que posiblemente presentan las especies de este grupo (Muller, 1925), que es dependiente del balance entre el número de cromosomas X y el número de juegos autosómicos (proporción X:A) (Ono, 1935; Yamamoto, 1938; Westergaard, 1958; Smith, 1972; Ainsworth, 1998, 1999). Por otro lado, estas especies, cuyo número cromosómico básico es también $x=7$, han evolucionado hacia el establecimiento de un sistema cromosómico más complejo en el que las hembras tienen un número de cromosomas de $2n=14$ ($12A + XX$) mientras que los machos poseen $2n=15$ ($12A + XY_1Y_2$) (Kihara y Ono, 1925). La sección *Acetosa* incluye una serie de especies que presentan una fuerte coherencia a nivel morfológico y citogenético (Wilby y Parker, 1988b) (todas dioicas y con determinismo del sexo complejo). Generalmente la distribución de este grupo de especies es euroasiática, llegando *R. acetosa* hasta Norteamérica. Algunas de ellas están restringidas a la región mediterránea como *Rumex papillaris* Boiss & Reuter, *Rumex intermedius* DC y *Rumex thyrsoides* Desf. Adicionalmente, otras constituyen poblaciones relicticas como en el caso de los endemismos alpino e israelita, *Rumex nivalis* Hegetschw. (Wagenitz, 1981) y *Rumex rothschildianus* Aarons. Ex. Evenari (Rottenberg y Parker, 2003), respectivamente.

Sección Americanae:

La sección *Americanae*, por su parte, incluye los endemismos americanos *Rumex hastatulus* Baldw. y *Rumex paucifolius* Nutt., distribuidos por la Norteamérica central y septentrional. Ambas especies son dioicas.

R. hastatulus comprende tres razas cromosómicas alopátricas indistinguibles morfológicamente que ocupan en líneas generales las áreas de Texas, North Carolina e Illinois-Missouri. La raza de Texas tiene un número cromosómico básico $x=5$ y es diploide con $2n=10$. Esta raza presenta un sistema cromosómico de determinación del sexo XX/XY y sistema de control genético basado en la presencia de un Y activo (Smith, 1969). Por su parte, la raza cromosómica de North Carolina, tiene un número cromosómico básico $x=4$, siendo las hembras $2n=8$ ($6A + XX$) y los machos $2n=9$ ($6A + XY_1Y_2$). Esta raza se caracteriza por un sistema de control genético del sexo dependiente del balance X:A (Smith, 1963). La raza de Illinois-Missouri, con características similares a las de la raza de North Carolina, es probablemente fruto de la introgresión de una población en otra o representa un estado evolutivo de transición entre ambas razas (Smith, 1969).

Por otro lado, *R. paucifolius* se encuentra ocupando las zonas más altas fundamentalmente de la parte oeste norteamericana, desde California hasta Canadá. Para ella, Löve y Sarkar (1956) describieron la existencia de un par heteromórfico de cromosomas sexuales. Sin embargo, Smith posteriormente desacreditó estas observaciones (Smith, 1969). Su cariotipo presenta un

número cromosómico básico $x=7$, con la existencia de un par de cromosomas metacéntricos largos de similar tamaño, denominados L, que podrían estar relacionados con la determinación sexual de esta especie. Su cariotipo ha sido relacionado con el de la especie *R. acetosella* (Smith, 1969). Curiosamente, *R. paucifolius* presenta también varios niveles de ploidía, con poblaciones diploides y tetraploides y la presencia ocasional de individuos triploides y octoploides.

Sección Scutati:

Esta sección incluye plantas perennes y ligeramente leñosas por lo general. *Rumex scutatus* L. es de distribución centro y sur europea, mientras que la especie estrechamente emparentada *Rumex induratus* Boiss. & Reut. se encuentra restringida a la mitad sur de la Península Ibérica y Norte de Marruecos, de forma similar a *Rumex roseus* L. Todas estas especies son hermafroditas o polígamas, y presentan un número cromosómico básico $x=10$.

Excepcionalmente (en cuanto a su sistema reproductivo se refiere) en este grupo se encuentra clasificada la especie dioica *Rumex suffruticosus* J. Gay ex Willk., para la que no existen datos cromosómicos en la literatura. Esta especie es un endemismo de las montañas del centro, norte y noroeste de la Península Ibérica (López González, 1990) y se estudiará cromosómica y molecularmente en el transcurso de esta Memoria, por primera vez.

Sección Hastati:

La sección *Hastati* recoge especies polígamas-ginodioicas e incluye a la especie asiática *Rumex hastatus* D. Don y al endemismo canario *Rumex lunaria* L., ambas con número cromosómico básico $x=9$. Asimismo, se engloba en esta sección, la especie *Rumex maderensis* Lowe endemismo macaronésico presente en las Islas Canarias y en Madeira, $x=10$.

Sección Vesicarii:

La sección *Vesicarii* incluye a *Rumex vesicarius* L., oriunda del norte de África y el sudoeste asiático y *Rumex cyprius* Murb, distribuida por Siria, Palestina, Chipre y Egipto hasta Irán y Arabia, ambas hermafroditas-polígamas y $x=9$.

Sección Afroacetosa:

Finalmente, la sección *Afroacetosa* comprende fundamentalmente a dos especies para las cuales se ha creado exclusivamente dos subsecciones aparte. Concretamente, *Rumex abyssinicus* Jacq. (subsección *Abyssinici*), especie polígama con número cromosómico básico $x=9$, procedente del norte de África y Etiopía y *Rumex sagittatus* Thunb. (subsección *Sagittati*) originaria del sur de África y naturalizada en Australia. *R. sagittatus* es también $x=9$ y normalmente dioica, aunque no presenta cromosomas sexuales diferenciados (Degraeve, 1976).

Subgénero *Platypodium* (Willk.) Rech. fil.-

El subgénero *Platypodium* está constituido exclusivamente por la especie *Rumex bucephalophorus* L. Se encuentra distribuida ampliamente por la región mediterránea, sudoeste asiático y Macaronesia, es anual y estrictamente hermafrodita. Los periantos florales externos, así como las valvas de los frutos son muy polimórficos, habiéndose descrito la existencia de varias subespecies. El número cromosómico básico en cualquier caso es $x=8$, siendo diploide $2n=16$.

Subgénero *Rumex* L.-

Las especies clasificadas en este subgénero se caracterizan por la presencia de hojas nunca sagitadas o hastadas y por el contrario redondeadas, acorazonadas o en forma de cuña en su base. Esta característica morfológica las ha separado popularmente del resto de especies (*acederas*) habiéndose adoptado para ellas de forma general el nombre vulgar de *romazas*. Con sus aproximadamente 150 integrantes constituyen más del 75% de especies del género.

A pesar de ello, se trata de un grupo muy homogéneo, ya que el número cromosómico básico se mantiene constante a lo largo de todo el grupo ($x=10$) y existen únicamente especies hermafroditas estrictas (salvo la excepción de ciertas especies monoicas). Esta homogeneidad favorece que la hibridación entre las especies de este grupo no sea rara, mostrándose un alto grado de esterilidad y variación en el tamaño de las valvas, incluso en el mismo individuo (González López, 1990). Sin embargo, la existencia de estos híbridos no supone una traba importante para la clasificación taxonómica de este subgénero, ya que son fácilmente detectables: o bien presentan características intermedias claras entre las especies parentales o bien se trata de individuos estériles o con ciertas particularidades, como tallos anormalmente grandes de hábito laxo y desordenado, flores con apertura prematura, ramas fructíferas secundarias debajo de la inflorescencia primaria, valvas muy variables morfológicamente o la presencia de frutos vacíos y/o que se desprenden antes de la maduración (Rechinger, 1964). Tanto es así, que la bibliografía está llena de decenas de ejemplos de híbridos descritos (ver, por ejemplo, González López, 1990).

La presencia extendida de estos híbridos, unida al alto polimorfismo que se observa en algunos caracteres (fundamentalmente en la morfología valvar) no sólo a nivel intra-específico, sino intra-individual, ha dado lugar a la descripción de múltiples especies ligadas a regiones concretas, como demuestran los nombres toponímicos de las especies *Rumex beringensis* Jurtzev & V.V. Petrovsky, *Rumex costaricensis* Rech. f., *Rumex paraguayensis* D. Parodi, *Rumex patagonicus* Rech. f., *Rumex utahensis* Rech. f., *Rumex peruanus* Rech. f., *Rumex ucranicus* Fisch. ex Spreng. o *Rumex ecuadoriensis*

Rech. f. Muchas veces estas especies no son más que variantes geográficas de otras con distribución más amplia.

Algunas de las especies más características de este género son, la especie tipo del género, *Rumex patientia* L., así como *Rumex sanguineus* L., *Rumex conglomeratus* Murray, *Rumex crispus* L. o *Rumex salicifolius* Weinm., sólo por citar algunos ejemplos.

Finalmente, y como se ha dejado dicho anteriormente, algunas de las especies de este subgénero, como *Rumex giganteus* W.T. Aiton, *Rumex skottbergii* Degener & I. Degener y *Rumex albescens* Hillebr., han evolucionado hacia la monoecia como sistema reproductivo (Wagner et al., 1997). Estas especies son endemismos hawaianos, por lo que es plausible pensar que el efecto insular en los patrones reproductivos ha sido importante. Tanto es así, que algunas especies hermafroditas estrictas en el continente americano y europeo, como es el caso de *Rumex obtusifolius* L., aparecen como monoicas en algunas poblaciones de Hawaii (Wagner et al., 1997; Mosyakin y Wagner, 1998).

La asunción de que esta clasificación refleja la filogenia del grupo, implicaría que la dioecia ha aparecido varias veces a lo largo de la evolución de *Rumex* directamente desde un ancestral hermafrodita. Además, sugeriría que la evolución de los sistemas sexuales no habría seguido un único camino, y que la evolución en uno y otro sentido habría ocurrido sin restricción de ningún tipo. Asimismo, según esta ordenación no existiría relación entre la filogenia y la evolución del número cromosómico en este grupo. En la presente Memoria, nosotros vamos a analizar si estas afirmaciones son correctas o no por medio de un análisis filogenético de las especies del grupo utilizando marcadores moleculares tanto citoplasmáticos como nucleares. Concretamente pretendemos responder a las siguientes cuestiones: a) si la dioecia ha aparecido una o varias veces a lo largo de la evolución de *Rumex*; b) si el sistema de control genético del sexo basado en un Y activo es anterior a otro X:A; c) si los sistemas cromosómicos complejos XX/XY_1Y_2 son derivados de los simples XX/XY , y si es así, si esta evolución ha ocurrido una o varias veces; y 4) si se puede proponer una nueva clasificación infragenérica del género coherente con la evolución de los sistemas reproductivos y su evolución cariotípica.

1.2. Origen y evolución de la dioecia y de los cromosomas sexuales de plantas.-

La mayoría de las especies vegetales son hermafroditas, siendo dioicas tan sólo un 6% de las plantas con flor (Renner y Ricklefs, 1995). A pesar de esta escasa representación, la aparición de la dioecia se ha relacionado con una serie de factores ecológicos (Vamosi et al., 2002), y se detecta como sistema reproductivo en diversos grupos de plantas no estrechamente emparentados, lo que sugiere su origen varias veces a lo largo de la evolución.

La novedad evolutiva que supone la dioecia en plantas ha sido ampliamente investigada. Así, la dioecia se ha originado varias veces independientemente en el género *Ribes* (Senters y Soltis, 2003) y ha aparecido al menos dos veces en la historia evolutiva del género *Silene* a partir de un ancestral ginodioico (Desfeux et al., 1996). En la familia *Siparunaceae* la dioecia se ha originado también repetidas veces, aunque esta vez a partir de un ancestral monoico (Renner y Won, 2001). El origen de la dioecia también ha sido analizado en monocotiledóneas, donde parece que la ginodioecia es un estado transitorio más común que la monoecia (Weiblen et al., 2000).

Por otro lado, los intentos de dilucidar los mecanismos que gobiernan la aparición de sexos separados en plantas, han dado lugar a la descripción de cromosomas sexuales diferenciados (cf. Ruiz Rejón, 2004), aunque en un número muy reducido de especies. Los cromosomas sexuales han sido tradicionalmente foco de atención de la Biología evolutiva. La presencia de cromosomas sexuales heteromórficos está ampliamente extendida en animales superiores, viniendo alguna de las teorías de su origen y evolución reconocidas en la actualidad, del análisis de los cromosomas X e Y humanos fundamentalmente (Ali y Hasnain, 2003; Skaletsky et al., 2003; Ross et al., 2005). Sin embargo, los sistemas de cromosomas sexuales animales son muy antiguos (se estima que los cromosomas sexuales humanos aparecieron hace entre 240-320 millones de años) lo que hace muy difícil acceder a las primeras etapas de su aparición (Moore 2004). Es por ello, que sistemas que han sido descritos como más jóvenes, y por lo tanto en etapas más tempranas del proceso, como los de peces (Volf y Schartl, 2001; Phillips et al., 2005) y particularmente los de plantas (cf. Ruiz Rejón, 2004), así como los sistemas de neoformación de cromosomas sexuales como los de *Drosophila* (Bachtrog y Charlesworth, 2002), aparecen como nuevos modelos interesantes para comprobar dichas hipótesis. A pesar de que plantas y animales han desarrollado mecanismos de determinismo sexual potencialmente distintos, es lógico pensar que la arquitectura genética de sus cromosomas sexuales haya seguido patrones relativamente parecidos y, por tanto, comparables (Negrutiu et al., 2001; Charlesworth, 2002).

La hipótesis más aceptada acerca del origen y la evolución de los cromosomas sexuales propone que éstos han aparecido varias veces en la evolución a partir de una pareja de autosomas, tanto en animales como en plantas (Muller, 1918). Al menos dos eventos evolutivos se requieren para la transición desde el hermafroditismo hasta la dioecia (Charlesworth, 1985). Según esta teoría, una mutación de esterilidad masculina en los hermafroditas, daría lugar a hembras, apareciendo los machos a partir de otra mutación, esta vez supresora de los genes femeninos. Parece que el desarrollo más probable es la ocurrencia, en primer lugar, de la mutación de la esterilidad masculina, que origina un polimorfismo en las poblaciones con individuos hembra y hermafroditas (condición conocida como ginodioecia) (Charlesworth y Charlesworth, 1978). Si bien, aunque más raramente, la aparición de la dioecia vía monoecia ha sido también descrita (Renner y Won, 2001)

El siguiente paso, conducente al definitivo establecimiento de los dos sexos, implicaría una serie de reestructuraciones cromosómicas que tienen

como resultado la acumulación de los genes determinantes del sexo en una pequeña región del genoma. Una vez han aparecido machos y hembras, la evolución favorecería un ligamiento más estrecho de estos nuevos loci, hecho que dificulta la acción de la recombinación. La ausencia de recombinación entre el X y el Y habría evolucionado para prevenir la recombinación de los loci implicados en la determinación sexual, evitando la aparición de fenotipos no adaptativos, hermafroditas y sobre todo individuos neutros, portadores de las mutaciones tanto de esterilidad masculina como femenina (Lewis, 1942; Charlesworth, 2004).

El sistema cromosómico sexual presente mayoritariamente en vegetales, es también el más ampliamente extendido a lo largo de todo el reino animal. Este sistema comprende cromosomas sexuales estructuralmente distintos, siendo los machos el sexo heterogamético (XY) y las hembras el homogamético (XX). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en mamíferos, los cromosomas sexuales de plantas suelen tener un gran tamaño, siendo normalmente el cromosoma Y de los más grandes del cariotipo si no el mayor, como ocurre en *Silene latifolia* Poiret. (Moneger, 2001).

No obstante, existen tanto en animales como en plantas excepciones en las que el caso contrario ocurre, es decir, el sexo heterogamético es el de las hembras (ZW) y el homogamético el de los machos (WW) (Fridolfsson y Ellegren, 2000; Handley et al., 2004). De todas maneras, las consideraciones que se realizarán a continuación son igualmente válidas para éstos en la mayoría de las ocasiones.

De acuerdo con Charlesworth et al. (2002), parecen confluír en la formación de este sistema cuatro eventos fundamentalmente. A saber: a) normalmente existe cese parcial o total de la recombinación entre el par cromosómico X-Y; b) degeneración de la mayoría de los genes portados por el cromosoma Y; c) acumulación por parte del cromosoma Y de secuencias altamente repetidas, debido a la ausencia de recombinación y d) compensación de dosis de la actividad génica del X en homocigosis.

La convergencia evolutiva (Hodgkin, 1992) que supone la aparición de este sistema de determinación sexual a lo largo de tan diversos táxones sugiere fuerzas evolutivas relativamente simples. Aunque la mayoría de los antepasados remotos de los táxones animales actuales fueron presumiblemente hermafroditas, es muy difícil reconstruir su pasado evolutivo. De hecho, para la mayoría ellos no se conocen parientes próximos con otros sistemas reproductivos que no sean la propia dioecia. Algo muy distinto ocurre con los vegetales. Dentro de un mismo género pueden convivir especies de muy distintos sistemas reproductivos (hermafroditismo, ginodioecia, androdioecia, monoecia, dioecia). La existencia de estos estadios evolutivos distintos podría ayudar a encontrar respuestas acerca del origen de la dioecia, ya que nos permite comparar especies dioicas con otras muy relacionadas que presentan sistemas reproductivos intermedios. En plantas, por otro lado, la dioecia es un mecanismo que ha evolucionado muy recientemente. En el género *Silene*, por ejemplo, se ha estimado la aparición de la dioecia hace unos 20 millones de años (Filatov y Charlesworth, 2002). La ventaja de esta

diferencia en el tiempo de aparición de los sistemas de determinismo sexual, en las plantas dioicas, es que encontramos representadas distintas etapas del proceso evolutivo que siguen los cromosomas sexuales. Algunas de estas etapas, además, son estadios muy incipientes del proceso. Es por todo ello que los vegetales, en general, y el género *Rumex* en particular, constituyen un excelente material de estudio para intentar dilucidar parte del enigma que aun hoy es la evolución de la dioecia y de los cromosomas sexuales (cf. Ainsworth, 1999; Charlesworth, 2002; Ruiz Rejón, 2003).

Etapas del proceso evolutivo de los cromosomas sexuales en plantas.-

La etapa más primitiva del proceso de aparición de los cromosomas sexuales estaría representada por la especie, *Asparagus officinalis* L. Esta planta es dioica y presenta un cariotipo $2n=20$, sin la presencia de cromosomas sexuales diferenciados. De hecho, la pareja cromosómica V del cariotipo de esta especie, que es homomórfica, ha sido descrita como portadora de una región determinante del sexo. Marziani y col. (1999) describieron la existencia de un mecanismo basado en la existencia de dos genes reguladores del tipo, “*male activator*” (gen M, que da lugar a individuos macho) y “*female supresor*” (gen F, que cuando se presenta en homocigosis da lugar a individuos hembra). Los machos son por tanto, heterocigotos MF/mf, mientras que las hembras presentan el genotipo mf/mf.

El hecho de que esta pareja de protocromosomas sexuales no aparezca diferenciada a nivel morfológico, hace que la recombinación sea posible en la práctica totalidad de la extensión de los cromosomas, por lo que se deduce el estrecho ligamiento de los genes determinantes del sexo. Aún así, aparecen esporádicamente dentro de las poblaciones naturales individuos hermafroditas, así como otros estériles. Asimismo, es posible obtener “super-machos” MF/MF y dobles-haploides YY, a partir del cultivo de células de las anteras, sugiriendo el escaso grado de degeneración de los cromosomas Y (Falavigna et al., 1983; Doré, 1990, Qiao y Falavigna, 1990). Esto supone un apoyo adicional a la idea de que las diferencias entre los genes determinantes de uno y otro sexo son presumiblemente debidas a la existencia de mutaciones puntuales en los genes mencionados.

En la especie *S. latifolia*, la situación es distinta, ya que aparte de los 22 cromosomas que constituyen el complemento autosómico en machos y en hembras, existe una pareja adicional de cromosomas, que además es la más grande del cariotipo. Concretamente, en hembras, esta pareja está constituida por dos cromosomas X, mientras que en los machos, lo está por un par XY, el segundo mayor que el primero. El cromosoma X y el Y sólo aparean en meiosis por una pequeña región terminal, lo que indica la supresión de la recombinación en la mayor parte de su longitud. Esta aparente diferenciación estructural, se pone de manifiesto a nivel molecular. Así, se han detectado en el cromosoma Y tres regiones intersticiales que portan tres tipos de genes: una de estas zonas contiene genes que suprimen el desarrollo de los carpelos

(inhibidor femenino), mientras que los genes de las otras dos regiones promueven el desarrollo de las anteras (activadores masculinos) (Westergaard, 1946, 1958; Ye et al., 1991; Donnison y Grant, 1999; Lardon et al., 1999; Scutt et al., 1999). Esto está de acuerdo con la Teoría del Conflicto Sexual, que predice la migración de los genes masculinos al cromosoma Y o a autosomas (Wu y Xu, 2003).

La posibilidad de obtener individuos con genotipo YY fértiles, evidencia que la degeneración del Y tampoco ha alcanzado a la mayoría de los genes. De hecho, se han aislado dos genes completamente funcionales en el cromosoma Y, cuyos homólogos habían sido previamente descritos para los X. Además, no existen otras evidencias de degeneración del Y, ya que no aparece heterocromatinizado ni, por tanto, ha acumulado secuencias repetidas (ADN satélites o transposones), como es habitual en este tipo de cromosomas (Ruiz Rejón et al., 1994; Ali y Hasnain, 2002). La única prueba hasta la fecha de degeneración es el hallazgo de un gen en el cromosoma X cuya copia en el Y está degenerada e inactiva (Guttman y Charlesworth, 1998).

Esta segunda etapa representada por *S. latifolia*, según la hipótesis establecida (Charlesworth, 2002), constituiría un estadio en el que los cromosomas sexuales comienzan a acumular diferencias estructurales, dando lugar a cromosomas sexuales heteromórficos. De hecho, se ha podido demostrar a nivel molecular, que los genes determinantes del sexo se disponen en loci distintos en el cromosoma Y y en el cromosoma X (Moore et al., 2003). Probablemente, procesos de inversiones y/o translocaciones puedan estar involucrados en este tipo de reordenaciones, que promoverían la supresión de la recombinación y, por tanto, que las combinaciones alélicas que dan lugar a fenotipos masculinos y femeninos se vean afectadas.

Liu y col. (2004) han confirmado para la especie *Carica papaya* L. (papaya) gran parte de la teoría evolutiva general de los cromosomas sexuales representada por los dos estadios evolutivos descritos hasta aquí. En el año 1938 se estableció que un solo locus era el determinante del sexo en *C. papaya* (Hofmeyr, 1938). Este nuevo trabajo de 2004, supone un mapeo detallado del cromosoma LG1, portador de los genes involucrados en la determinación sexual, y confirma la existencia de un locus dominante que da lugar a la presencia de machos y hermafroditas. Dicho locus consta de unas 4,4 Mb, y se encuentra presente en una región no recombinante de esta pareja de cromosomas sexuales que, a pesar de ello, son morfológicamente indistinguibles. Esta región representa el 10% del total del cromosoma y contiene gran número de marcadores que cosegregan perfectamente con el sexo. Asimismo, se ha realizado un estudio comparativo con el resto de zonas autosómicas del genoma de *C. papaya* y se ha determinado que la densidad de genes en esa zona no recombinante es menor. Además, se ha detectado en esta región un número significativamente elevado de retroelementos así como de repeticiones invertidas. Esto podría suponer una etapa muy incipiente del proceso de cese de recombinación entre los cromosomas sexuales (Charlesworth, 2004). La historia de los cromosomas sexuales humanos predice, aparte de una acumulación masiva de elementos repetidos y

transponibles, la presencia de reordenaciones cromosómicas (inversiones y translocaciones) que favorecerían el aumento de la zona no recombinante desde la antigua región determinante del sexo (Lahn y Page, 1999; Skaletsky et al. 2003). Esta reducción progresiva en el proceso de recombinación ha sido demostrada también en el caso de plantas, para el género *Silene* (Nicolas et al., 2005).

Por último, encontramos dentro de los vegetales, una tercera etapa de diferenciación, que supone el estadio evolutivamente más avanzado. Como ejemplo representativo de este caso tenemos a *Rumex acetosa*. Como hemos mencionado anteriormente, esta especie presenta, además, un sistema de determinismo cromosómico del sexo complejo, en el que las hembras presentan 14 cromosomas ($12A + XX$), mientras que los machos tienen 15 cromosomas ($12A + XXY_1Y_2$). El cromosoma X es metacéntrico y el más grande del cariotipo. El Y_1 es metacéntrico también y es el siguiente en tamaño. El Y_2 es submetacéntrico y algo menor que el cromosoma Y_1 . Estos tres cromosomas forman un trivalente sexual en las meiosis de los machos. En él, se puede observar cómo una pequeña fracción del extremo de cada cromosoma Y aparea con cada extremo del X, quedando impedida la recombinación entre ambos, además de con el cromosoma X, en la mayor parte de su longitud (Parker y Clark, 1991).

La novedad que aporta este sistema de determinismo sexual es el hecho de que en los cromosomas sexuales aparecen señales inequívocas de degeneración. Los cromosomas Y de *R. acetosa* son en gran parte heteroplicnóticos. De hecho, se han descrito dos familias de ADN satélite presentes en ellos que son analizadas a lo largo de esta Memoria (Ruiz Rejón et al., 1994; Shibata et al., 1999, 2000a), siendo una de ellas específica de los cromosomas Y. Además, se han localizado otras muchas secuencias repetidas presentes en estos cromosomas sexuales (Clark et al., 1992).

Esta especie, pues, se encuentra en una etapa poco frecuente en el caso de vegetales y que, sin embargo, ocurre de manera mayoritaria en animales. Se han producido cambios tan drásticos en la estructura de sus cromosomas Y, que el sistema queda establecido definitivamente, quedando prácticamente (físicamente) impedida la recombinación. Además, han sido descritos genes presentes en los cromosomas Y de *R. acetosa*, involucrados en la fertilidad de los machos, como sucede, por ejemplo en humanos (Ainsworth et al, 1999).

Con respecto a la etapa propuesta como última dentro del proceso de evolución de los cromosomas sexuales, la compensación de dosis, poco se conoce en plantas. Se han llevado a cabo estudios en *Silene latifolia*, que a pesar de haber demostrado que los dos cromosomas X de las hembras difieren en el tiempo de replicación y que presentan patrones de metilación diferenciales (Vyskot, 1999), han fracasado en el intento de demostrar la heterocromatinización facultativa de alguno de los dos cromosomas X. En *R. acetosa*, teniendo en cuenta que el sistema de control genético de esta planta

es del tipo X:autosomas, sería de esperar que los fenómenos de compensación de dosis se manifestaran mediante la hiperactividad de los genes del cromosoma X de machos (Kelley y Kuroda, 1995). En este sentido, en la actualidad se están llevando a cabo por parte de nuestro grupo estudios de expresión génica diferencial en esta especie, que nos ayudarán a resolver algunas de las incógnitas que aún persisten.

1.3. El ADN repetido.-

En esta Memoria se van a estudiar, como se ha dicho previamente, los procesos evolutivos relacionados con el origen y la evolución de la dioecia y de los cromosomas sexuales, así como de los sistemas de control genético del sexo en el género *Rumex*. Para ello se van a utilizar una serie de marcadores genéticos de estos procesos. Entre ellos están por un lado dos tipos de secuencias de ADN repetido, como son el ADN satélite y el ADN ribosómico y, por otro, el ADN cloroplastidial. A continuación se analizan las características y la evolución de estos tipos de secuencias.

El genoma de las especies eucariotas se encuentra compuesto por gran cantidad de secuencias repetidas de distinta índole (Britten y Koune, 1968). Además, los estudios acerca de la cantidad de ADN por genoma haploide de las distintas especies (valor C), revelan lo que se ha dado a conocer como la "Paradoja del valor C" (Lewin, 1997; Graur y Li, 1999). Esto es, al comparar especies con similar complejidad evolutiva se observan diferencias significativas en este valor, que no están aparentemente correlacionadas con la complejidad "genotípica". Por ejemplo, el hombre tiene un genoma 300 veces más grande que la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, pero 200 veces menor que el de la ameba *Amoeba dubia* Schaeffer (Li, 1997; Gregory y Hebert, 1999). Esta diferencia es explicada por la presencia de ADN no génico. En plantas, los ejemplos son particularmente interesantes. El valor C en ellas, se presenta muy fluctuante e independiente del nivel de complejidad para la generalidad de los casos. Así, han sido descritos valores C de 0.06 pg para especies de angiospermas (*Cardamine amara* L.- Bennett y Smith, 1976 y 1991) o de pteridófitos (caso de la especie *Selaginella caulescens* Wall.- Bouchard, 1976), alcanzando cotas de C de hasta 127.40 pg en la especie *Fritillaria assyriaca* Baker (Bennett et al., 2000). Especialmente significativo es el caso del helecho *Psilotum nudum* L. (considerado como un auténtico fósil viviente con características anatómicas y morfológicas muy primitivas- Salvo Tierra, 1990) que presenta uno de los valores más elevados de C (72.68 pg) dentro de los pteridófitos (Obermayer et al., 2002). Estos valores, dentro del conjunto total de las gimnospermas o de los briófitos, se mantienen más o menos constantes, oscilando entre valores de 2.25 y 32.20 pg (Ohri and Khoshoo, 1986; Joyner et al., 2001) para el primer caso y 0.17 hasta 2.05 pg (Voglmayr, 2000) para el segundo.

Una gran parte de la paradoja del valor C se explica por la enorme cantidad de ADN repetido del genoma eucariota. El ADN repetido está integrado por ADN no génico, por secuencias repetidas codificadoras (familias

multigénicas y familias de genes que codifican ARN funcionales) (Singer y Berg, 1991; Lewin, 1994) así como por secuencias repetidas no codificadoras pero con funciones, como la centromérica o la función telomérica (Kipling, 1995; Choo, 1997).

Las secuencias de ADN repetido se clasifican según su función, el número de repeticiones que presenta y el tipo de distribución en el genoma (Graur y Li, 1999).

El primero de los criterios se refiere a que la secuencia se transcriba y codifique para algún producto génico, como en el caso de los genes de la actina, la tubulina o de los ARNs ribosómicos, que cumplan una función no codificadora como el ADN satélite centromérico y subtelomérico, o que por el contrario no tengan función conocida, como ocurre con parte del ADN satélite.

Atendiendo al número de repeticiones se pueden distinguir secuencias altamente, medianamente y moderadamente repetidas. El ADN altamente repetido está compuesto normalmente por secuencias cortas, cuyo tamaño oscila entre unas pocas y cientos de pb, que se repite cientos e incluso millones de veces a lo largo del genoma. El ADN satélite cumple estas características, por ejemplo. El ADN medianamente repetido está compuesto por secuencias de mayor tamaño, de cientos o miles de pb, que se repiten en torno a cien veces. Es el caso de los genes que codifican para ARNs ribosómicos. Por último, el ADN moderadamente repetido lo constituyen secuencias de gran tamaño que se repiten hasta una docena de veces. En este tipo de ADN estarían encuadrados los genes de las tubulinas, que se repiten de tres a cinco veces.

Con respecto a la distribución del ADN repetido en el genoma, se distinguen dos tipos de secuencias, las dispuestas en tándem y las dispersas. Dentro de las secuencias repetidas en tándem se encuentran los *microsatélites*, que son secuencias de pequeño tamaño (1 a 6 pares de bases) que se repiten en muchos loci dispersos por la eucromatina un número variable de veces, o los *minisatélites*, de características similares a los anteriores pero con un tamaño que oscila entre las 10 y 60 pares de bases. Por último, el ADN satélite, que está constituido por secuencias de mayor tamaño que se repiten entre cientos de miles y millones de veces en la heterocromatina, también se incluye en esta categoría de secuencias repetidas.

Las secuencias dispersas, por otro lado, incluyen las secuencias SINES (retrotranscritos de ARNs codificados por genes de tipo III) y LINEs (retrotransposones no virales), así como otro tipo de secuencias como transposones y elementos retrovirales.

La proporción de ADN repetido es muy variable según el organismo estudiado. Sin embargo, en gran parte de las especies vegetales esta proporción es muy alta, en torno a valores del 80% (Flavell, 1986). Murray y col. (1981) describieron un porcentaje de ADN repetido para el guisante, *Pisum sativum* L., del 97%, y aproximadamente el 95% del genoma de la cebada,

Hordeum vulgare L., está compuesto por secuencias repetidas (Sivolap y Verbitskaia, 1976) siendo este valor del 75% para el centeno, *Secale cereale* L. (Smith y Flavell, 1977).

A continuación hablaremos un poco más en profundidad de las características de algunos de estos ADN repetidos, concretamente del ADN satélite y del ADN ribosómico, que son los que en esta Memoria se han analizado y utilizado como marcadores moleculares de los procesos evolutivos estudiados en *Rumex*.

1.3.1. El ADN satélite.-

El ADN satélite está constituido por familias de secuencias cortas de ADN que se repiten de cientos de miles a millones de veces a lo largo de un genoma (Ugarkovic y Plohl, 2002) y que representan el principal constituyente de la heterocromatina constitutiva (Elder y Turner, 1995). Se trata de secuencias de entre 100 y 300 pb generalmente. Si bien existen excepciones que oscilan entre los pocos pb, como en el caso de las familias de ADN satélite encontradas en especies de *Drosophila* (Gall y Antherthon, 1974; Peacock et al., 1977), a los 1,750 pb de la unidad de repetición del ADN satélite común de cetáceos (Arnason et al., 1984) y los 2,600 pb de los monómeros del satélite de bovinos (Singer, 1982), pasando por los 930 pb de los que consta el satélite RAYSI, específico de los cromosomas Y de la especie vegetal *Rumex acetosa* (Shibata et al., 1999). A menudo se encuentran constituyendo agrupaciones de hasta 100 millones de pares de bases (Kubis et al., 1998; Schmidt y Heslop-Harrison, 1998; Charlesworth et al., 1994). Por lo general, se trata de secuencias no codificadoras (Elder y Turner, 1995), aunque parecen existir raras excepciones (McGregor y Sessions, 1986; Pardue y Henning, 1990; Bhatnagar et al., 2004).

En cuanto a vegetales se refiere, la última revisión de 2005 de la base de datos de ADN satélite de plantas, PlanSat (Macas et al., 2002), recoge más de 161 familias de ADN satélite descritas hasta la fecha, para más de 20 familias de plantas analizadas, siendo el número medio de nucleótidos por repetición de aproximadamente 165 pb (Macas et al., 2002).

Presenta este tipo de ADN procesos de acumulación y expansión explosivos así como propiedades replicativas preferenciales (Orgel y Crick, 1980). Suelen acumularse, de hecho, en regiones con baja tasa de recombinación (Charlesworth et al., 1994), apareciendo principalmente en centrómeros y en regiones subtelo méricas. Siguiendo esta argumentación, diremos que también se encuentran frecuentemente en cromosomas sexuales (Charlesworth et al., 1994), así como en segmentos supernumerarios (Houben et al. 2000; Shibata et al., 2000b) y en cromosomas B (Camacho et al., 2000). El principio de la Equilocalidad de la Heterocromatina (Heitz, 1933, 1934) propone que la heterocromatina, y por tanto, el ADN satélite, tienden a acumularse en regiones similares de cromosomas no homólogos, si bien, se han encontrado excepciones (Jamilena et al., 1993; De la Herrán et al., 2001a).

Asimismo, han sido descritas familias de ADN satélite situadas a nivel intercalar (Jamilena et al., 1993).

Se ha discutido mucho acerca de las funciones que el ADN satélite pueda desarrollar (ver por ejemplo: Brutlag et al., 1977; Donehower y Gillespie, 1979). A consecuencia de la gran variación que presentan sus secuencias, y sobre todo, porque no codifica para ningún producto, ha llegado a ser considerado como “ADN basura” (Ohno, 1972), “ADN ignorante” (Maresca y Singer, 1983), “ADN egoísta” (Doolittle y Sapienza, 1980) o como “parásito” intracelular (Orgel y Crick, 1980). Esta aparente falta de función contrasta, sin embargo, con su presencia en todos los organismos eucariotas, y con la tendencia de concentrarse en determinadas regiones cromosómicas. Así, en la actualidad se barajan varias hipótesis de distinta consideración. Se le atribuyen, como secuencias no codificantes, propiedades dentro de la organización y comportamiento de la cromatina a lo largo del ciclo celular, formando compartimentos heterocromáticos importantes para el correcto comportamiento de los cromosomas en mitosis y meiosis (Csink y Henikoff, 1998) o contribuyendo a la estructura tridimensional del núcleo interfásico (Manuelidis, 1982). Asimismo ha sido considerado como reservorio de material genético, de modo que la presencia combinada de elementos de ADN satélite y la capacidad de los genomas huéspedes para tolerar muchos de sus efectos podría contribuir a la rapidez con que se presenta la evolución en los organismos eucariotas (Fry y Salser, 1977; Arnason et al., 1978). Dos características que merecen una mención aparte son el papel que puede cumplir el ADN satélite en las funciones centromérica y subtelomérica (cf. Blackburn y Greider, 1995; Kipling, 1995; Choo, 1997).

Las unidades de repetición dentro de una familia de ADN satélite se encuentran, por lo general homogeneizadas, existiendo casos en los que el porcentaje de similitud es elevadísimo (Ruíz-Lara, et al., 1992; López-León, et al., 1995). Por otro lado, la literatura describe casos en los que presentan diferencias de hasta un 15% (Singer, 1982). Un caso extremo es el de la familia de ADN satélite centromérico alfa de humanos, donde los valores de divergencia pueden ser mayores del 30% (Willard y Waye, 1987a, 1987b; Alexandrov et al., 1988, 2001). En estos casos en los que el grado de divergencia intraespecífica es tan elevado se pueden definir subfamilias dentro de una misma familia de ADN satélite. También pueden definirse distintas subfamilias cuando cada una de ellas está caracterizada por monómeros que, aun siendo muy similares en sus secuencias, presentan una zona que es ampliamente diferente en unos con respecto a otros (Grellet et al., 1986; Garrido-Ramos et al., 1994). Además, se da este caso cuando existe una serie de sitios diagnóstico fijados en determinadas posiciones en cierto número de secuencias con respecto a otras. Tanto en este caso, como en los anteriores se ha postulado que fenómenos como la conversión génica están involucrados en el mantenimiento de ambas subfamilias (Drouin y Dover, 1990; Plohl y Ugarkovic, 1994a, 1994b).

Por otro lado, en cuanto a la estructura de la unidad de repetición se refiere, es necesario hacer algunas consideraciones importantes para la comprensión de los fenómenos evolutivos que en ellas operan. Por ejemplo, la

unidad monomérica de repetición puede presentar en algunos casos periodicidades internas que consisten en repeticiones tanto directas como inversas (Brutlag, 1980; Singer, 1982). Las repeticiones directas pueden estar relacionadas con el origen de este tipo de secuencias (Horz y Altengurger, 1981). A este respecto, se ha detectado en plantas la presencia en más del 80% de las familias estudiadas del motivo CAAAA, relacionado posiblemente con procesos de rotura-reunión de secuencias repetidas (Macas et al., 2002). Este tipo de análisis resulta de alto interés para comprender el origen y la evolución de este tipo de secuencias. A este respecto, se ha demostrado para tres familias de ADN satélite, como son la del satélite menor, centromérico, de *Mus musculus* L., para la familia centromérica EcoRI de *Sparus aurata* L. y en el satélite de *Oreochromis mossambicus/hornorum*, un origen mediante amplificación y posterior divergencia, a partir de secuencias de 9 nucleótidos (Horz y Altenburger, 1981; Wright, 1989; Garrido-Ramos et al., 1994). Existen, asimismo, demostraciones de que estas secuencias pueden formarse a partir de repeticiones más largas, caso de los satélites de las familias *Bovidae* y *Cervidae*, que se han originado a partir de unidades menores de 31 pb cada una (Plucienniczak et al., 1982; Bogenberger et al., 1985, 1987). Precisamente, Shibata y col. (1999) demostraron para el satélite RAE730, de 725 pb y presente en segmentos heterocromáticos autosómicos de la especie vegetal *Rumex acetosa*, un origen a partir de una subrepetición de 120 pb.

Las repeticiones inversas no adyacentes parecen, por otro lado, estar relacionadas con distintos procesos de amplificación del ADN (Oshima et al., 1992). Se ha descrito, asimismo, la presencia de secuencias palindrómicas (Gretarsdottir y Arnason, 1992; Plohl et al., 1993) que podrían intervenir en procesos de recombinación (Higgins et al., 1988) y, al igual que las repeticiones inversas, en eventos de amplificación (Cohen y Kopecko, 1976). En concreto, se han asociado ambos tipos de secuencias con sitios que intervienen en fenómenos de conversión génica, recombinación no homóloga y de intercambios de cromátidas hermanas (Israelewski, 1983; Henthorn et al., 1986; Krawinkel et al., 1986; Hyrien et al., 1987; Vogel et al., 1990). Estas secuencias también parecen estar involucradas en la configuración de estructuras cromosómicas, actuando como sitios de unión a proteínas (Gilson et al., 1986). La implicación de repeticiones inversas (palindrómicas o no) en estos procesos, está relacionada con la capacidad de formar estructuras secundarias tipo cruciformes, como horquillas o lazos (Lewin, 1997).

El ADN satélite tiene un ritmo de cambio superior al de cualquier otra secuencia en el genoma (Singer, 1982). De hecho, estas familias pueden aparecer y desaparecer en un tiempo evolutivo relativamente pequeño (Miklos, 1985). Así, una familia de ADN satélite puede ser exclusiva de una especie, como en el caso de las familias CgoA y CgoB del primate *Callimico goeldii* (Fanning et al., 1989), estar restringida a unas pocas especies emparentadas entre sí, como ocurre en las especies del género *Tritius* (Cremisi et al., 1988) o puede distribuirse en conjuntos amplios de especies, como sucede en las familias *Felidae* y *Cervidae* (Fanning et al., 1988 y 1993). No obstante, el grado de conservación puede ser aún mayor y existir secuencias de ADN satélite relacionadas entre sí en un grupo de familias emparentadas, caso del suborden

Mysticeti (Cetacea) (Arnason, 1990). Además, una familia de ADN satélite puede estar incluso conservada a nivel de orden, como ocurre con la familia alfa centromérica de primates (Willard, 1991; Fanning et al., 1993) o en cetáceos (Arnason, 1990). El hecho de que una familia de ADN satélite se encuentre restringida a un grupo reducido de especies, puede indicar un origen reciente de la misma (Singer, 1982). Por el contrario, cuando la familia de ADN satélite está conservada en un grupo taxonómico amplio, se puede deducir su mayor antigüedad.

1.3.2. El ADN ribosómico.-

En eucariotas, salvo raras excepciones, como son algunos protozoos y hongos (De la Herrán et al., 2000), los ADNs ribosómicos se encuentran constituyendo dos familias multigénicas distintas, la familia 45S, que codifica para los genes 18S, 5.8S y 26S/28S y la familia 5S, que lo hace para el gen 5S. Ambas familias suelen estar dispuestas en cromosomas distintos (Drouin y Moniz de Sá, 1995; Lewin, 2004), considerándose su presencia en un único cromosoma como ancestral en vertebrados (Fontana et al., 2003). Cada uno de estos loci está constituido por repeticiones (de cientos a miles de veces por genoma) de estas unidades ribosómicas dispuestas en tándem.

En plantas, los genes de la unidad 45S son, el 18S, el 5.8S y el 26S, en lugar del 28S, y se encuentran constituyendo una unidad de transcripción única, cuya longitud varía entre los 7.8 y 18.5 Kb según el grupo a considerar (cf. Lapitan, 1992) y que se repite de 570 a 32.000 veces por genoma nuclear haploide (Rogerds y Bendich, 1987). La estructura completa de esta unidad de transcripción se muestra en la **Figura 1**. Esta unidad incluye, aparte de los mencionados genes, dos espaciadores internos que se transcriben (ITS-Internal Transcribed Spacers); el ITS-1, que separa los genes 18S y 5.8S, y el ITS-2, que se encuentra entre los genes 5.8S y 26S. Cada una de estas unidades de transcripción se encuentra a su vez separada de la contigua por dos tipos de espaciadores. Un espaciador externo que también se transcribe, ETS (External Transcribed Spacer) que flanquea el gen 18S en su extremo 5' y al 28S en el 3' y otra secuencia que originariamente se consideró como no transcrita, NTS (Non-Transcribed Spacer), situada entre los dos ETSs. Más recientemente, se ha comprobado que esta última secuencia se transcribe a niveles bajos en algunas especies (Millar et al., 1983; Reeder, 1990) y que está involucrada en la regulación de la transcripción de los genes ribosómicos, por lo que ha pasado a denominarse con más propiedad, IGS (Intergenic Spacer). Por su parte, los genes 5S se encuentran separados entre sí por secuencias espaciadoras NTSs (Lewin, 2004).

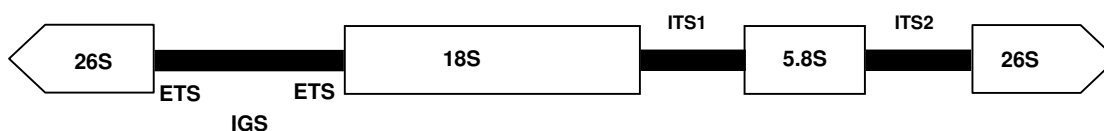


Figura 1: Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 45S completa de plantas

Los genes ribosómicos se localizan en regiones morfológicas bien distinguibles denominadas regiones organizadoras nucleolares (NORs). La formación de los nucleolos tiene lugar durante la transcripción de los ARNs ribosómicos, el procesamiento de los precursores de ARN y el ensamblaje de los ribosomas. Cada cluster de genes ribosómicos repetidos da lugar a un nucleolo. Se trata de regiones muy variables, no sólo en cuanto a su tamaño o expresión (*cf.* Álvarez y Wendel, 2003), sino también en cuanto a su número y localización. Normalmente estos dos últimos parámetros son variables incluso a nivel infragenérico (Garrido-Ramos et al., 1992; Cuñado et al., 2000).

En la actualidad la secuencia de estas familias multiméricas se encuentra caracterizada para un amplio rango de especies (Opiola et al., 1996; Heslop-Harrison, 2000; Sumida et al., 2004). Globalmente, la secuencia de los genes se encuentra muy conservada en eucariotas, debido a su función crucial en el funcionamiento de la maquinaria celular (Barciszewska et al., 1985). Por ello, las variaciones observables en longitud o en secuencia nucleotídica, reside fundamentalmente en las secuencias espaciadoras. Así, por ejemplo, la longitud de las secuencias ITS varía aproximadamente entre los 500 y 700 pb en angiospermas (Baldwin et al., 1995) y entre los 1,500 a 3,700 pb en gimnospermas (Bobola et al., 1992; Liston et al., 1996; Maggini et al., 2000). El ADN ribosómico 5S también varía en tamaño fundamentalmente a consecuencia de la existencia de distintas variantes de los espaciadores NTS (Martins y Galetti, Jr. 2001; Negi et al., 2002; Robles et al., 2004). Algunas de estas diferencias en tamaño de secuencias de las unidades de ADN ribosómico entre especies emparentadas pueden ser utilizadas con fines cladísticos (Persson, 2000).

Las diferencias interespecíficas en la secuencia nucleotídica de los ITS ha sido cifrada en valores de hasta un 39% entre especies filogenéticamente muy emparentadas (Baldwin et al., 1995). Estas diferencias se atribuyen a la alta tasa de cambio que estas secuencias presentan a consecuencia de la baja presión selectiva a la que están sometidas, en comparación con secuencias codificadoras. Este hecho les permite albergar cierto número de mutaciones neutras que dan lugar a la variación observable. No obstante, es necesario tener presente que estas secuencias se transcriben y están involucradas en ciertos procesos de la maduración del ARN (Van Nues et al., 1995; Bena et al., 1998), por lo que su tasa evolutiva es moderadamente rápida. Además, estas secuencias evolucionan concertadamente (ver más adelante en el apartado Evolución del ADN repetido de esta Memoria), lo que lleva consigo un alto

grado de homogenización intragenómica e intraespecífica así como ciertos niveles de divergencia interespecífica. Todo ello las ha convertido en marcadores válidos para la inferencia de relaciones filogenéticas entre especies muy emparentadas (Desfeux y Lejeune, 1996; Kindt et al., 2005; Ronsted et al., 2005) (ver capítulo 1.5 de esta Memoria)

Si bien, los datos obtenidos de este tipo de secuencias deben de ser tomados con cautela y en combinación con otros caracteres o marcadores, ya que no han sido pocos los estudios que han demostrado la existencia de polimorfismos a nivel intraespecífico e intraindividual (*cf.* Álvarez y Wendel, 2003). La existencia de estos polimorfismos se ha relacionado con fallos en los mecanismos relacionados con la evolución concertada y con la aparición de pseudogenes (Buckler y Holtsford, 1996a, b; Bucker et al., 1997; Muir et al., 2001; Wei et al., 2003; Ruggiero y Procaccini, 2004). A su vez, las limitaciones demostradas para ciertos tipos de inferencias filogenéticas, se han revelado como beneficiosas a la hora de detectar otros fenómenos evolutivos, como los casos de evolución reticulada, especiación híbrida y origen de poliploides (Rieseberg y Wendel, 1993, Wendel et al., 1995; Fuentes-Aguilar et al., 1999).

1.3.3. Evolución del ADN repetido.-

Las familias de ADN repetido, no evolucionan independientemente y sí como una única entidad siguiendo un tipo de evolución que se denomina concertada (Dover, 1982, 1986). Su fundamento radica en que las unidades de repetición intercambian información de manera que existe un alto grado de homogeneidad intrafamiliar. La evolución concertada incluye, por lo tanto, la transferencia horizontal de las mutaciones entre los miembros de una misma familia (homogeneización), así como la propagación de ese cambio a lo largo de los individuos que constituyen una población (fijación). La tasa de cambio de los ADNs repetidos no codificantes, y por tanto no sujetos a una fuerte presión de selección, es mayor por lo general que la de cualquier otra fracción del genoma. Además, la tasa a la que ocurre la homogeneización intraespecífica es mayor que la tasa a la que aparecen las mutaciones y, a la vez, menor que la tasa de fijación. Por tanto, la evolución concertada conlleva no sólo una homogeneización intraespecífica de secuencias, sino también la divergencia interespecífica. Podríamos hablar de un proceso evolutivo constituido por ciclos de sustitución, homogenización, fijación, sustitución,...

Este proceso es especialmente fácil de observar y medir en el caso de las familias de ADN satélite. Dada la escasa presión selectiva a la que se encuentran sometidas, las familias de ADN satélite presentan una tasa evolutiva muy alta, sus secuencias se encuentran en constante cambio y sus posiciones se reemplazan continuamente por otras nuevas en la población. Es entonces posible, la concepción de un método para cuantificar estos procesos moleculares en ausencia de selección. Con este objeto, Strachan y col. (1985), desarrollaron un modelo que detecta los estados de transición durante la homogenización de dos familias no génicas evolucionando en paralelo, como

puede ser el caso una familia de ADN satélite presente en dos especies muy emparentadas, de tal forma que se analizan los patrones de variación de cada posición nucleotídica, considerada independientemente, mediante un análisis comparativo de las secuencias de una especie por un lado con respecto a las de la otra. Este tipo de estudios es posible a pesar de que las familias de ADN satélite aparecen y desaparecen de manera brusca, porque durante su tiempo de vida evolucionan de una manera gradual y cohesiva.

Este método de cuantificación de la variación, detecta aquellas variantes fijadas, así como los diferentes estados de transición del proceso desde la mutación hasta la fijación. De esta manera, el patrón de transición de cada posición nucleotídica se clasifica en forma de 6 estados de transición. Estos estados de transición van desde la presencia del mismo nucleótido en una posición (I o posición monomórfica) hasta la fijación de una variante (V o posición fijada) o hasta la aparición posterior de una nueva mutación que comienza el ciclo (VI). El estado de transición V constituye la clásica observación de la ocurrencia de la evolución concertada (Dover, 1982; Arnheim, 1983), y es el resultado final del proceso de homogeneización y fijación de mutaciones que evolucionan independientemente en dos poblaciones determinadas. El resto de mutaciones que suceden a partir de este momento son consideradas como un estado de transición VI (para más detalles ver apartado 3.7.1 de Material y Métodos y **Figura 4**).

Dos factores son considerados como los principales motores a nivel molecular de la evolución concertada: el entrecruzamiento desigual (Smith, 1976) y la conversión génica (Edelman y Gally, 1970; Ohta, 1990).

El entrecruzamiento desigual es un mecanismo basado en el intercambio desigual entre dos unidades cromosómicas (entre las dos cromátidas hermanas de un cromosoma durante mitosis o entre dos cromosomas homólogos en meiosis) que interviene tras la duplicación, proceso básico de aparición de cualquier familia de secuencias repetidas (Smith, 1974; Strachan et al., 1985; Dover, 1993). El entrecruzamiento desigual supone una alteración en el número de copias, ya que se trata de una recombinación no recíproca que crea una multiplicación de la repetición en una cromátida a costa de la delección correspondiente en la otra. Este proceso cobra esencial importancia en familias con gran número de repeticiones, ya que en cada evento puede tener lugar el intercambio de multitud de secuencias.

La conversión génica es, por su parte, un proceso que no altera el número de copias de las unidades de repetición, aunque interviene tanto en secuencias dispuestas en tándem como en secuencias dispersas (para que el entrecruzamiento desigual intervenga, secuencias de distintos loci han de ponerse en contacto, cosa que suele resultar en reorganizaciones letales cuando hablamos de elementos dispersos en el genoma). La conversión génica es un proceso de recombinación no recíproco por medio del cual dos secuencias de una familia interactúan con el resultado de que una es transformada en la otra. Puede ser sesgada, en caso de que exista una ventaja/desventaja conversional para una u otra secuencia, o no sesgada. Se conocen casos en los que fenómenos de conversión génica han contribuido a

la evolución de este tipo de familias (ver por ejemplo, Whitehouse, 1982; Strachan et al., 1984; Guyen et al., 1985 o Strachan et al., 1985; Plohl y Ugarkovic, 1994).

Otros mecanismos moleculares (Dover, 1982, 1986) de menor entidad como la transposición, el deslizamiento de las cadenas durante la replicación, la transferencia a través de intermediarios de ARN o a través de elementos circulares extracromosómicos, han sido propuestos como mecanismos moleculares alternativos coactuantes en el proceso de evolución concertada.

No obstante, recientemente Feliciello y col. (2005) han propuesto una nueva hipótesis para explicar la evolución concertada mediante un proceso saltacional, cuyo motor sería una amplificación siguiendo el modelo tipo círculo rodante, acoplado a la evolución por selección natural de determinadas variantes. Este proceso saltacional estaría además involucrado en eventos de especiación (Feliciello et al., 2005).

Asimismo, la evolución concertada se ve influenciada por otro tipo de factores entre los que se encuentran el número y la disposición de las repeticiones, la estructura de la unidad repetida o su requerimiento funcional, además de la influencia de la estructura genética de las poblaciones y los cambios que en éstas hayan podido acontecer (Graur y Li, 1999).

El número de las repeticiones es importante para estimar el tiempo que tardarán en homogeneizarse todas las repeticiones presentes en una población determinada. La disposición de éstas (en loci aislados o en loci que intercambian información, por ejemplo) es también un parámetro importante para estudiar la homogeneización de un satélite.

Por último, la estructura genética de las poblaciones (tamaño efectivo de la población, aislamiento geográfico, acción de la selección natural,...), así como aspectos evolutivos (tiempo de divergencia o fenómenos de hibridación y poliploidización), necesitan una consideración adicional cuando nos encontramos con un estudio de secuencias repetidas.

A pesar de que la mayoría de los estudios parecen coincidir en que las secuencias repetidas evolucionan concertadamente (Ugarkovic y Plohl, 2002), existen casos concretos en los que esto no parece ocurrir. Uno de los casos más conocidos es el de la mosca tsétsé, para el que Trick y Dover (1984) observaron altos valores de variación de secuencias tanto a nivel intra como interespecífico. La ausencia de evolución concertada está atribuida, en esta ocasión, a la baja tasa de homogeneización. Asimismo, los fenómenos de hibridación interespecífica han sido utilizados para explicar la ausencia de evolución concertada en las familias de ADN satélite *Hind III* y *Pst I* de esturiones (de la Herrán et al., 2001; Robles et al., 2004, 2005).

En los casos en los que no existe evolución concertada, y el tiempo de divergencia es grande, la mayor parte de las posiciones nucleotídicas se presentan como estados de transición II o III, en el proceso de

homogeneización, si ésta es la que falla. Si la ausencia de evolución concertada es debida a un escaso tiempo de divergencia, sin embargo, la mayor parte de los sitios polimórficos que nos encontramos, son polimorfismos compartidos o sitios no-Strachan. Si bien, una situación similar también es posible cuando, existiendo tiempo de divergencia suficiente entre las dos especies comparadas, fallan los mecanismos de homogeneización. En este caso abundarán los estados de transición II y III, frente a los IV y V.

1.4. El ADN cloroplastidial.-

Está ampliamente aceptado que el origen de los plastidios actuales de plantas está en la endosimbiosis de una bacteria fotosintética (presumiblemente una cianobacteria) y un hospedador no fotosintético (Howe et al., 1992). El ADN cloroplastidial que conocemos en nuestros días, es una molécula de ADN circular de unas 100 a 200 kb. No obstante, Oldenburg y Bendich (2004) han propuesto que estos ADNs circulares convivirían con moléculas más complejas formadas por varios genomas cloroplastidiales no siendo, por lo tanto, la forma circular la estructura exclusiva del ADN de estos orgánulos.

Cada genoma cloroplastidial contiene aproximadamente de 100 a 200 genes (Sugiura, 1992; Glöckner et al., 2000). Esta cifra es significativamente baja considerando simplemente que la maquinaria fotosintética requiere un número superior de genes para su funcionamiento. Además, existen algunas excepciones más drásticas como la que constituyen los minicírculos de dinoflagelados, que usualmente contienen un único gen (Zhang et al., 1999; Barbrook & Howe, 2000; Barbrook et al., 2001; Hiller, 2001) o la de la planta no fotosintética *Epifagus*, que ha perdido todos sus genes fotosintéticos (Wolfe et al., 1992). Comparando cualquiera de estos números con la cifra media de genes que presenta cualquier cianobacteria actual (unos 3200- Nakamura et al., 1998), y asumiendo que el endosimbionte que originó el sistema de plastidios actual presentaba similares características, encontramos que gran número de genes han debido de perderse durante la historia evolutiva de los cloroplastos o haber sido transferidos al genoma nuclear (Martin et al., 1998). En la actualidad se conoce que la migración de genes desde el genoma cloroplastidial hasta el nuclear ha sido un fenómeno constante y frecuente en la historia evolutiva no sólo de los cloroplastos (Allen y Raven, 1996; Race et al., 1999), sino de las mitocondrias también (Lang et al., 1999). Algunas teorías confieren una ventaja selectiva a esta migración, considerando a estos genes como “refugiados moleculares” (Howen et al., 2000).

En la actualidad varios genomas cloroplastidiales completos han sido secuenciados de otras tantas plantas pertenecientes a muy diversos táxones (un alga, *Euglena*- Hallick et al., 1993, un briófito, *Marchantia*- Ohyama et al., 1986, una conífera, el pino negro *Pinus thunbergii* Parl. – Wakasugi et al., 1994, una dicotiledónea, el tabaco, *Nicotiana tabacum* L.- Shinozaki et al., 1996, una monocotiledónea, el arroz, *Oryza sativa* L.- Hiratsuka et al., 1989, y

la dicotiledónea parásita *Epifagus* Nutt.- Wolfe et al., 1992). Esto nos ofrece una imagen bastante ajustada de las particularidades de este tipo de ADN. A grandes rasgos, se trata de un ADN relativamente constante en cuanto a su estructura y al número de genes, destacando significativamente su alto contenido en AT (60-70%- Kowallik et al., 1995; Reith y Munholland, 1995). Los genes que constituyen el ADN cloroplastidial se encuentran en una configuración muy apretada, ya que se encuentran separados entre sí por pequeñas regiones de ADN no codificante. Así, para el genoma cloroplastidial del arroz, se ha determinado que tan sólo un 32% del total se corresponde con estas regiones espaciadoras (Clegg et al., 1994). Una característica especialmente destacable es la presencia masiva de intrones en la estructura de estos genes.

El ADN cloroplastidial presenta tasas evolutivas relativamente bajas, si bien es necesario hacer una consideración por separado de cada una de las regiones en las que estructuralmente puede dividirse, para afrontar el problema con propiedad (Clegg et al., 1994). Por ejemplo, las regiones espaciadoras entre los genes cloroplastidiales han demostrado seguir un patrón mutacional complejo, con la presencia frecuente de deleciones. Este fenómeno ha sido atribuido a la acción depuradora de la recombinación (intra e intermolecular), que en regiones con baja presión selectiva como ésta, va retirando las secuencias prescindibles del genoma cloroplastidial. Los genes, por su parte, a consecuencia del significativo enriquecimiento en AT, presentan un sesgo importante en el uso de codones y sus tasas evolutivas podrían variar según los grupos considerados. Por el contrario, los intrones presentan un patrón mutacional más o menos claro y existe un alto grado de conservación en la secuencia de intrones de genes homólogos (Learn et al., 1992). El efecto de las mutaciones estaría restringido por la importancia que tiene la estructura secundaria en el proceso de *splicing* de estos intrones.

1.5. Uso del ADN ribosómico, el ADN cloroplastidial y el ADN satélite en estudios evolutivos y en análisis filogenéticos.-

La puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto una auténtica revolución en el mundo de la Sistemática. Tanto es así, que gran parte de los estudios sistemáticos o evolutivos de la última década incluyen el uso de algún tipo de secuencia nucleotídica como marcador molecular. Probablemente la propuesta más extrema e indicativa de la tendencia actual, es la del Consortium for the Barcode of Life (www.barcoding.si.edu), que pretende crear una base de datos para la identificación de cualquier espécimen animal o vegetal valiéndose exclusivamente de marcadores moleculares.

Según los criterios de máxima utilidad propuestos por Kress y col. (2005), un marcador molecular debe cumplir los siguientes requisitos para ser usado en estudios filogenéticos y evolutivos: i) Presentar tasas evolutivas coherentes con los niveles de variabilidad y divergencia de los táxones comparados ii) Ser de un tamaño adecuado para facilitar la extracción de ADN

así como su amplificación (Este punto cobra especial relevancia cuando consideramos especímenes de museo o pliegos de herbario, ya que se ha demostrado que un número de copias alto y un tamaño de secuencia relativamente pequeño, incrementa significativamente la eficacia de la PCR) iii) Presencia de sitios flanqueantes conservados que permita el diseño de cebadores específicos.

La célula vegetal contiene tres genomas: el mitocondrial, el cloroplastidial y el nuclear. Los dos genomas citoplasmáticos son generalmente de herencia uniparental (en angiospermas normalmente materna), mientras que el genoma nuclear es de herencia biparental.

El genoma mitocondrial ha centrado principalmente estudios evolutivos en táxones animales (Lavrov y Lang, 2005; Li et al., 2005), sin embargo, este ADN presenta una tasa de cambio demasiado lenta en plantas (Cho et al., 1998; Cho et al., 2004), y no es adecuado para este tipo de estudios. Además, la estructura del genoma mitocondrial vegetal cambia rápidamente (Adams y Palmer, 2003), impidiendo la existencia de secuencias espaciadoras universales potenciales candidatos a ser empleadas en Filogenia Molecular (Luo et al., 1995).

El ADN cloroplastidial es muy utilizado como marcador molecular en estudios vegetales ya que posee una tasa evolutiva intermedia entre la del ADN mitocondrial de plantas y la del ADN nuclear. De hecho, un elevado número de cebadores están disponibles para otros tantos marcadores cloroplastidiales, ya sean genes, intrones o espaciadores intergénicos (Kress et al., 2005). Algunos de los más importantes loci usados en filogenia molecular de plantas son la *rbcL*, el espaciador intergénico *trnL-F* y los intrones de los genes *trnL*, *matK*, *ndhF* y *atpB* (Gielly y Taberlet, 1994; Soltis et al., 2001; Shaw et al., 2005). Nosotros en esta memoria hemos utilizado dos marcadores cloroplastidiales, el intrón *trnL* (UAA) y el espaciador entre los genes *trnL*(UAA) y *trnF*(GAA).

En cuanto a los marcadores nucleares se refiere, muchos han sido los loci utilizados (*cf.* Strand et al., 1996). Pero sin duda, los espaciadores ITS-1 e ITS-2 del cistrón ribosómico 45S han sido los loci más empleados en estudios filogenéticos (Álvarez y Wendel, 2003). Se ha demostrado su utilidad en eucariotas fotosintéticos (excepto helechos) y hongos (Varga et al., 2000; Schroeder et al., 2001), a pesar de sus limitaciones. Estas son: reducido grado de variabilidad en ciertos grupos, existencia de secuencias parálogas que requieren la secuenciación de múltiples copias, existencia de estructuras secundarias que dificultan la secuenciación y los frecuentes casos de contaminación ya sea endógena o exógena (Álvarez y Wendel, 2003). Nosotros en esta Memoria hemos utilizado los espaciadores ITS-1 e ITS-2 en combinación con los marcadores cloroplastidiales citados. En los últimos años el uso conjunto de diversos marcadores tanto nucleares como citoplasmáticos ha demostrado una resolución adecuada para resolver problemas taxonómicos a distintos niveles (Harris et al., 2002; Mansion y Struwe, 2004; Yi et al., 2004;

Kyndt et al., 2005), siendo asimismo indicado este tipo de análisis en la asignación de códigos de barras moleculares en plantas (Kress et al., 2005).

El ADN satélite, por su parte, ha sido también utilizado con éxito para detectar relaciones filogenéticas entre grupos de especies vegetales y animales estrechamente emparentados, siguiendo dos aproximaciones fundamentalmente. Así, estas relaciones de parentesco pueden inferirse mediante una comparación de secuencias y su grado de divergencia. De acuerdo con esta visión, varios son los niveles taxonómicos que se pueden abarcar, en función del grado de variabilidad de la familia de ADN satélite en cuestión. Por ejemplo, Arnason y col., en diversos estudios (Arnason, 1990; Arnason et al., 1992; Grétarsdóttir y Arnason, 1992, 1993) han demostrado la utilidad de varias familias de ADN satélite en la filogenia molecular del orden *Cetaceae*. Varias familias de ADN satélite han sido también empleadas para trazar una filogenia en la familia de peces *Sparidae* (de la Herrán et al., 2001). Pons y col., por su parte, han utilizado la familia de ADN satélite PIM357 en el género *Pimelia* para inferir relaciones de parentesco entre distintas poblaciones endémicas de las Islas Canarias (Pons et al., 2002). Algunas de estas filogenias han sido posteriormente confirmadas utilizando otros marcadores moleculares adicionales (Arnason y Gullberg, 1994; Orrell y Carpenter, 2004).

Igualmente, incluso cuando no es posible inferir relaciones filogenéticas con claridad mediante comparación de tasas evolutivas, a consecuencia de fallos en los mecanismos implicados en la evolución concertada, el estudio de la distribución del ADN satélite a distintos niveles actúa como buen marcador cladístico. Asumimos para ello que el hecho de que un grupo de especies comparta una misma familia de ADN satélite, demuestra que todas ellas comparten un ancestral común. Es por esto que este tipo de ADN puede resultar decisivo en la resolución de diversas dudas taxonómicas y filogenéticas. Así, un análisis de presencia/ausencia de las familias de ADN satélite correspondientes, sirve para diferenciar especies de los géneros *Pagrus* y *Sparus* (Garrido-Ramos et al., 1998) o para caracterizar distintas especies del género *Populus* (Rajagopopal et al., 1999), por citar algunos ejemplos.

Por otro lado, el ADN satélite presenta ciclos explosivos de aparición y desaparición, alternados con procesos de evolución concertada cohesiva y gradual (ver apartados 1.3.1 y 1.3.3. de esta Memoria). Las particularidades de su estructura y patrones evolutivos hacen que el ADN satélite sea un excelente marcador de determinados procesos, como la degeneración de los cromosomas Y (Krzywinski et al., 2005; Li et al., 2005), la formación de segmentos supernumerarios (Shibata et al., 2000) o de cromosomas B (Hasterok et al., 2002; Cabrero et al., 2003) así como de diversos procesos evolutivos relacionados con el origen, la acumulación y la evolución de las secuencias repetidas (Pons et al., 2003; Alkan et al., 2004; Lorite et al., 2004; Luchetti et al., 2004; Robles et al., 2004; Sharma y Raina, 2005).

2.- OBJETIVOS

El género *Rumex* (*Polygonaceae*) presenta una serie de características en relación con los sistemas reproductivos que presenta, así como de sus sistemas de cromosomas sexuales, que lo hacen muy interesante. Así, en este grupo coexisten especies hermafroditas, polígamas, ginodioicas, monoicas y dioicas. Asimismo, las especies dioicas presentan sistemas de cromosomas sexuales en distintos estadios evolutivos, simples (XX/XY) y complejos (XX/XY₁Y₂). Por ello, nos hemos propuesto analizar el proceso que ha seguido la evolución de estos sistemas reproductivos, la evolución de los sistemas de determinación sexual y el origen y la evolución de los cromosomas sexuales. Concretamente, en esta Memoria se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

- PRIMERO.-** Revisar la filogenia actual del género *Rumex*, basándonos en una serie de marcadores moleculares tanto nucleares como cloroplastidiales, centrándonos principalmente en el origen y la evolución de la dioecia en este grupo de especies. Se pretende con ello dar respuesta a diferentes cuestiones evolutivas como son: i) si la dioecia ha aparecido en *Rumex* una o varias veces; ii) si los sistemas de control genético del sexo basados en la presencia de un Y activo son anteriores a los basados en el balance X y autosomas; iii) si los sistemas de cromosomas múltiples son derivados de sistemas simples XX/XY; iv) si es posible inferir una nueva sistemática infragenérica para las especies de *Rumex* congruente con la evolución de los sistemas reproductivos y la evolución cariotípica.
- SEGUNDO.-** Analizar diferentes familias de ADN satélite presentes en los genomas de las especies de *Rumex* con el fin de analizar su origen y evolución y utilizarlos como marcadores moleculares del proceso evolutivo de formación y degeneración de los cromosomas sexuales de plantas.
- TERCERO.-** Iniciar un estudio de caracterización citogenética de las especies de *Rumex* con diferentes sistemas de determinación sexual y analizar el patrón evolutivo de los cromosomas sexuales de plantas.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material Empleado y Procedencia del mismo.-

En el presente trabajo se ha analizado material de 31 especies pertenecientes al género *Rumex*. Dichas especies fueron seleccionadas de acuerdo con el subgénero en el que se encuentran actualmente clasificadas, así como en función de su sistema reproductivo, su sistema de determinación sexual, el sistema cromosómico que presentan o su número cromosómico básico, incluyendo por tanto en el estudio las especies más representativas de cada uno de los grupos en que se divide el género *Rumex*. Asimismo, la especie *Fallopia convolvulus* L. (*Polygonaceae*) fue empleada como especie de referencia externa o *outgroup* (**Tabla 2**).

Siempre que fue posible la recolección de material se llevó a cabo en campo. Sin embargo, algunas de las especies fueron germinadas y mantenidas en las instalaciones del Departamento de Genética de la Universidad de Granada y en el Departamento de Biología Aplicada (Área de Genética) de la Universidad de Almería para facilitar su manejo. En los casos en los que no fue posible acceder a material de las poblaciones naturales se recurrió a material procedente de pliegos de herbario (**Tabla 2**). Por otro lado, las semillas recolectadas fueron conservadas en condiciones de humedad y temperatura adecuadas para su posterior germinación.

3.2. Preparación del material.-

Para el material procedente directamente de poblaciones naturales o de cultivo, varios pies de planta por población y especie fueron muestreados e individualizados, haciendo la distinción entre individuos macho y hembra en las especies dioicas. Tras la determinación de las plantas se procedió a la extracción de ADN a partir de material de hojas y el resto de material foliar fue conservado a -80°C para posteriores procesados.

El ADN de este tipo de material se obtuvo con la utilización del kit comercial, "Plant DNAzol® Reagent" (Invitrogen) con algunas ligeras modificaciones introducidas por nosotros. Así, los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1 Aproximadamente 0.2 g de tejido foliar se pulveriza en morteros de porcelana, en presencia de nitrógeno líquido. Verter en tubos *Eppendorf* de 1.5 ml de capacidad y se ponen en contacto con 0.6 ml tampón de extracción durante 5 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Añadir entonces 0.6 ml de cloroformo, agitar vigorosamente e incubar otros 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga, entonces, 10 min a 13,000 rpm.
- 2 El sobrenadante se separó en un tubo eppendorf nuevo y se precipitó el ADN con 0.5 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión suavemente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm.

- 3 El precipitado obtenido se lava con una mezcla de etanol absoluto:tampón de extracción (1:0.75) y se vuelve a centrifugar 5 min a 10,000 rpm.
- 4 A continuación se procede al lavado con etanol al 70%, se centrifuga 3 min a 10,000 rpm para dejar secar al aire el precipitado y resuspenderlo en el volumen adecuado de H₂O_{dd}.
- 5 En ocasiones es observable un precipitado insoluble. En ese caso se procede a incubar la muestra durante toda la noche a 55°C para conseguir la resuspensión total.

En cualquier caso, la cantidad de ADN obtenida, así como su calidad, se determinó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, con el uso de marcadores de peso molecular conocido (*Lambda* digerido con *Hind III*-Biotools). El ADN obtenido fue, a grandes rasgos, de alto peso molecular y adecuado para las técnicas de Southern-blot, digestión con endonucleasas de restricción y PCR.

Para el caso de material procedente de pliegos de herbario, el método anterior no fue lo suficientemente efectivo a consecuencia del estado de degradación que éste presenta. En estos casos se siguió el protocolo del CTAB (Doyle y Doyle, 1987) tal y como se describe a continuación:

1. Se hidratan 0.01 g de tejido durante toda la noche en H₂O_{dd},
2. Se tritura dicho material en presencia de nitrógeno líquido, en un tubo de 1.5 ml y se añaden 0.5 ml de tampón de extracción (CTAB al 4% de PVP). Incubar toda la noche a 60°C.
3. Posteriormente se añade 0.5 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitando por inversión. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se traspara a un nuevo tubo de 1.5 ml para repetir el proceso anterior.
4. El ADN se precipita añadiendo 1/12 y 1/17 en µl del volumen final del sobrenadante de 7.5 M de acetato amónico e isopropanol respectivamente. Se agita por inversión y se coloca a -20°C durante 2 h.
5. Una vez transcurrido ese tiempo se centrifuga nuevamente a 13,000 rpm durante 3 min. Se elimina el sobrenadante y se deja secar el precipitado obtenido a temperatura ambiente.

6. Añadir 1 ml de etanol de 70% y centrifugar a 13,000 rpm durante 3 min. Repetir el proceso con etanol de 95%. Una vez seco el precipitado, resuspender en el volumen adecuado de H₂O_{dd}.

Especie	Sistema Reproductivo	X
Subgénero Acetosa		
Sección Acetosa		
<i>Rumex acetosa</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex intermedius</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex papillaris</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex thyrsoides</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
<i>Rumex tuberosus</i>	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	7
Sección Americanae		
<i>Rumex hastatulus</i> (RNC)	Dioecia (XX/XY ₁ Y ₂)	4
<i>Rumex hastatulus</i> (RTX)	Dioecia (XX/XY)	5
<i>Rumex paucifolius</i>	Dioecia (XX/XY)	7
Sección Scutati		
<i>Rumex induratus</i>	Hermafroditismo-Poligamia	10
<i>Rumex roseus</i>	Hermafroditismo-Poligamia	10
<i>Rumex scutatus</i>	Hermafroditismo-Poligamia	10
<i>Rumex suffruticosus</i>	Dioecia (?)	?
Sección Hatati		
<i>Rumex hastatus</i>	Poligamia-Ginodioecia	9
<i>Rumex maderensis</i>	Poligamia-Ginodioecia	10
<i>Rumex lunaria</i>	Poligamia-Ginodioecia	9
Sección Vesicarii		
<i>Rumex cyprius</i>	Hermafroditismo-Poligamia	9
<i>Rumex vesicarius</i>	Hermafroditismo-Poligamia	9
Sección Afroacetosa		
<i>Rumex abyssinicus</i> (SsA)	Poligamia	9
<i>Rumex sagittatus</i> (SsS)	Dioecia	9
Subgénero Acetosella		
<i>Rumex acetosella</i>	Dioecia (XX/XY)	7
<i>Rumex graminifolius</i>	Dioecia (XX/XY)	7
Subgénero Rumex		
<i>Rumex aquitanicus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex conglomeratus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex crispus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex cristatus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex giganteus</i>	Monoecia	10
<i>Rumex japonicus</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex obtusifolius</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex patientia</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex pulcher</i>	Hermafroditismo	10
<i>Rumex sanguineus</i>	Hermafroditismo	10
...		
Subgénero Platypodium		
<i>Rumex bucephalophorus</i>	Hermafroditismo	8
<i>Fallopia convolvulus</i> (outgroup)	Hermafroditismo	10

Tabla 2: Lista de especies analizadas en esta Memoria

Para obtener el material de las preparaciones cromosómicas meióticas y mitóticas de algunas especies se emplearon flores y meristemos radiculares, respectivamente.

Las yemas florales preferentemente masculinas se fijaron *in vivo* en 3:1 etanol:ácido acético y fueron conservadas a 4°C para el análisis de células meióticas. Las semillas fueron germinadas en placas de Petri a 25°C, para posteriormente ser tratadas con 2mM 8-hidroxiquinoleína de 1 a 2 h a la temperatura de germinación, seguido de otro tratamiento a 4°C durante entre 1 a 2 h para la acumulación de metafases mitóticas. Las raíces fueron entonces fijadas en 3:1 etanol:ácido acético glacial durante al menos 4 h.

3.3. Aislamiento y clonación de las secuencias empleadas en esta Memoria.-

Las distintas secuencias de ADN empleadas en esta Memoria han sido obtenidas a partir de dos procesos fundamentalmente: por digestión de ADN genómico con enzimas de restricción o mediante PCR. El aislamiento de secuencias utilizando cada uno de estos métodos presenta particularidades que deben ser tomadas aparte. Los protocolos de aislamiento y ligación de estas secuencias son por tanto los que siguen:

3.3.1. Aislamiento y ligación de la familia de ADN satélite RUSI, obtenida mediante digestión de ADN genómico con enzimas de restricción.-

3.3.1.1. Aislamiento del ADN mediante digestión con enzimas de restricción.-

El aislamiento de la familia de ADN satélite RUSI en las especies *R. scutatus* y *R. induratus*, se llevó a cabo mediante la digestión de ADN genómico de estas especies con una batería de endonucleasas de restricción. Posteriormente, las digestiones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, para identificar los distintos patrones de restricción originados.

Para algunas de las enzimas de restricción, es observable el típico patrón en escalera A propio de las secuencias de ADN satélite dispuestas en tándem (Horz y Zachau, 1977). Así, es observable la presencia de bandas discretas que migran en las electroforesis, de tal forma que las bandas más pesadas son múltiplos de las más ligeras. La intensidad de las bandas disminuye a medida que el tamaño aumenta. Estas bandas discretas están constituidas por miles de fragmentos del mismo tamaño que se generan por la presencia de la secuencia diana de la enzima de restricción en cuestión en las unidades de repetición de esa familia de ADN satélite. A esta unidad repetitiva se la denomina monómero. El resto de bandas, múltiplos en tamaño de estos monómeros, son denominadas dímeros, trímeros, tetrámeros... Estas unidades constituidas por varios monómeros se originan por la ausencia de la diana de restricción en la unidad de repetición. Concretamente, la enzima *Bgl I* da lugar al patrón de escalera tipo A más claro en las especies *R. scutatus* y *R. induratus* y fue la endonucleasa que utilizamos para la obtención de las distintas unidades multiméricas. También es posible detectar la presencia de patrones de escalera B (Horz y Zachau, 1977). En este caso, las unidades de repetición presentan sólo ocasionalmente dianas para una enzima de

restricción y el patrón observado es el contrario: la intensidad de las bandas disminuye con el tamaño de los fragmentos generados.

Para las digestiones de ADN genómico se procedió según el siguiente protocolo:

1. Por cada μg de ADN se utilizan 5 unidades de enzima de restricción en presencia del tampón recomendado por el fabricante (Roche o Amersham Biosciences). Las digestiones se llevaron a cabo mediante incubación a 37°C durante 16 h. La mezcla de digestión por muestra con tiene:

ADN genómico 10 μg
Tampón 10x 10 μl
Enzima de restricción 50 U
H₂O ultrapura hasta 100 μl

2. Tras el período de restricción, el ADN digerido se precipita con 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, centrifugando a 13,000 rpm durante 5 min a 4°C .
3. El precipitado que se origina, es lavado en frío con etanol al 70%, durante 5 min a 13,000 rpm.
4. El precipitado se deja secar al aire y se resuspende en 20 μl de H₂O_{dd}.
5. A este volumen de digestión se le añade tampón de carga (azul de bromofenol 0.25%, xileno de cianol 0.25%, sacarosa 40%) en proporción 1/6 y se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión NuSieve (FMC) al 3% de bromuro de etidio (0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en tampón TBE 0.5x (Tris base 0.45 M, ácido bórico 0.45 M, EDTA 0.01 M).

Una vez identificadas las bandas de ADN repetido en el gel bajo la luz ultravioleta, se procedió a su aislamiento escindiéndolas del gel con un bisturí. Siempre que el límite de detección de la técnica lo permitió se aislaron bandas pertenecientes a varias unidades monoméricas juntas, ya fueran dímeros o trímeros. La purificación del ADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial "GTF[®] PCR DNA and Gel Band Purification Kit", siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Amersham-Pharmacia-Biotech). El fundamento de este tipo de purificación, radica en el uso de un agente caotrópico, que, por un lado desnaturaliza las proteínas y disuelve la agarosa y, por otro, promueve la unión de la doble hebra de ADN a una matriz de fibra de vidrio. El protocolo completo es el que sigue a continuación:

1. Se escinde la banda correspondiente del gel de agarosa generada en la reacción de amplificación y se coloca en un tubo de 1.5 ml.

2. Se añaden 10 μ l de tampón de captura por cada 10 mg de peso de la banda de agarosa. Se mezcla vigorosamente y se incuba a 60°C durante 15 min para favorecer la fusión del material.
3. La mezcla disuelta se recoge en el fondo del tubo mediante un pulso. Posteriormente se transfiere a una columna GFX dispuesta sobre un tubo colector y se incuba a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar a 13,000 rpm durante 30 sg.
4. Desechar los restos de agarosa recogidos en el tubo colector y colocar la columna nuevamente sobre dicho tubo. Añadir 500 μ l de tampón de lavado y centrifugar nuevamente a 13,000 rpm durante 30 sg.
5. La columna, que porta el ADN purificado se transfiere a un tubo nuevo de 1.5 ml. Se añaden entre 15-50 μ l de H₂O_{dd} con el objeto de arrastrar el ADN desde la matriz. Incubar 1 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 2 min a 13,000 rpm para recuperar el ADN purificado.

3.3.1.2. Ligación de unidades multiméricas de ADN satélite obtenidas mediante digestión con enzimas de restricción-

Los ADNs satélite de *R. scutatus* y *R. induratus* obtenidos mediante la digestión con la enzima *Bcl I* fueron ligados al vector pUC19. Previamente, fue necesario digerir el vector con la misma enzima que generó los fragmentos de restricción para originar extremos cohesivos. El protocolo de este proceso de ligación es el que sigue:

1. Se digiere 1 μ g de plásmido pUC19 con la enzima de restricción adecuada, incubando durante 1 h a 37°C la siguiente mezcla de reacción:

pUC19 (0.25 μ g/ μ l) 4 μ l
Tampón 10x 2 μ l
Enzima de restricción 1 U
H₂O ultrapura hasta 20 μ l

2. A continuación, el ADN plasmídico digerido se purifica mediante la extracción con fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (1:1(24:1)), y se precipita con cloruro de litio 4 M en proporción 1/4 y 2 volúmenes de etanol absoluto.
3. El ADN plasmídico precipitado se lava con etanol al 70% y se resuspende en 20 μ l de H₂O_{dd}.
4. La reacción de ligación del fragmento de ADN satélite al vector pUC19 digerido se realiza respetando la proporción vector:inserto 1:4, en

presencia de 1 unidad de la ligasa T4 (Promega) en tampón de ligación, en un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla de ligación se incubó a 4°C durante 16 h.

5. Bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5- α se transforman según el protocolo descrito por la casa comercial (la que sea). De esta manera, el volumen de ligación completo se añade a 50 μ l de células competentes. Se somete entonces a la mezcla a un choque térmico mediante la incubación en hielo durante 30 min, a 37°C durante 20 sg y nuevamente en hielo durante otros 2 min.
6. Las bacterias transformadas se crecen en medio LB líquido, sin ampicilina, durante 1 h a 37°C.
7. Transcurrido este tiempo, las bacterias se siembran en placas de Petri con medio LB sólido a pH 7.0 (15 g de agar, 10 g peptona, 5 g extracto de levadura y 5 g de ClNa por litro de H₂O). El medio contenía asimismo, ampicilina (0.05 mg/ml), 40 μ l del sustrato cromogénico X-gal (USB) (0.02 g/ml dimetil formamida) y 4 μ l del inductor IPTG (Roche) (0.2 g/ml H₂O_{dd}). Incubar en una estufa a 37°C durante 16 h.
8. Las colonias recombinantes son doblemente seleccionadas. En primer lugar crecen en un medio en presencia de ampicilina gracias a la resistencia que le concede a ella un gen Amp^r portado por el vector. Una segunda selección implica el color de las colonias. Éstas pueden ser blancas o azules. El vector pUC19 porta el gen LacZ que metaboliza los sustratos X-gal e IPTG dando lugar a un precipitado de color azul. Precisamente la ligación de los insertos se produce a este nivel del vector, de tal forma que aquellos plásmidos recombinantes presentan genes LacZ inactivos con la consiguiente ausencia de precipitado azul. De esta manera, alguna de las colonias blancas se inocularon en 15 ml de medio líquido LB (extracto de levadura:cloruro sódico:peptona- 1:1:2) y se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche con agitación.
9. Algunos de estos clones se analizaron inmediatamente. El resto fueron mantenidos a -80°C en presencia de dimetil sulfóxido al 80% (Sigma).

La purificación del ADN plasmídico y la detección de plásmidos recombinantes se describe en el apartado 3.4.

3.3.2. Aislamiento y clonación de las secuencias de ADN satélite, ADN ribosómico y ADN cloroplastidial obtenidas por PCR.-

En esta Memoria se ha llevado a cabo un análisis de los espaciadores intergénicos de genes ribosómicos (ITS-1 e ITS-2), así como del intrón del gen cloroplastidial trnL (UAA) y del espaciador entre este gen y el gen trnF (GAA), mediante PCR.

Por otro lado, cuatro familias de ADN satélite presentes en el genoma de distintas especies del género *Rumex* también han sido analizadas. Estas familias son, la familia RAE180 (Ruiz Rejón, et al., 1994; Shibata, et al., 2000a), la familia RAE730 (Shibata et al., 2000b), la familia RAYSI (Shibata et al., 1999) y la familia RUSI (por primera vez descrita en esta Memoria).

La obtención sistemática de unidades repetitivas de cada una de estas familias, así como de los espaciadores ribosómicos y los marcadores cloroplastidiales mencionados, se llevó a cabo mediante la técnica de PCR.

A continuación se detallan los pasos seguidos durante el desarrollo del proceso.

3.3.2.1. Diseño de cebadores específicos.-

Para el caso de las secuencias ITS-1 e ITS-2 se utilizaron cebadores universales ITS1 e ITS4 descritos en la bibliografía (White et al., 1990) (ver **Tabla 3**). Una vez aisladas las primeras secuencias de *Rumex* y con el objeto de mejorar la eficiencia de la reacciones de PCR se procedió al diseño de cebadores específicos del género. Concretamente diseñamos los cebadores RUIITS-1F y RUIITS-1R, para la amplificación específica del ITS-1 de *Rumex*. Para ello utilizamos regiones conservadas de los gen 18S y 5.8S, donde los cebadores pudieran hibridar. De manera análoga se hizo con la región ITS-2, esta vez utilizando regiones conservadas del gen 5.8S y 26S. La pareja de cebadores específicos generada fue RUIITS-2F y RUIITS-2R. (ver **Tabla 3** y **Figura 2A**)

Nombre del Cebador	Secuencia
ADN ribosómico	
ITS-1 (Universal)	
ITS-4 (Universal)	
RUIITS-1F	5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAACC-3'
RUIITS-1R	5'-AGATATCCGTTGCCGAGAGT-3'
RUIITS-2F	5'-AGTCTTTGAACGCAAGTTGC-3'
RUIITS-2R	5'-CCTCCGCTTATTGATATGCT-3'
ADN cloroplastidial	
trnL-c (Universal)	
trnL-f (Universal)	
ADN satélite	
RAE180-A	5'-TCATCGAACTTCATTCAT-3'
RAE180-B	5'-TATAGTAATATCTCGATC-3'
RAE730-A	5'-CTCGGACCAATTATCTCAT-3'
RAE730-B	5'-CATTATTTGGGAGCCGAT-3'
RAYSI-A	5'-ATGTAAGCATTGGTCCCTAA-3'
RAYSI-D	5'-TCGAGTACTACACGATTGT-3'
RAYSI-S	5'-ACGTAGTCTTTTAGAGGATC-3'
RAYSI-J	5'-GAGAGTCAATAGAGTGGAAAG-3'

Tabla 3: Lista de cebadores empleados en esta Memoria

La secuencia de los cebadores usados para amplificar el intrón del gen *trnL*, así como el espaciador entre este gen y el *trnF*, *trnL-c* y *trnL-f*, fue obtenida a partir del trabajo de Taberlet y col. (1991) (ver **Tabla 3**). Estos cebadores están diseñados a partir de las regiones conservadas (exones) de los genes *trnL* y *trnF* (**Figura 2B**). Dichos cebadores mostraron una eficiencia bastante elevada para el material del género *Rumex*, ya fuera fresco o procedente de pliegos de herbario, por lo que no fue necesario el diseño adicional de cebadores específicos.

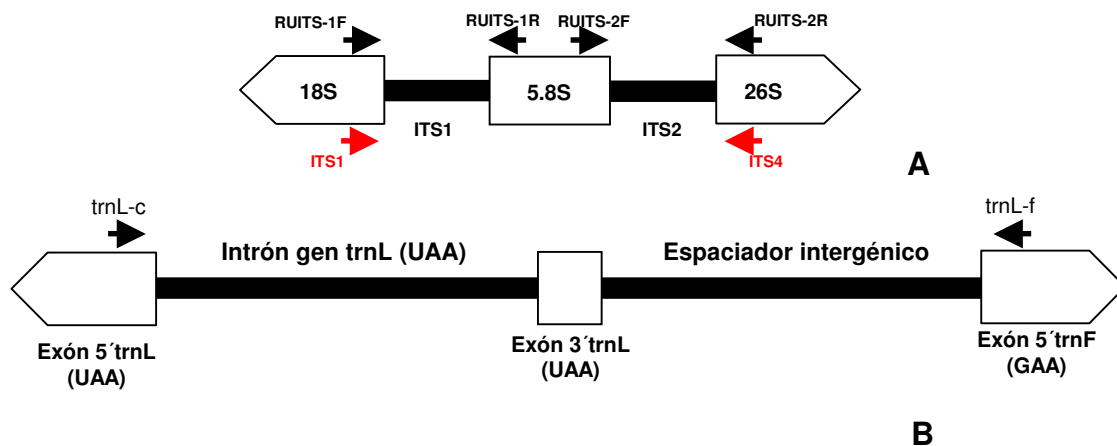


Figura 2: Representación esquemática de la zona de hibridación de los cebadores específicos, (A) de la unidad ribosómica 45S y (B) de la región cloroplastidial comprendida entre el exón del gen *trnL* (UAA) y el exón del gen *trnF* (GAA)

A partir de las secuencias obtenidas mediante digestión de ADN genómico con endonucleasas de restricción en el caso del ADN satélite RUS1 y de las secuencias depositadas en la base de datos de ADN del EMBL, para los otras tres familias, diseñamos cebadores específicos para las unidades de repetición de cada una de las cuatro familias de ADN satélite del género *Rumex*. En estos casos, y debido a que se trata de secuencias repetidas dispuestas en tándem, no es posible diseñar cebadores en los extremos de las secuencias monoméricas (esto daría lugar mayoritariamente a productos de pocos pb, que no incluirían una unidad de repetición completa) (ver **Figura 3**). Por ello, los cebadores adecuados para la amplificación de secuencias de ADN satélite se diseñan en una única zona interna conservada de la secuencia monomérica. En esta zona los cebadores hibridarán en disposición enfrentada, de tal manera que se dé lugar a la amplificación de secuencias mayores fundamentalmente monómeros y dímeros, a pesar de que frecuentemente se obtienen amplificadas de tamaño menor a la unidad de repetición (**Figura 3**).

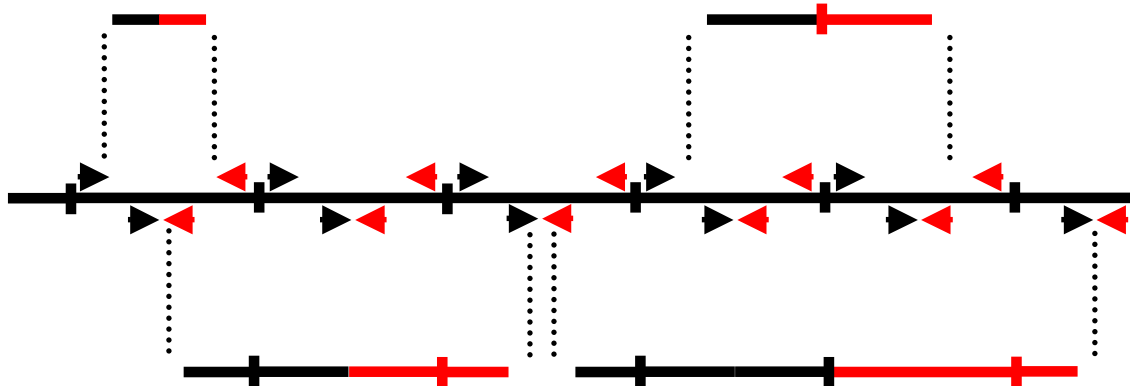


Figura 3: Representación esquemática del diseño de cebadores para la amplificación de unidades repetitivas de ADN satélite, (**arriba**) configuración incorrecta, (**abajo**) configuración correcta

3.3.2.2. Protocolos de PCR-

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ l, conteniendo, 100 ng de muestra, 10mM Tris-ClH, pH=8.3; 5mM KCl; 2mM MgCl; 0.2mM de cada dNTP (Roche); 0.2 μ M de cada uno de los cebadores y 1.25 unidades de Taq polimerasa (Biotools).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400), siguiendo el protocolo de trabajo que se indica en la tabla adjunta (**Tabla 3**).

Los resultados de dichas reacciones de amplificación fueron observados en geles horizontales de agarosa al 1.5% en 0,5 X TBE. Se llevó, entonces, a cabo el proceso de aislamiento y purificación de las bandas de ADN deseadas para su posterior clonación, tal como se describe en el apartado 3.4 de esta Memoria.

3.3.2.3. Ligación de unidades multiméricas de ADN satélite obtenidas mediante PCR-

Los amplificados obtenidos por PCR y purificados a partir de geles de agarosa fueron ligados al vector pGEM-Teasy por medio del kit comercial "pGEM[®]-Teasy Vector System II" (Promega) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Este plásmido está diseñado para la ligación de productos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De hecho, se trata de un plásmido lineal al que se le ha agregado una cola poli-T en ambos extremos de su secuencia 3' de ADN. De este modo, se consigue que el vector presente extremos compatibles con los que tienen los productos de PCR amplificados mediante una *Taq* polimerasa (que añade una cola poli-A). Asimismo, la eficiencia de ligación se encuentra mejorada, ya que se impide la

recircularización de los plásmidos no recombinantes. La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias ultracompetentes de la cepa JM109 de *Escherichia coli* (Promega) recomendada para este vector. El protocolo descrito por la casa comercial es el siguiente:

1. Calcular la cantidad óptima de producto de PCR para la reacción de ligación según la fórmula:

$$[ng \text{ vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)} / \text{tamaño vector (kb)}] \times \text{ratio inserto:vector} = ng \text{ inserto}$$

La reacción de ligación se lleva a cabo mezclando las cantidades calculadas de inserto, con 50 ng de vector y 3 unidades de ligasa T4 en tampón de ligación 2x considerando un volumen final de 10 µl. Esta mezcla de ligación se incubó durante toda la noche a 4°C.

2. Después de este período se procede a la transformación de las bacterias ultracompetentes. Esto se realizó añadiendo todo el volumen de la reacción de ligación a 50 µl de células JM109. Tras 20 min en hielo, se somete la mezcla a un choque térmico a 42°C durante 45 sg, para posteriormente incubar en hielo durante 2 min.
3. Las bacterias transformadas se crecen en medio de cultivo SOC estéril (2 g peptona, 0.5 g extracto de levadura, 1 ml ClNa 1M, 0.25 ml KCl en 97 ml de H₂O_{dd}. A esta mezcla se añade 1 ml de Mg²⁺ 2M- 20.33 g MgCl₂ x 6 H₂O, 24.65 g MgSO₄ x 7 H₂O- y 1 ml de glucosa 2M estéril por filtración, todo ello a un pH 7.0 y en un volumen final de 100 ml) durante 1 h y 30 min a 37°C con agitación.
4. Posteriormente el cultivo se siembra en medio LB sólido. Los clones son seleccionados siguiendo las directrices descritas para el caso de las ligaciones en el otro vector de clonación, pUC19, en virtud de las semejantes características de éste y el PGEM-Teasy.

3.4. Purificación de ADN plasmídico y detección de plásmidos recombinantes.-

La extracción del ADN plasmídico y su posterior purificación se realizó tanto para el vector pUC19 como para el PGEM-Teasy siguiendo el protocolo del kit comercial "Perfectprep[®] Plasmid Mini" (Eppendorf) de acuerdo con lo recomendado por el fabricante. Para ello, las bacterias se precipitaron mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 1 min y se resuspendieron después mediante agitación vigorosa en 100 µl de solución de resuspensión (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8). A continuación se añadieron otros 100 µl de solución de lisis (25 mM tris, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa, pH 8), mezclando por inversión. Finalmente, se añadieron 100 µl de solución de neutralización (0,2 mM NaOH, 1 % SDS) y se mezcló nuevamente por inversión. La mezcla se centrifuga a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfiere a una columna de purificación colocada sobre un tubo colector. A esta columna se

añaden 450 μ l de una matriz de polímero donde el ADN va a fijarse (DNA Binding Matrix Buffer- Eppendorf) y se centrifuga a 13,000 rpm durante 2 min. El ADN plasmídico purificado se eluye con 50-70 μ l H₂O_{dd} en un tubo de 1.5 ml nuevo.

La detección de los clones recombinantes se realizó mediante digestión de los mismos con la enzima de restricción que diera lugar a la liberación del inserto en cada caso. De esta manera se digiere 1 μ g de plásmido durante 2 h a 37°C. El resultado se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

La detección de clones recombinantes con insertos del tamaño deseado obtenidos a partir de la ligación de unidades multiméricas de las familias de ADN satélite de *Rumex*, así como de ADNs cloroplastidiales y ribosómicos, en el vector PGEM-Teasy, se llevó a cabo mediante digestión con enzimas de restricción de los plásmidos purificados. De esta manera, se procedió a la digestión de 1 μ g de cada plásmido con la enzima EcoRI, que libera el inserto clonado, durante 2 horas en un baño a 37°C. El resultado se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa, con presencia de bromuro de etidio. Asumimos que al estar los fragmentos obtenidos por amplificación con cebadores específicos, aquellos plásmidos que presentaban inserto eran recombinantes para los fragmentos de ADN correspondientes.

Dado que los clones recombinantes obtenidos mediante ligación en pUC19 de fragmentos generados mediante digestión con enzimas de restricción pueden tener insertos pertenecientes a las familias de ADN satélite que buscamos, así como otras secuencias de igual tamaño, fue necesario llevar a cabo un proceso de selección más fino. Para ello se utilizó la técnica de *dot-blot*. Concretamente, el ADN purificado de 50 colonias blancas se inmovilizó en una membrana de nylon. A continuación esta membrana se hibridó con ADN marcado obtenido a partir de la misma banda del gel que se empleó en la reacción de ligación tal como se describe a continuación:

1. Aproximadamente 50 ng de ADN plasmídico purificado se inmoviliza sobre una membrana de nylon (Hybond-N+- Amersham Biosciences). Para ello, el ADN se desnaturaliza en agua hirviendo durante 10 min, se enfría en hielo durante 5 min y se diluye con un volumen de 20xSSC (cloruro sódico 3 M, citrato sódico 0.3 M). Se deposita el volumen total de plásmido en la membrana y se deja secar a temperatura ambiente.
2. El ADN se fija a la membrana tratando con sosa 0.2 M durante 2 min. Transcurrido ese tiempo se lava con 5xSSC 1 min y se deja secar a temperatura ambiente. La membrana está preparada entonces para el proceso de hibridación.

El marcaje de las sondas y el revelado de la hibridación es el mismo que el utilizado en la técnica de *Southern-blot* descrito en el apartado 3.5 de este capítulo de Material y Métodos.

3.5. Estudio de la presencia en el género *Rumex* de las cuatro familias de ADN satélite analizadas en esta memoria mediante hibridación tipo Southern-blot y dot-blot.-

Con el objeto de comprobar la presencia de cada uno de las familias de ADN descritas para *Rumex acetosa*, en la totalidad de subgéneros del género *Rumex*, se llevaron a cabo experiencias de hibridación tipo Southern-blot y dot-blot.

Para las hibridaciones tipo Southern-blot, el ADN genómico total (2µg) digerido con distintas endonucleasas de restricción (*EcoRI*, *Hind III*, *Dra I*, *Apa I*, *Bsr SI*, *Bcl I*, *Hae III*, *Taq I*) de las distintas especies (considerando machos y hembra por separado en las especies dioicas), fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, en 0.5 x TBE, en presencia de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis tuvo lugar en geles de 20 cm de longitud a 1.5 voltios por cm durante entre 12 y 16 h. El ADN fraccionado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, siendo el gel fotografiado con la cámara digital "DC265 Zoom Digital Camera" de Kodak.

3.5.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon.-

La transferencia se realiza utilizando el equipo "VacuGene[®] XL Vacuum Blotting System" (Amersham Biosciences) según el siguiente protocolo:

1. El gel se dispone en el equipo de transferencia que se encuentra conectado a una bomba de vacío. Se procede a la incubación con las soluciones de depurinización (HCl 0.25 M), desnaturalización (CINa 1.5M, NaOH 0.5 M) y neutralización (Tris 1 M, CINa 1.5 M, pH=7.5), durante 15 min cada una de ellas.
2. A continuación se transfiere el ADN digerido incubando durante 1 h con 20xSSc (CINa 3 M y citrato sódico 0.3 M).
3. Tras la transferencia, el ADN se fija a la membrana mediante poniéndola en contacto con un papel Whatman saturado de una solución de fijación (NaOH 0.4 M) durante 2 min. Los restos de sosa se eliminan lavando varios minutos con 5xSSC.
4. La membrana se deja secar a temperatura ambiente y una vez seca está preparada para los procesos de hibridación y detección.

Cuando la cantidad de ADN de la que disponíamos no era la suficiente como para llevar a cabo hibridaciones tipo Southern-blot, recurrimos a la técnica de dot-blot. Para ello fijamos la cantidad de ADN genómico de la que disponíamos a la membrana de nylon tal y como acabamos de describir. El resto del proceso es común para ambos tipos de hibridaciones y se describe a continuación.

3.5.2. Hibridación tipo *Southern-blot*.

El estudio de la presencia de las cuatro familias de ADN satélite descritas para el género *Rumex* en el conjunto de especies del género *Rumex* se realizó por medio de experiencias de hibridación tipo *Southern-blot*. Para ello, se emplearon como sondas insertos procedentes de clones representativos de cada una de las cuatro familias de ADN satélite analizadas (RAE180-M31, RAE730-12-5, RAYSI-10, RAYSI-7 y RUSI-R117).

Para obtener una cantidad adecuada de insertos, estos plásmidos purificados fueron utilizados para reacciones de PCR con los cebadores universales T7/Sp6 y M13R/M13F, de los vectores pUC19 y PGEM-Teasy respectivamente. Dichos cebadores hibridan en regiones flanqueantes al sitio de ligación, de tal forma que se obtiene de manera sencilla la amplificación del inserto que nos interesa. Los productos de PCR fueron purificados (ver apartado 3.2 de esta Memoria) tras su observación en geles horizontales de agarosa al 1% y empleados como sondas.

Para el marcaje de las sondas, así como para la hibridación y la detección de la señal se empleó el kit "ECL Gene Detection System" (Amersham-Pharmacia-Biotech). Los pasos fundamentales del protocolo desarrollado se exponen a continuación:

- 1 Se prehibrida la membrana durante 1 hora aproximadamente a 42°C en el tampón de hibridación de la casa comercial (urea 6M, NaCl 0,5M y agente bloqueante al 5%).
- 2 Tras la prehibridación se añade la sonda previamente desnaturalizada y marcada con la enzima peroxidasa (10ng/ml de solución de hibridación). La incubación tiene lugar durante 12 horas aproximadamente a 42°C.
- 3 Después del período de hibridación, se procede al lavado de la membrana a la astringencia requerida en cada experimento. Para ello, se sigue la fórmula propuesta por Meinkoth y Wahl (1984), basada en las relaciones entre el porcentaje de identidad entre las hebras de ADN y la temperatura y concentración salinas empleadas, según la fórmula:

$$T = 81.5 + 16.6 \log M + 0.41(\% G+C) - 500/n - 0.61(\% \text{ formamida}) - 1.5(\% \text{ bases complementarias})$$

donde T es la temperatura de lavado, M es la concentración de iones Na^+ y n es la longitud de la cadena de ADN en pb.

- 4 De esta manera, la membrana se lava dos veces a 55°C durante 10 min. cada vez con una solución a la concentración iónica calculada (SSC y SDS). Otros dos lavados de 5 minutos se llevan a cabo a temperatura ambiente en 2xSSC.
- 5 Para la detección se utilizan las soluciones de detección facilitadas por la casa comercial, conteniendo peróxido de hidrógeno y luminol (Amersham Biosciences). Películas autorradiográficas (“Hyperfilm ECL”, Amersham) se exponen entonces durante 10 min. en oscuridad. Éstas se impresionan por la luminiscencia emitida por las sondas marcadas, lo que nos permite detectar los sitios en los que existe hibridación.
- 6 Para reutilizar las membranas es necesario eliminar los restos de sonda empleada; para ello se lava durante 3 h aproximadamente con SDS al 5%, precalentado a 100°C, para posteriormente lavarla durante 5 min. en 2xSSC y dejarla secar hasta su nueva utilización.

3.6. Secuenciación de los clones recombinantes positivos.-

Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método propuesto por Sanger et al. (1977), utilizando el kit comercial “ABI Prism[®] Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). Se utilizó para ello el secuenciador multicapilar ABI 3700 (Applied Biosystems). Las dos cadenas de los insertos ligados en plásmidos recombinantes fueron secuenciadas utilizando el secuenciador automático multicapilar ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, según las instrucciones del fabricante. Usamos parejas de cebadores universales cuyas secuencias diana se encuentran presentes en los vectores de clonación empleados, a saber: *T7-Sp6* y *M13F-M13R*, para el caso de plásmidos pGEM T-easy (Promega) y pUC-18 (Roche), respectivamente.

Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 20 μl a partir de 400-600 ng de ADN, 3.2 pmoles de cebador, 2 μl de tampón 5x y 2 μl del reactivo BDT (Big Dye[®] Terminator), que contiene los dNTPs marcados y la polimerasa de ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 2700 de Applied Biosystems siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización de 3 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos constituidos por: etapa de desnaturalización (95°C durante 10 sg), etapa de hibridación de los cebadores (50°C durante 4 sg) y etapa de elongación de las cadenas (60°C durante 4 minutos).

Una vez completadas las reacciones de secuenciación, éstas se precipitaron tras ser incubadas durante 15 min en una mezcla de acetato

sódico 3M y etanol al 95% (62.5 µl de etanol 95%, 3 µl de acetato sódico y 14.5 µl de H₂O_{dd} por muestra) mediante centrifugación en frío (4°C) durante 20 min a 14,000 rpm. Los precipitados se lavaron con etanol al 70% y se dejaron secar a 37°C brevemente. Los productos secuenciados se resuspendieron en 20 µl de formamida.

3.7. Análisis evolutivo de las secuencias.-

Las secuencias procedentes de la secuenciación de las dos hebras de ADN fueron ensambladas utilizando el programa SeqMan, incluido en el paquete informático DNASTAR (LASERGEN) o bien directamente interpretadas utilizando el programa Chromas v. 1.45 (Connor McCarthy, 1996-1998). Se cotejaron las secuencias obtenidas con las existentes en la base de datos de ADN de EMBL, EBI y GenBank, mediante el programa interactivo en red BLAST (Altschul et al., 1997) del NCBI.

Las secuencias se alinearon con la ayuda del software ClustalX (Thompson et al., 1997) que utiliza el algoritmo Clustal (Higgins et al., 1988, 1994). Estos alineamientos fueron en todo caso revisados manualmente. El programa UltraEdit v.4.10 (IDM Comp) en su opción *column mode* fue empleado para el tratamiento de las secuencias en formato de texto.

Todas las secuencias empleadas en esta Memoria han sido depositadas en la base de datos de ADN del EMBL, bajo un número de acceso. La opción *EMBL submission* del programa DNAsp vs 4.0 (Rozas y Rozas, 1997) dispone las secuencias en el formato adecuado directamente desde los alineamientos y además nos ofrece el tamaño total de cada secuencia sin tener en cuenta los *gaps* introducidos. El programa en red Webin, herramienta informática ofertada por el EBI, para enviar secuencias a la base de datos del EMBL, nos permite completar el proceso.

Utilizando el programa MegaAlign (DNASTAR, LASERGEN) obtuvimos las secuencias consenso de cada uno de los alineamientos. Esta secuencia consenso fue utilizada para la búsqueda de repeticiones internas (Tandem Repeats Zinder- Benson, 1999), de marcos abiertos de lectura y distintos motivos de interés (EditSeq- DNASTAR, LASERGEN) y para el análisis de frecuencias nucleotídicas y de dianas de restricción (GENEPRO v. 6.1- Riverside Scientific Ent., 1993). El cálculo de la riqueza en AT se llevó a cabo con el programa DNAsp vs 4.0 (Rozas y Rozas, 1997).

3.7.1. Análisis de las secuencias de ADN satélite.-

Análisis de la variabilidad intraespecífica.-

Para medir el porcentaje de diferencias entre las secuencias monoméricas clonadas pertenecientes a una misma especie utilizamos el parámetro (ρ). Este parámetro se define como la relación entre posiciones

nucleotídicas que son diferentes entre dos secuencias que se comparan y el total de nucleótidos de que se componen dichas secuencias, según la fórmula:

$$\rho = n_d/n$$

donde n_d es el número de diferencias nucleotídicas y n es el número total de nucleótidos comparados

La variabilidad global para cada familia de ADN satélite se estimó con el cálculo de los parámetros P (polimorfismo) y π (diversidad nucleotídica) (Nei, 1987).

El polimorfismo describe el número de sitios o posiciones nucleotídicas variables con respecto al total de nucleótidos de una secuencia dada para una población o taxon determinados.

La diversidad nucleotídica, por otro lado, mide el número medio de las diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. Se calcula según la fórmula:

$$\pi = \sum \pi_{ij} / n_c$$

donde π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre las secuencias i -ésima y j -ésima y n_c el número total de comparaciones realizadas: $n(n-1)/2$

El cálculo del porcentaje de divergencia, polimorfismo y de la diversidad nucleotídica, se llevó a cabo utilizando los softwares Mega 2.1 (Kumar et al., 2001) y DNAsp (DNA Sequence Polymorphism; Rozas y Rozas, 1997).

Análisis de la divergencia interespecífica.-

La divergencia entre secuencias monoméricas de ADN satélite pertenecientes a distintas especies se ha calculado mediante el uso del programa informático Mega v. 2.1 (Kumar et al., 2001).

Las diferencias entre dos especies se calcularían según la fórmula:

$$d_A = d_{XY} - (d_X + d_Y / 2)$$

donde d_X y d_Y es la medida de las diferencias de todas las comparaciones de dos en dos secuencias de una especie x e y respectivamente

$$d_X = n_X / n_X - 1 \sum_{ij} x_i x_j \pi$$

$$d_Y = n_Y / n_Y - 1 \sum_{ij} x_i x_j \pi$$

donde n_x y n_y es el número de secuencias de cada especie

d_{XY} es la medida de las diferencias entre las secuencias de la especie x y de la especie y realizadas de dos en dos

$$d_{XY} = \sum_{ij} x_i x_j \pi$$

Sin embargo, hemos detectado en algunos casos en nuestros análisis de la evolución de algunas familias de ADN satélite, la presencia de múltiples polimorfismos compartidos cuando se hacen comparaciones de especies dos a dos. Nosotros asumimos que estos polimorfismos compartidos son ancestrales y, por tanto, anteriores a la divergencia de las dos especies en concreto. El método de cálculo de distancias anteriormente propuesto no distingue entre polimorfismos ancestrales o modernos, por lo que el cálculo de las distancias estaría sobreestimado. En esta Memoria hemos seguido una aproximación alternativa para evitar esta sobreestimación. Para ello, se localizan los polimorfismos compartidos y se descartan para el cálculo de las distancias. Una vez hecho esto, se calcula el número total de diferencias existentes en el grupo de secuencias dado, y dicho valor se refiere al número total de nucleótidos que tenía originalmente el alineamiento, considerando también las posiciones anteriormente descartadas. Entonces, se calcula un valor de distancia aplicando la corrección de Jukes-Cantor, según la fórmula:

$$d = -3/4 \ln(1 - 4/3x)$$

siendo x, el valor de distancia calculado por nosotros

Dado que el ADN satélite está formado por secuencias cortas, variables y con tasas evolutivas distintas según la familia de la que se trate, consideramos adecuado un método basado en distancias evolutivas entre secuencias para medir su divergencia. Asimismo, utilizamos el método de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), que asume una única tasa de mutación para todos los nucleótidos y además supone que las mutaciones suceden al azar.

La tasa evolutiva de las secuencias (λ) se calcula según la fórmula:

$$\lambda = d/2T$$

donde d se ha calculado según hemos descrito, tras descartar los polimorfismos compartidos, y donde T es el tiempo que hace que aparecieron las especies que estamos comparando, en millones de años

Nosotros, con ayuda de D. José Luis Aznarte y Dña. Cristina Rubio, ambos pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial (DECSAI) de la Universidad de Granada, estamos desarrollando un programa informático llamado satDNA para el análisis de secuencias de ADN satélite. Este programa nos permite en primer lugar detectar y descartar para el análisis los sitios que son polimorfismos compartidos. El fichero de salida obtenido es empleado para realizar los distintos cálculos que se han detallado en este apartado.

Estudio de la homogeneización y fijación de las sustituciones nucleotídicas: análisis de los estados de transición en una familia de ADN satélite.-

Como ha quedado reflejado en el capítulo de Introducción (ver apartado 1.3.3, Evolución del ADN repetido), las secuencias de ADN repetido, y por tanto las secuencias de ADN satélite, evolucionan concertadamente, así que la tendencia evolutiva de éstas se caracteriza por una alta tasa de homogeneización intraespecífica. Es por ello, que la dinámica que esperamos observar sea, que una vez que se produce la aparición de una sustitución por mutación en una posición dada, las secuencias de esa especie para esa posición concreta se homogenizan progresivamente en la dirección del cambio. Cuando la homogeneización es total, la especie tiene un nucleótido distinto en esa posición, que vuelve a ser una posición fijada. Podemos hablar, entonces, de ciclos de sustitución, homogeneización, fijación, sustitución, ... Esto es un proceso evolutivo que puede llevar un tiempo variable, por lo que en un estudio como el que en esta Memoria realizamos no sólo se van a detectar los dos extremos del proceso, es decir, posiciones monomórficas o posiciones fijadas, sino que también es posible caracterizar todos sus estadios intermedios. Strachan y col. (1985) propusieron un método para cuantificar cada uno de estos estadios intermedios. Así, describieron 6 estadios distintos, que ellos llaman estados de transición (**Figura 4**), así como otras posiciones catalogadas como sitios no-Strachan. Nosotros hemos detectado y analizado estas posiciones utilizando otra de las herramientas incluidas en el programa satDNA. Además, este programa detecta la presencia de otras posiciones, como polimorfismos compartidos, no compartidos y un sitio perdido.

El programa satDNA procesa alineamientos de secuencias en formato Mega (Kumar et al., 2001). El programa hace comparaciones de secuencias de distinta especies dos a dos. De esta manera, nos da un archivo de salida en formato html en el que se nos muestra el alineamiento con los distintos tipos de posiciones señaladas según un código de colores, así como una tabla resumen con el total de las posiciones detectadas (**Figura 5**). Concretamente satDNA puede detectar: estados de transición del I al VI, polimorfismos compartidos y no compartidos, y sitios perdidos.

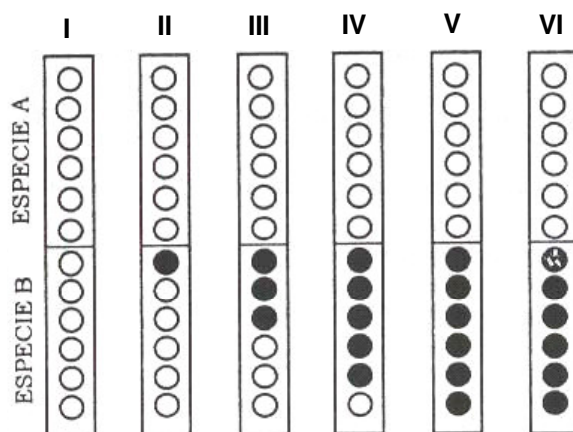


Figura 4: Representación esquemática de los estados de transición hacia la homogeneización de un ADN satélite según el modelo propuesto por Strachan (Strachan et al, 1985) (modificado de Pons, 2001)

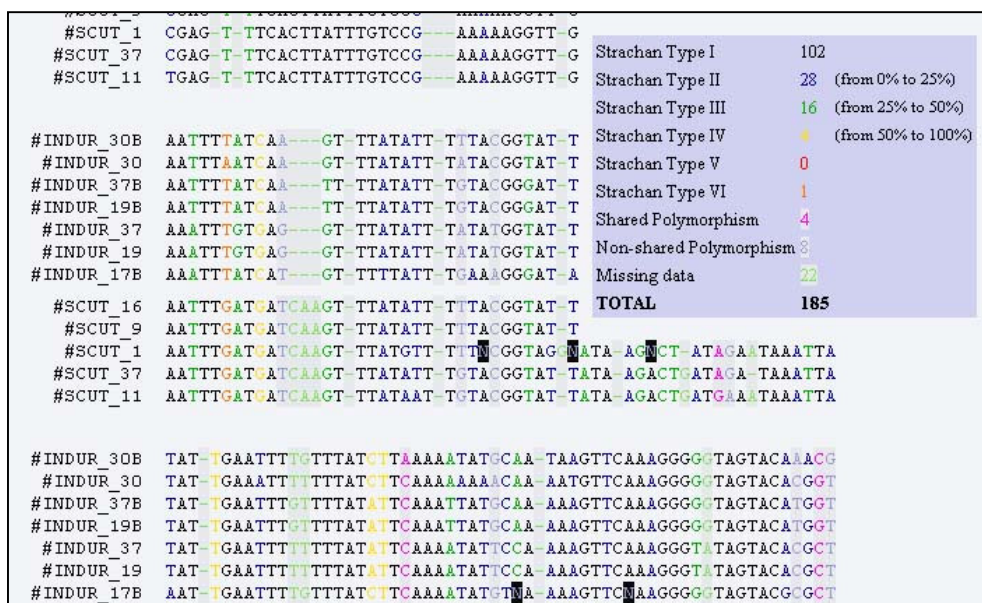


Figura 5: Archivo de salida del programa satDNA, en el que se muestra el alineamiento con las distintas posiciones indicadas según un código de colores y una tabla resumen de los resultados

El estado de transición I se caracteriza por la completa homogeneización para una posición concreta en todas las secuencias estudiadas de los dos táxones. Representa la ausencia de mutación (o su propagación) en la secuencia ancestral, que se supone es aún compartida por ambas especies. El estado de transición II representa mutaciones raras (o bajos niveles de propagación) que se traduce en la aparición de unas pocas secuencias en la población de uno de los táxones con esa nueva mutación para una posición dada, mientras que en el otro taxon no aparece. Este último mantiene la secuencia ancestral. El estado de transición III define aquellos casos en los que la nueva mutación está aproximadamente en igual frecuencia que el nucleótido

ancestral, para uno de los táxones, mientras que el otro tiene fijada una de las opciones. El estado de transición IV refleja la situación en la que una mutación, inexistente en uno de los táxones, ha reemplazado la posición nucleotídica ancestral casi por completo. Se interpreta que la secuencia ancestral es la homogeneizada en una de las especies y que está, a su vez, en minoría en la otra. Los estados V suponen posiciones que están internamente homogeneizadas independientemente para cada taxon y son sitios diagnóstico. El resto de mutaciones que suceden a partir de este estado son consideradas como estados de transición VI (ver **Figura 4**).

Los polimorfismos compartidos y no compartidos, son mutaciones para una posición dada, comunes o no para las dos especies analizadas, respectivamente. Siempre que exista la presencia de un *gap* en el alineamiento, esa posición determinada es excluida del análisis y se considera como un sitio perdido.

3.7.2. Análisis filogenéticos.-

3.7.2.1. Análisis filogenéticos mediante el uso de secuencias de ADN satélite.-

Las secuencias de ADN satélite se han comparado con fines filogenéticos mediante el método de inferencia de neighbor-joining (NJ) (Saito y Nei, 1987), basado en matrices de distancias. Las matrices de distancias utilizadas como base para el análisis filogenético fueron calculadas siguiendo el modelo propuesto por Jukes-Cantor (JC) (Jukes y Cantor, 1969). Los huecos (*gaps*) fueron excluidos del análisis usando la opción *Pairwise deletion*, que excluye las zonas de *gaps* en las comparaciones de cada par de secuencias. Como test filogenético se utilizó el método de remuestreo con reemplazamiento, *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

3.7.2.2. Análisis filogenéticos mediante el uso de secuencias de ADN ribosómico y cloroplastidial.-

Los análisis filogenéticos de las secuencias de ADN ribosómico y cloroplastidial analizadas en esta Memoria (ver apartado 3.3.2) se realizaron usando tres criterios de optimización: neighbor-joining (NJ), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML). Mientras que los análisis de MP y ML fueron realizados utilizando el programa PAUP* 4.0b10 para Windows (Swofford, 2002), los análisis NJ lo fueron con el programa Mega v. 2.1 (Kumar et al., 2001). Cuando los árboles filogenéticos fueron obtenidos con PAUP, fueron visualizados con el programa Treeview (Page, 1996). Los análisis se llevaron a cabo en primer lugar considerando los marcadores ribosómicos y cloroplastidiales por separado y después con la matriz combinada de ambos. Para explorar la congruencia entre las matrices de datos se llevó a cabo el test basado en el índice de congruencia (*partition homogeneity test* *ILD*- Farris et

al., 1995), utilizando el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Se efectuaron 1,000 particiones aleatorias para cada conjunto de datos y las correspondientes búsquedas heurísticas con incorporación de táxones al azar, el *tree-bisection-reconnection* (TBR) como algoritmo de reorganización y un máximo de 1.000 árboles retenidos por búsqueda.

En los análisis con el criterio de parsimonia, debido al tamaño de las matrices de datos, se emplearon búsquedas heurísticas bajo el criterio de parsimonia de Fitch (estados de los caracteres desordenados y los cambios entre dichos estados igualmente pesados). Los *gaps* se consideraron como datos perdidos. Las matrices de datos se sometieron a 100 réplicas de adición de secuencias al azar usando TBR como algoritmo de reorganización. En cada paso sólo se permitió guardar 10 árboles para minimizar el tiempo que el algoritmo emplea para buscar árboles en diferentes islas. El árbol de partida se obtuvo mediante *stepwise addition*. Los caracteres fueron optimizados mediante *accelerated transformation* (ACCTRAN). Se colapsaron las ramas con longitud máxima cero. Se salvaron todos los árboles de mínima puntuación (opción *MulTrees* activada). Los polimorfismos se trataron como tales y se utilizó la longitud mínima de cada carácter (número mínimo posible de cambios) para calcular el valor de sus índices de consistencia reescalados (*rc*). Los árboles resultantes se resumieron en topologías de consenso estricto.

En algún caso, cuando los valores de CI y RI fueron bajos, con el fin de minimizar los efectos de la homoplasia, tras los análisis con el criterio de Fitch se aplicó el pesaje por aproximaciones sucesivas (Farris, 1969, 1989) para reforzar la señal filogenética contenida en los datos. Los pesos se asignaron según el valor máximo de consistencia reescalada en los árboles obtenidos tras el análisis con el criterio de parsimonia de Fitch. Se realizaron sucesivas rondas de pesaje y búsqueda, partiendo siempre de los árboles obtenidos en las búsquedas previas, hasta que se obtuvieron longitudes, topologías e índices de consistencia (CI- Kluge y Farris, 1969) y retención (RI- Swofford, 1993) idénticos en dos rondas sucesivas.

Finalmente, se realizaron 1,000 procesos de remuestreos (análisis *bootstrap*, BS- Felsenstein, 1985) con 10 búsquedas heurísticas en cada remuestreo para obtener índices de apoyo para los clados. Estos procesos de remuestreo se llevaron a cabo tanto bajo el criterio de Fitch, como utilizando el conjunto de pesos finales de los análisis con pesaje sucesivo. Durante todos los análisis, el número máximo de árboles guardados en memoria estuvo limitado a 10,000. Los estadísticos descriptivos que reflejan la cantidad de señal filogenética en los análisis con parsimonia fueron el índice de consistencia, el índice de retención y el índice de homoplasia (HI- Swofford, 1993). Adicionalmente, la existencia de señal filogenética contenida en los datos se comprobó mediante el estadístico *g1* (Hillis y Huelsenbeck, 1992) tal y como lo implementa el programa PAUP* 4.0b10 sobre 100.000 árboles aleatorios, excluyendo los caracteres constantes.

Para la selección del modelo de sustitución de nuestras secuencias para los análisis de ML y NJ, las secuencias se analizaron utilizando el programa Modeltest 3.06 (Posada y Candall, 1998) el cual realiza un test de

verosimilitud jerarquizado (*hierarchical test of likelihood- hLTR*) para encontrar entre 56 modelos evolutivos diferentes el que más se ajusta a nuestro conjunto de datos. Bajo este criterio, con el programa PAUP se realizaron búsquedas heurísticas del árbol máximo verosímil. Igualmente, según el modelo evolutivo apropiado obtenido utilizando el programa MEGA, se buscaron árboles filogenéticos bajo el método de NJ.

3.8. Técnicas citogenéticas.-

A continuación se detallan los protocolos de laboratorio usados para las distintas técnicas citogenéticas empleadas en esta Memoria.

3.8.1. Técnicas de campo claro.-

Para el análisis del cariotipo de las distintas especies del género *Rumex*, así como la observación del comportamiento meiótico de sus cromosomas, utilizamos técnicas de tinción clásicas. Para ello, los meristemos radiculares previamente fijados se trataron en una solución de HCl 1 N a 60°C durante 5 min. Posteriormente se tiñeron con una solución de orceína acética al 2% durante 2 h. Tras este periodo, los meristemos se montaron en presencia de ácido acético al 75% y se observaron al microscopio óptico. Las yemas florales, también fijadas con anterioridad (ver apartado 3.2, Preparación del material, de esta Memoria), se tiñeron usando una solución del colorante carmín al 2% en ácido acético. Se seleccionaron aquéllas que presentaban un estado de maduración adecuado y se montaron para su observación al microscopio óptico.

3.8.2. Técnica de *spreading* para la observación de los complejos sinaptonémicos.-

Una vez establecido el tamaño aproximado de las anteras que potencialmente podían contener células madre de polen en profase I de meiosis (ver apartado anterior) se procedió a tratar flores masculinas sin fijar, recién recolectadas, según lo indicado por Cuñado y Santos (1997) con pequeñas modificaciones:

1. Las anteras seleccionadas se colocan en un portaobjetos excavado en contacto con 50 µl de solución enzimática (citohelicasa (Sigma) 0.4%, 1% de PVP, 1.5% sacarosa) durante 6 min.
2. Posteriormente, las anteras se maceran en medio de maceración (0.5% de CNa, EDTA 0.01 M, 6 mM de tampón fosfato sódico, a pH=7.5).
3. Una vez hecho esto, se preparan portaobjetos con una gota de medio de *swelling* cada uno (0.03% de Tritón-X (poner casa) en 0.01 M EDTA, 6 mM de tampón fosfato sódico) a los que se transfiere una gota de las

anteras maceradas. Los meiocitos se dejan entonces extender durante 5 min. Estos portaobjetos han sido montados con una rejilla para posteriormente, y una vez seleccionadas las células, poder hacer el montaje para la observación al microscopio electrónico.

4. Añadir unas cuantas gotas de medio de fijación (4% de paraformaldehído y 1.7% de sacarosa en agua destilada, ajustar a pH=8.9 con tampón borato). Las preparaciones se colocan en una placa a 30°C durante 12 h. Posteriormente, se lavan y se dejan secar al aire.
5. Teñir con unas cuantas gotas de nitrato de plata al 30%, cubrir con una gasa de nylon e incubar a 30-40°C hasta que las preparaciones adquieran un color amarillo pálido. En ese momento lavar y dejar secar. Las preparaciones se conservan a 4°C hasta su uso.
6. Las preparaciones se inspeccionan a microscopio óptico, con el objeto de localizar los complejos sinaptonémicos que a simple vista aparecen enteros. Estas células se marcan para posteriormente levantar las membranas y montarlas para su visualización en el microscopio electrónico.

El montaje y la visualización del complejo sinaptonémico utilizando microscopía electrónica de transmisión se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Complutense de Madrid.

3.8.3. Técnicas de fluorescencia.-

3.8.3.1. Obtención de las preparaciones.-

Para la obtención de preparaciones que posteriormente iban a ser utilizadas en técnicas de fluorescencia, los meristemos apicales y las yemas florales se pasaron brevemente a tampón citrato (citrato sódico y ácido cítrico al 0.01M). Tras este lavado se pasaron a una solución enzimática con pectoliasa al 1% (a partir de una solución concentrada a 2.84 U/mg) y celulasa al 0.75% (del stock 8.4 U/mg). Se lavaron nuevamente en tampón citrato y tras 15-20 min en ácido acético al 45%, fueron procesadas, también sobre una gota de ácido acético. El material fue fijado al portaobjetos en presencia de nitrógeno líquido y conservado en frío hasta el momento de su utilización.

3.8.3.2. Localización de secuencias de ADN mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).-

Para el proceso de hibridación *in situ* fluorescente se ha seguido el protocolo propuesto por Schwarzacher y Heslop-Harrison (2000), con

pequeñas modificaciones. El protocolo completo del proceso, se describe a continuación.

Marcaje de las sondas.-

Las sondas fueron marcadas con dos compuestos distintos que permitieran su uso en hibridaciones dobles. Para ello utilizamos los kits comerciales “BioPrime[®] Labeling Protocol” (para sondas marcadas con biotina) y “Random Primers DNA labeling System” (para las marcadas con digoxigenina) (Invitrogen). Estos kits utilizan el método de marcaje denominado Random Primers. Este método está basado en la utilización de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores de la reacción de amplificación catalizada por la enzima Klenow. Como sustrato se utiliza una mezcla de DNTPs marcados en determinada proporción. Estos nucleótidos marcados se irán incorporando a las nuevas cadenas de ADN sintetizadas que serán utilizadas como sonda en nuestros experimentos de hibridación.

El marcaje con biotina consta de los siguiente pasos:

1. De 200 a 400 ng de ADN se colocan en un tubo de 1.5 ml en un volumen final de 20 μ l de Random Primers Solution (Invitrogen), que contiene la mezcla de hexanucleótidos.
2. Se desnaturaliza en agua hirviendo durante 5 min e inmediatamente se coloca la mezcla en hielo.
3. Añadir 5 μ l de la mezcla de DNTPs marcados y completar con H₂O_{dd}, hasta un volumen final de 49 μ l.
4. Añadir 1 μ l de la enzima klenow. Incubar durante 12 h a 37°C.

El marcaje con digoxigenina, por su lado, se efectuó tal como sigue a continuación:

1. Entre 200 y 400 ng de ADN se disuelven en 20 μ l de H₂O_{dd}. Se desnaturaliza en agua hirviendo durante 5 min e inmediatamente se coloca la mezcla en hielo.
2. Se añade una mezcla de DNTPs: 2 μ l dATP, 2 μ l dGTP, 2 μ l dCTP, 1.5 μ l dTTP, 0.5 μ l dUTP marcado con digoxigenina (Roche).
3. Mezclar bien, añadir 1 μ l de enzima klenow e incubar durante 12 h a 25°C.

Tras este período de incubación las sondas se precipitan de la siguiente manera:

1. Se añaden 5 μ l de Stop Buffer (Invitrogen), para parar la reacción.
2. Añadir 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Incubar a -70°C durante 15 min y centrifugar también en frío a 13,000 rpm durante 10 min.
3. Lavar con etanol al 70%, y una vez seco el precipitado, disolverlo en un volumen adecuado de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$.
4. Las sondas se conservan a -4°C hasta el momento de su utilización.

Comprobación del marcaje de las sondas.-

Antes de utilizar las sondas es conveniente comprobar si el proceso de marcaje se ha efectuado con normalidad. Para ello, se utiliza una técnica parecida a la descrita para los *dot* y *Southern blots*. Concretamente:

1. Se corta un trozo de membrana de nylon y se coloca en tampón I (100 mM de Tris-HCl, pH=7.5, 15 mM de ClNa) durante unos minutos.
2. Se deposita una pequeña cantidad de sonda (0.5-1 μ l) en la membrana y se deja secar.
3. Se pone nuevamente la membrana en contacto con el tampón I durante 1 min. para posteriormente incubar en tampón II (0.5% de reactivo de bloqueo- Roche- en tampón I) durante 30 min. con agitación constante.
4. Descartar el tampón II e incubar con una solución de anticuerpos, anti-biotina y anti-digoxigenina, que llevan conjugada una fosfatasa alcalina (diluciones 1:1000 hasta una concentración final de 0.75 U/ml), durante 30 min a 37°C con agitación.
5. Lavar la membrana en tampón I durante 15 min.
6. Transferir la membrana al tampón III (100 mM de Tris-HCl a pH=9.5, 100 mM de ClNa, 50 mM de cloruro de magnesio) durante 2 min.
7. Transferir al tampón de detección durante 5-10 min. en oscuridad. El tampón de detección contiene los sustratos para la fosfatasa alcalina, concretamente NBT y BCIP (Life Technologies), de tal forma que donde se produzca reacción observaremos un precipitado de color azul.
8. Lavar la membrana con agua destilada y dejar secar.

Pretratamientos.-

Antes de comenzar el proceso de hibridación *in situ*, las preparaciones tienen que ser pretratadas de la siguiente manera:

1. En primer lugar se trata las preparaciones con una solución de ARNasa (100 µg/ml) en 2xSSC, durante 1 h a 37°C. Tras ese periodo, los restos de ARNasa se retiran lavando con 2xSSC.
2. A continuación se lleva a cabo el tratamiento con pepsina, 5 µg/ml en 0.01 M HCl durante 10 min a temperatura ambiente. Este tratamiento está indicado sólo para aquellas preparaciones en las que la solución enzimática no haya conseguido retirar todos los restos citoplasmáticos. Los restos de pepsina se lavan con agua destilada y 2xSSC sucesivamente.
3. A continuación se incuba con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Este tratamiento ha demostrado ser adecuado para mantener la estructura cromosómica, y es especialmente indicado en cromosomas vegetales. Se lava nuevamente con 2xSSC.
4. A continuación las preparaciones se deshidratan en una serie de disoluciones de etanol, al 70%, 85% y 100%. Tras lo cual, se dejan secar y quedan preparadas para la hibridación.

Preparación de la mezcla de hibridación, desnaturalización e hibridación *in situ*.-

1. Aproximadamente 25-200 ng de ADN marcado se ponen en contacto con formamida al 50%, 2xSSC, 10% de dextrán sulfato, 1 µg de esperma de salmón sonicado, 10% SDS, en un volumen final de 30 µl.
2. Se desnaturaliza bien la mezcla de hibridación incubando en un baño a 70°C durante 10 min y se coloca inmediatamente en hielo durante 5 a 15 min.
3. Añadir el volumen de reacción a la preparación y cubrir con un cubreobjetos. Desnaturalizar mediante el uso de un termociclador modificado a 70-80°C durante 5 a 10 min. Enfriar progresivamente hasta 37°C e incubar a esa temperatura con el modo vibración durante 16 a 20 h.

Lavados de astringencia.-

Después del periodo de hibridación, se procede con los lavados de astringencia.

1. Los cubreobjetos se extraen por reflotación en 2xSSC a 35-40°C. Lavar adicionalmente con 2xSSC a 42°C.
2. Lavar en el tampón de astringencia (20% de formamida y 0.01xSSC) dos veces durante 5 min cada una a una temperatura entre los 40 y 45°C.
3. Tras estos pasos se lavan las preparaciones en 0.01xSSC a 42°C y se dejan enfriar a temperatura ambiente en 2xSSC.
4. A continuación se transfieren las preparaciones a la solución de bloqueo (0.2% Tween 20- Sigma- en 4xSSC) durante 5 min y se incuban durante 20 min a temperatura ambiente en solución de bloqueo (5% suero bovino en tampón de detección).
5. A continuación se incuba con la solución de anticuerpos (anti-digoxigenina-FITC- y Alexa estreptavidina) durante 1 h a 37°C. Tras este periodo se lava con solución de detección.
6. Las preparaciones se contratiñen con 4'-6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) (0.4 µg/ml) o yoduro de propidio (PI) (1 µg/ml) durante 10-30 min en oscuridad.
7. Las preparaciones se enjuagan entonces en solución de detección y se montan el medio de montaje Vecta Shield Mounting Medium (Vector Laboratories).
8. Usualmente es necesario guardar un mínimo de 24-48 h las preparaciones en frío y oscuridad para su correcta visualización.

3.8.4. Visualización de las preparaciones y captura de las imágenes.-

Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio mixto (óptico-fluorescencia) Zeiss (West Germany). Las imágenes se capturaron con la cámara RT_{KE} (Diagnostic Instruments inc.), utilizando el modo de *campo claro* o de *fluorescencia* según el tipo de tinción empleado en cada caso. Las imágenes fueron montadas utilizando el software Photoshop 7.0.

4.- RESULTADOS

4.1.- Filogenia Molecular del género *Rumex*.-

En esta Memoria hemos analizado un total de 31 especies del género *Rumex* (ver **Tabla 2**). Utilizando cebadores específicos hemos amplificado mediante PCR las regiones de espaciadores ribosómicos ITS y las secuencias del intrón del gen cloroplastidial *trnL* y del espaciador entre los genes *trnL* y *trnF*, con fines filogenéticos tal y como se describe a continuación.

4.1.1. Análisis de las secuencias de espaciadores ribosómicos (ITS) en el género *Rumex* L.-

Utilizando cebadores específicos para el género *Rumex* (ver apartado 3.3.2.1 del capítulo de Material y Métodos), hemos aislado por PCR y secuenciado posteriormente los espaciadores intergénicos de los genes ribosómicos, ITS1 e ITS2, en las 31 especies analizadas. En todos los casos varios clones fueron secuenciados por especie para confirmar que la secuencia no presenta variación intraespecífica significativa. La matriz de secuencias consta de 468 caracteres, de los cuales 207 son informativos para análisis de parsimonia. El alineamiento requirió distintos *gaps* de entre 11 y 64 pb. De hecho, es significativa la presencia de deleciones-inserciones diagnósticas en el ITS1 que son filogenéticamente informativas como se discutirá más adelante (ver **Figura 6**). Así, el tamaño completo de las dos regiones en las especies de *Rumex* oscila entre los 317 y los 416 pb, respectivamente. Como grupo externo se utilizó la especie *Fallopia convolvulus* (L.) A. Löve (*Polygonaceae*).

Los árboles neighbor joining (NJ) (distancia gamma de Tamura-Nei) y máxima verosimilitud (ML) (modelo de sustitución HKY+G) dieron lugar a la misma topología (**Figura 7**). En estos árboles se observa la presencia de tres clados fundamentalmente. Estos clados se encuentran apoyados por altos valores de bootstrap. Uno de ellos está constituido por las especies dioicas euroasiáticas y americanas (pertenecientes a los subgéneros *Acetosa* y *Acetosella*), y a su vez se puede dividir en dos subclados. El primero de estos subclados incluye a las especies de la sección *Acetosa* (subgénero *Acetosa*), todas ellas con sistema de determinismo del sexo XX/XY₁Y₂. El otro subclado incluye a las especies del subgénero *Acetosella* y a las especies de la sección *Americanae*, así como a la especie *R. suffruticosus*, de la sección *Scutati* (estas últimas secciones pertenecientes al subgénero *Acetosa*). Todas estas especies presentan sistemas cromosómicos simples XX/XY, a excepción de la raza de North Carolina de *R. hastatulus* (ver **Tabla 2**), que lo presenta complejo. El segundo clado está constituido por especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas del subgénero *Acetosa*, así como por la especie dioica africana *R. sagittatus*. La única especie del subgénero *Platypodium*, *R. bucephalophorus*, es hermafrodita y aparece como especie basal con respecto a estos dos primeros clados (constituidos por especies dioicas y especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas). Por último, el tercer clado se encuentra exclusivamente formado por especies hermafroditas pertenecientes al subgénero *Rumex*.

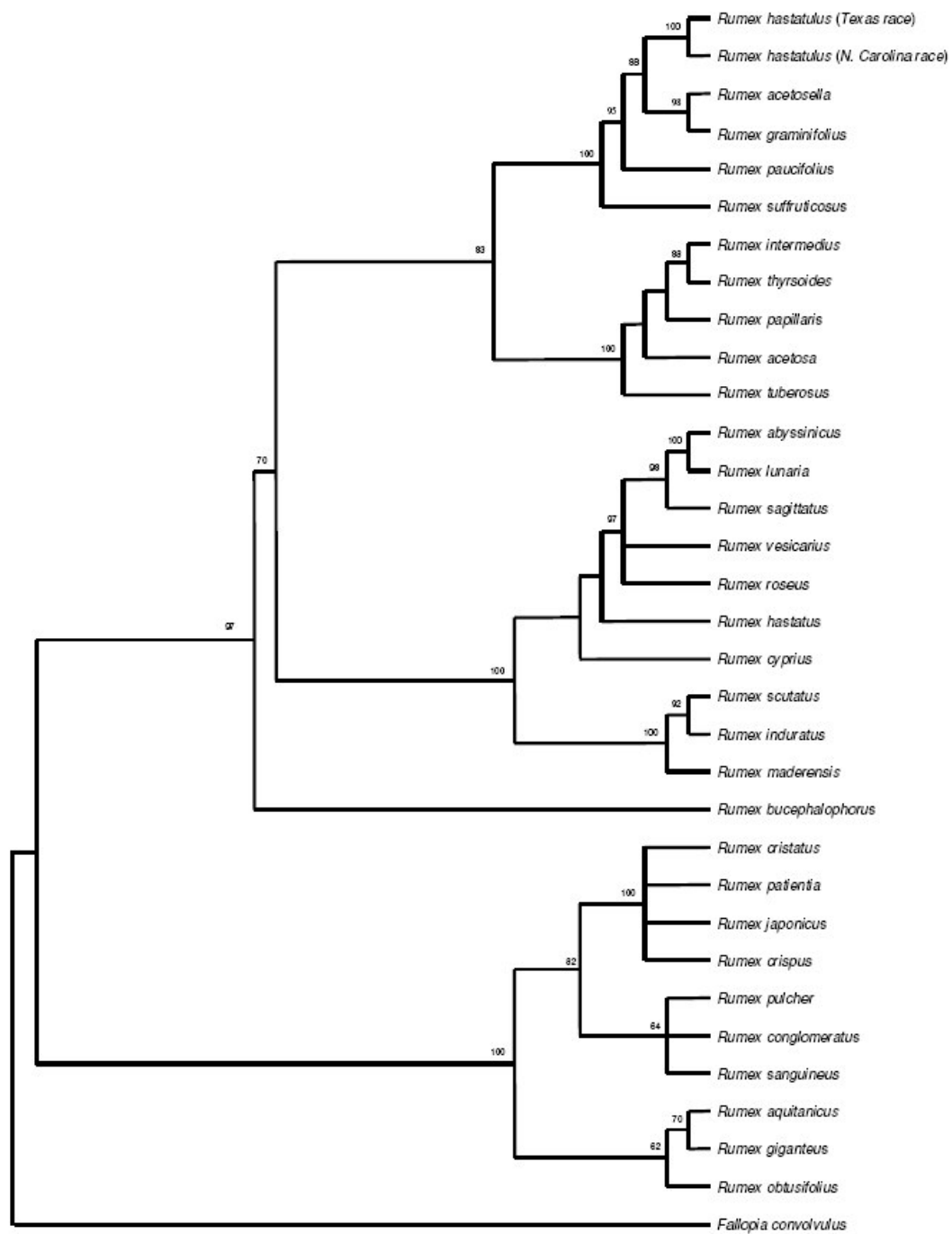


Figura 7: Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud usando las secuencias ITS analizadas en esta Memoria



Figura 8: Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud usando las secuencias cloroplastidiales analizadas en esta Memoria

Una topología similar se observa en el árbol consenso obtenido mediante máxima parsimonia (MP) (CI= 0.65, RI= 0.68, en 805 pasos, para 4 árboles igualmente parsimoniosos). Sin embargo, en este caso el árbol no queda completamente resuelto, ya que el clado de las especies dioicas, junto con el de las especies polígamo-ginodioicas y la especie *R. bucephalophorus*, forman una politomía. Para minimizar el efecto de la homoplasia se aplicó el pesaje por aproximaciones sucesivas. Los pesos se asignaron según el valor máximo de consistencia reescalada en los árboles obtenidos tras el análisis con el criterio de parsimonia de Fitch. Se realizaron sucesivas rondas de pesaje y búsqueda, partiendo de los árboles obtenidos en las búsquedas previas, hasta obtener valores de CI y RI idénticos en dos rondas sucesivas. Se llegó así a un único árbol MP (CI= 0.87, RI= 0.88, en 365 pasos), similar al que se muestra en la **Figura 7**, con *R. bucephalophorus* como especie basal de los clados de especies dioicas y hermafroditas, polígamas y ginodioicas.

Como se ha comentado al principio de este capítulo, la secuencia de la región ITS1 presenta una serie de deleciones-inserciones que pueden ser utilizadas con fines cladísticos (**Figura 6**). Así, considerando que la secuencia de *F. convolvulus* es la ancestral, existe una deleción de 53 a 63 pb que caracteriza a las especies dioicas euroasiáticas y americanas de *Rumex* (**Figura 6**). Concretamente, las especies pertenecientes al subclado con sistema cromosómico XX/XY₁Y₂ se caracterizan por la deleción de 53 pb, mientras que el subclado con sistema XX/XY lo hace por la de 63 pb. Asimismo, otras deleciones más cortas presentes en esta región, permiten distinguir adicionalmente otros dos grupos de especies. Por un lado, el resto de especies no dioicas del subgénero *Acetosa* y la especie dioica africana *R. sagittatus*, y por otro, las especies del subgénero *Rumex* (**Figura 6**).

4.1.2. Análisis de las secuencias del intrón del gen cloroplastidial trnL y del espaciador entre los genes trnL y trnF en el género *Rumex* L.-

Para el aislamiento y clonación de los marcadores cloroplastidiales usados en las 31 especies de *Rumex* y en la especie, *F. convolvulus*, hemos empleado el juego de cebadores específicos que se describen en el apartado 3.3.2.1 del Material y Métodos de esta Memoria (ver **Tabla 3**). El intrón del gen trnL se mostró altamente variable a lo largo del grupo en cuanto a su tamaño se refiere, debido a la presencia de una zona interna de microsatélites, oscilando entre los 413 y los 614 pb. Debido a que esta zona era prácticamente inalineable se excluyó del análisis. Por su parte, el tamaño del espaciador entre los genes trnL y trnF se encuentra más conservado, en torno a los 370 pb. Para realizar el análisis filogenético, combinamos los dos tipos de secuencias en una única matriz. Este alineamiento global contiene 738 caracteres, de los cuales 51 son informativos para análisis de máxima parsimonia.

Todos los árboles obtenidos, NJ (distancia de Tamura), MP (CI= 0.94; RI= 0.96; en 176 pasos; para 468 árboles igualmente parsimoniosos), y ML (modelo de sustitución K81uf) dieron lugar a una topología parecida y, a su vez, similar a la obtenida para el caso de las secuencias ITS (ver **Figuras 7 y 8**). De

hecho, se observa la existencia de los tres clados que anteriormente describíamos con una distribución semejante de las especies. La mayor diferencia, no obstante, es la posición de *R. bucephalophorus*, que en esta última topología aparece como especie basal del clado de las especies dioicas (**Figura 8**). El hecho de que los valores de bootstrap sean mayores en general para los marcadores cloroplastidiales que para las secuencias de ITS (98 contra 70), unido a que *R. bucephalophorus* comparte el número cromosómico básico con el ancestral de las especies dioicas euroasiáticas y americanas ($x=8$), sugieren que la posición filogenética obtenida con los marcadores cloroplastidiales sería la más correcta.

4.1.3. Filogenia del género *Rumex* utilizando conjuntamente el ADN ribosómico y cloroplastidial.-

Una vez estudiados los marcadores de ADN ribosómico y cloroplastidial por separado, se procedió a combinar los datos y analizarlos globalmente (**Apéndice 1**). Para ello, en primer lugar, fue necesario realizar un test de homogeneidad. Así pues, mediante un test ILD (*Incongruence Length Difference*) de homogeneidad, demostramos la consistencia entre los marcadores cloroplastidiales y nucleares ($P= 0.06$, $P= 0.08$ excluyendo caracteres invariables de acuerdo con Lee, 2001). Como se muestra en la **Figura 9**, mediante esta aproximación en la que se usan las dos matrices de secuencias combinadas, obtenemos árboles mejor resueltos, tanto con NJ (distancia gamma de Tamura-Nei), como con ML (modelo de sustitución HKY+G) y MP (CI= 0.69 [0.89]; RI= 0.74 [0.91]; con 995 [516] pasos; un único árbol parsimoniosamente informativo; entre corchetes aparecen los valores cuando fueron repesados por el máximo valor del índice de consistencia). Además, en la **Figura 9**, se muestra la relación existente entre la filogenia molecular obtenida y la evolución de los sistemas reproductivos en el género *Rumex*.

Concretamente se aprecia una topología en la que existen tres clados bien diferenciados, tal y como ocurría cuando tratábamos los datos por separado. El primero de los clados contiene a todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas, junto con la especie hermafrodita *R. bucephalophorus*, el único integrante del subgénero *Platypodium*. Las especies dioicas se separan a su vez en dos subclados. Uno de ellos está constituido por especies con sistemas cromosómicos simples XX/XY, como son *R. acetosella* y *R. graminifolius* del subgénero *Acetosella* y *R. suffruticosus*, *R. paucifolius* y *R. hastatulus* (que incluye dos razas cromosómicas alopátricas, XX/XY y XX/XY₁Y₂) pertenecientes al subgénero *Acetosa*. El otro subclado está constituido por el resto de especies dioicas de la sección *Acetosa*, subgénero *Acetosa*, todas ellas XX/XY₁Y₂.

El segundo clado lo integran las especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas del subgénero *Acetosa*, así como la dioica africana *R. sagittatus*, perteneciente a la sección *Afroacetosa* (subgénero *Acetosa*).

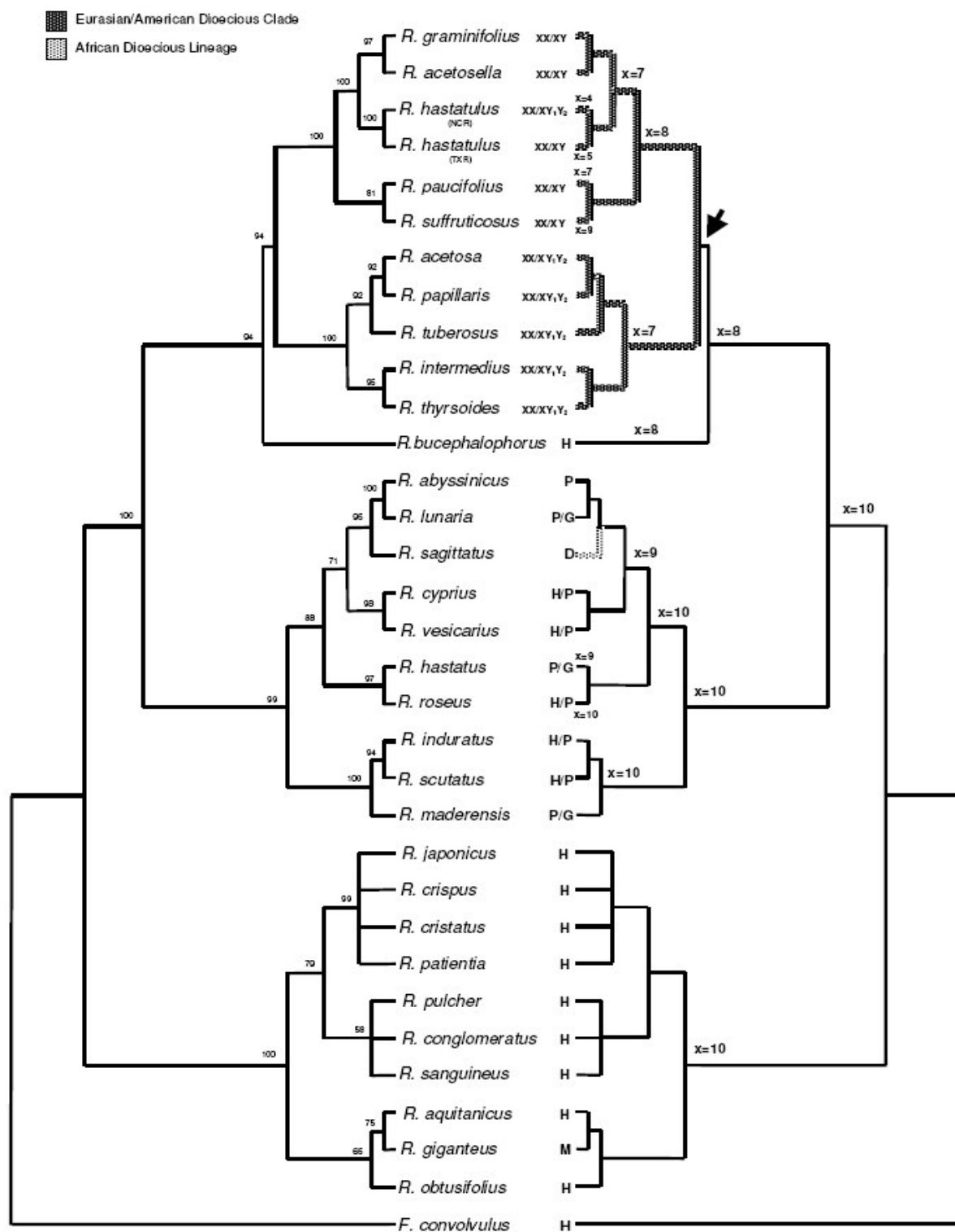


Figura 9: Árbol resumen de la filogenia molecular de *Rumex*. **(Izqda.)** Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud combinando las secuencias nucleares y cloroplastidiales analizadas en esta Memoria. **(Dcha.)** Árbol mostrando la correlación entre la filogenia y la evolución de los sistemas reproductivos (D: dioecia, G: ginodioecia, H: hermafroditismo, M: monoecia P: poligamia) y de los números cromosómicos básicos (tomado de Navajas-Pérez et al., 2005)

Por último, el tercer clado está constituido por las especies estrictamente hermafroditas del subgénero *Rumex*, con la excepción de la especie hawaiana *R. albescens*, que es monoica.

Como también reflejamos en la **Figura 9**, esta nueva filogenia molecular es coherente con la evolución cromosómica del género. De esta manera, el clado compuesto por las especies del subgénero *Rumex* se caracteriza por un número cromosómico básico $x=10$. Por otro lado, el clado compuesto por especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas del subgénero *Acetosa* presenta números básicos de $x=10$ y $x=9$. Por último, el clado formado por las especies dioicas euroasiáticas y americanas y la especie *R. bucephalophorus* tiene números cromosómicos básicos $x=8$ (*R. suffruticosus* y *R. bucephalophorus*) y $x=7$ (el resto de especies), existiendo una reducción adicional en el caso de *R. hastatulus*. Para esta última especie han sido descritos números cromosómicos básicos $x=5$, en el caso de la raza cromosómica de Texas (XX/XY), y $x=4$, en el caso de la raza de North Carolina (XX/XY₁Y₂).

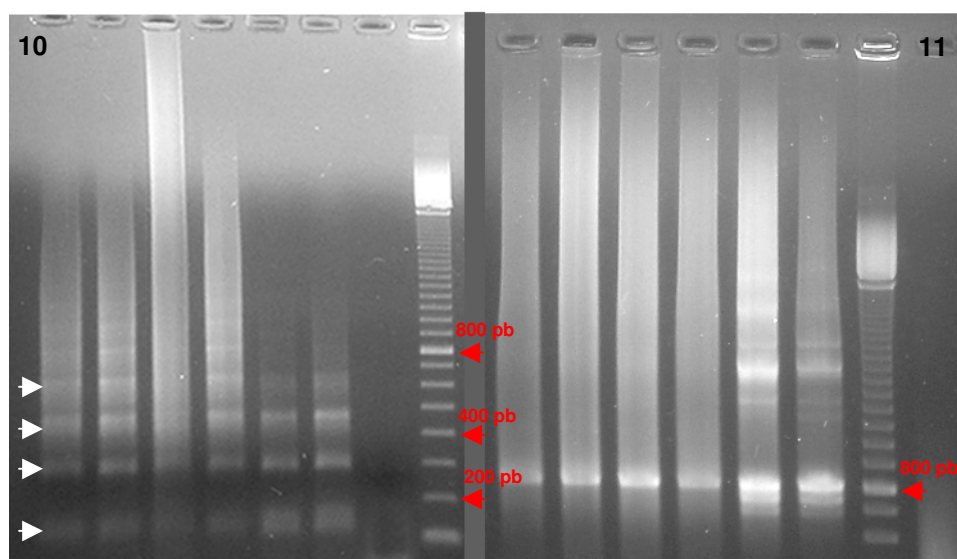
Finalmente, hemos calculado una estima del tiempo de aparición de la dioecia en el género *Rumex*. Dado que los métodos de distancia sugieren cierta tasa de variación entre los linajes, nosotros hemos recalculado los tiempos de divergencia en ausencia del reloj molecular. Para este propósito, hemos eliminado selectivamente aquellas ramas que se desviaban significativamente de una tasa constante de cambio en una serie de tests de análisis de tasas relativas, mediante el uso del programa LINTRE (Takezaki et al., 1995). Una vez que las secuencias heterogéneas fueron eliminadas, construimos un árbol linearizado asumiendo una tasa constante de cambio y recalculamos la longitud de las ramas (Takezaki et al., 1995). Teniendo en cuenta una tasa media de cambio en plantas para marcadores nucleares de 0.6% por sitio y millón de años (Gaut, 1998) y los datos de distancia obtenidos en nuestros análisis con las secuencias ITS, con las correcciones oportunas, estimamos que la dioecia en *Rumex* apareció hace entre 15 y 16 millones de años, mientras que la divergencia entre los clados que separan por un lado las especies con sistemas simples (XX/XY) y las especies con sistemas múltiples (XX/XY₁Y₂), ocurrió hace 12-13 millones de años.

4.2. Aislamiento y caracterización de tres familias de ADN satélite de *Rumex acetosa* L.

La especie *R. acetosa* ha sido considerada como un modelo en el estudio del determinismo sexual en plantas fundamentalmente por la presencia de un sistema de cromosomas sexuales complejo. Dada la naturaleza de sus cromosomas sexuales (revisado en el apartado 1.2 de esta Memoria) es notoria la acumulación en ellos de secuencias repetitivas de distinta índole (especialmente de varias familias de ADN satélite). Es normal, por tanto, que estos estudios hayan originado hasta la fecha la caracterización de tres familias de ADN satélite, la familia RAE180, presente en ambos cromosomas Y y en un locus autosómico, la familia RAE730, que constituye la heterocromatina de

segmentos heterocromáticos, y la familia RAYSI, exclusiva de la heterocromatina de los cromosomas Y. Este tipo de secuencias puede resultar muy útil a la hora de realizar ciertos estudios evolutivos sobre acumulación y evolución de las mismas en el genoma. Asimismo, es posible utilizarlas como marcadores en el proceso de aparición y evolución de los cromosomas sexuales.

Por todo ello, en esta Memoria hemos analizado en detalle estas tres familias de ADN satélite descritas en primer lugar en *R. acetosa*. Para facilitar el aislamiento sistemático de un alto número de secuencias monoméricas de las mismas, se diseñaron cebadores específicos en cada caso (ver apartado 3.3.2.1 del Material y Métodos de esta Memoria y la **Tabla 3**). Para el satélite **RAE-180**, la pareja de cebadores *RAE180-A- RAE180-B* dio lugar a la amplificación de un conjunto de productos de PCR que incluían de una a cuatro unidades monoméricas adyacentes (**Figura 10**). Los amplificados de PCR obtenidos de los otros dos satélites, **RAYSI** y **RAE-730**, usando los juegos de cebadores respectivos, fueron sólo correspondientes a unidades monoméricas o menores, a consecuencia del tamaño mucho mayor de éstos (**Figuras 11 y 34**). Una vez obtenidas, las unidades monoméricas fueron clonadas y se secuenciaron entre 4 y 7 monómeros de cada satélite en un número variable de plantas (entre 6 y 10).



Figuras 10 y 11: Electroforesis en gel de agarosa de amplificados de PCR de distintos individuos de *R. acetosa* del ADN satélite (10) RAE180 (flechas blancas) distintas unidades multiméricas (monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros) (flechas rojas) marcador de peso molecular, y (11) RAE730, donde se observa la amplificación de las unidades monoméricas a aproximadamente 800 pb (flecha roja) marcador de peso molecular

4.2.1. Familia de ADN satélite RAE180.-

En esta Memoria hemos analizado un total de 42 secuencias monoméricas pertenecientes a la familia de ADN satélite RAE180 procedentes de machos de *R. acetosa*. Hemos asumido que estas secuencias provendrían preferentemente de los cromosomas Ys de *R. acetosa* por cuanto estos

cromosomas representan el 17% del genoma y las secuencias R180 ocupan prácticamente la mayor parte de estos cromosomas frente al locus puntual del par autosómico primero. La procedencia del Y quedará confirmada más adelante al demostrarse la diferenciación entre estas secuencias aisladas de los machos y las procedentes de los autosomas aisladas a partir de hembras. La longitud monomérica total oscila en torno a los 183 pb, siendo la longitud del monómero mayor de 186 pb y la del menor de 181 pb. Hemos encontrado la presencia en las unidades monoméricas de este satélite de unos 8 marcos abiertos de lectura (ORF), oscilando entre los 18 y los 99 nucleótidos. El tamaño asciende a 177 nucleótidos cuando considerábamos un ORF que abarca el final de las unidades monoméricas y el principio de la unidad contigua. En ningún caso los productos de estas secuencias dieron homología significativa con las proteínas depositadas en la base de datos del EMBL. Es destacable que no se detecta la presencia de la repetición CAAA, de la que se ha sugerido podría estar involucrada en procesos de expansión del ADN satélite. El contenido medio de AT en estas secuencias es de un 70.3%. El número de sitios polimórficos es 131, por lo que el valor del polimorfismo es 0.712. La diversidad nucleotídica, por su parte, es 0.173. La matriz de distancias obtenida para este conjunto de secuencias da un valor medio de variabilidad intraespecífica del 19.5%. A pesar de este valor tan alto, cuando construimos un árbol filogenético NJ, no observamos la existencia de clados fuertemente apoyados por valores de bootstrap incluso cuando los monómeros eran adyacentes por provenir de un mismo clon (en esos casos a partir de ahora y a todo lo largo de esta Memoria, se utilizará la siguiente nomenclatura: A, primer monómero del tándem, B, segundo monómero, C, tercero, etc...).

Cuando se hibrida esta secuencia monomérica sobre ADN genómico total de machos y hembras de *R. acetosa* cortado con distintas enzimas (*Apa I*, *Brs I*, *EcoRI*, *Hind III*, *Dra I*, *Bcl I*, *Hae III* y *Taq I*, en este caso), observamos lo reflejado en la **Figura 12**. Concretamente, es destacable el típico patrón en escalera de tipo A que originan las enzimas *EcoRI*, *Dra I* y *Bcl I*, donde se puede observar la presencia de señales de hibridación que corresponden con unidades monoméricas, diméricas, triméricas y multiméricas constituidas por múltiples unidades de repetición, en general. El patrón de restricción de la enzima *Hind III*, por su parte corresponde a un patrón en escalera tipo B. Las enzimas *Apa I* y *Brs I* dan lugar a un patrón en el que se observan fragmentos de gran tamaño (especialmente en ADN procedente de hembras) presumiblemente por la ausencia de dianas de restricción para dichas restrictasas. Finalmente, observamos diferencias entre los patrones de restricción de machos y hembras para las enzimas sensibles a la metilación, *Hae III* y *Taq I* (**Figura 12**). Este patrón podría indicar diferencias en el patrón de metilación dependiente del sexo. Es destacable que la intensidad en la señal de hibridación es menor en líneas generales en hembras que en machos.

Por otro lado, hemos obtenido, a partir de ADN de hembras, 25 unidades monoméricas de RAE180 con el fin de caracterizar esta familia de ADN satélite en autosomas. Estas secuencias mantienen las propiedades características de RAE180, oscilando su tamaño entre los 182 y 184 pb y siendo su riqueza en AT del 70%. El número de sitios polimórficos encontrados es 109, por lo que el valor del polimorfismo es 0.592. La diversidad nucleotídica es 0.197. La matriz

de distancias calculada para el caso de estas secuencias ofrece un valor de divergencia medio entre las secuencias de 0.232. Un árbol NJ construido a partir de las mismas no revela agrupación cladística significativa entre las secuencias



Figura 12: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre ADN genómico de machos (**nº impar**) y hembras (**nº par**) de *R. acetosa* digerido con distintas enzimas de restricción (calles 1-2; *Apa I*, 3-4; *Brs I*, 5-6; *EcoRI*, 7-8; *Hind III*, 9-10; *Dra I*, 11-12; *Bcl I*, 13-14 *Hae III*, 15-16; *Taq I*)

Considerando en conjunto las secuencias procedentes de autosomas y cromosomas Y, obtenidas a partir de hembras y machos respectivamente, observamos un valor de divergencia medio de 0.207 entre todas las secuencias, mientras que la distancia entre secuencias procedentes de los Y y autosomas es 0.209. Estas secuencias presentan unos 40 estados de transición incipientes entre los estados I y III. No se observan estados de transición superiores. El número de polimorfismos compartidos es 42, y el de no compartidos asciende a un total de 80.

Utilizando como sonda, el inserto proveniente del clon *RAE180-1-31*, llevamos a cabo experiencias de hibridación *in situ* en células metafásicas de *R. acetosa* (**Figura 13**), confirmando que esta familia de ADN satélite aparece como el principal constituyente de la heterocromatina de los cromosomas Y. De hecho, se encuentra masivamente distribuida a lo largo de tanto el cromosoma

Y_1 como el Y_2 , ocupando preferentemente las zonas ricas en heterocromatina y, por tanto, DAPI positivas. Adicionalmente, está presente en la pareja autosómica número I, por consiguiente tanto en machos como en hembras, en forma de un minúsculo locus.

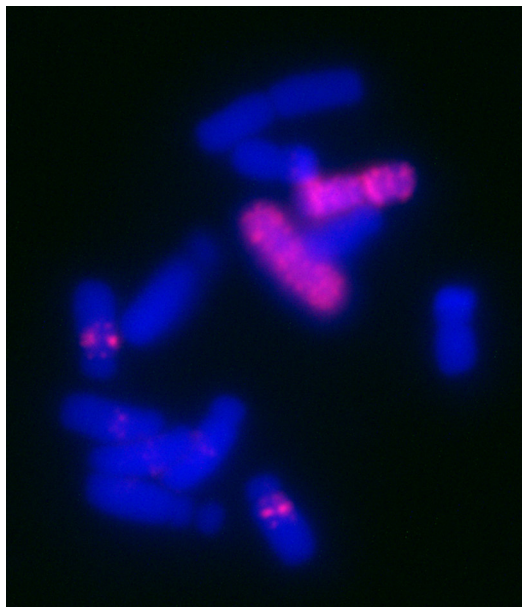


Figura 13: Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre cromosomas metafásicos de *R. acetosa*. Se aprecia que este ADN satélite es constituyente mayoritario de la heterocromatina de ambos Y. Además está presente en un locus autosómico puntual

4.2.2. Familia de ADN satélite RAE730.-

Un total de 21 secuencias monoméricas fueron aisladas de la especie *R. acetosa* para esta familia de ADN satélite específica de segmentos heterocromáticos. La longitud de las unidades monoméricas oscila entre las 727 y las 731 pb. Hemos detectado la presencia de hasta 17 marcos abiertos de lectura, oscilando su tamaño entre los 6 y los 159 nucleótidos. En ningún caso los productos de estas secuencias dieron homología significativa cuando se cotejaron con las secuencias de proteínas de la base de datos del EMBL. Asimismo, es destacable la presencia significativa del motivo CAAA a lo largo de la secuencia monomérica de RAE730, tal y como se observa en el alineamiento de todas las secuencias analizadas (ver **Apéndice 6**). Concretamente, este motivo se encuentra conservado en cuatro sitios, entre las posiciones 120-124, 222-226, 383-387 y 402-406. El contenido medio en AT es considerablemente elevado (70.5%). El número de sitios polimórficos es 230, por lo que el valor del polimorfismo es 0.305. La diversidad nucleotídica, por su parte es 0.053. El estudio de la matriz de distancias desprende una variabilidad intraespecífica media entre las secuencias monoméricas del 5.5%, siendo la diferencia mayor entre pares de monómeros de 9.2% y la menor de 1.4%.

Cuando se hibrida esta secuencia monomérica sobre ADN genómico total de machos y hembras de *R. acetosa* cortado con distintas enzimas de restricción (*Apa I*, *Brs I*, *EcoRI*, *Hind III*, *Dra I*, *Bcl I*, *Hae III* y *Taq I*, en este

caso), con el resultado que se observa en la **Figura 14**. Concretamente, detectamos un patrón en escalera tipo A, con la presencia de unidades multiméricas diversas (desde monómeros a heptámeros) y otras unidades menores, con las enzimas: *EcoRI*, *Hind III*, *Dra I* y *Bcl I*, si bien es destacable el patrón marcadamente distinto de machos para esta última (**Figura 14**). Esto puede ser nuevamente achacable a diferencias en el patrón de metilación o consecuencia de una digestión parcial del ADN de uno de los sexos. Las enzimas *Apa I* y *Brs I* dan lugar a un rastro intenso casi a lo largo de toda la calle. Por último, hay que destacar el patrón marcadamente diferente que observamos en el patrón de restricción de las enzimas sensibles a la metilación, *Hae III* y *Taq I* (**Figura 14**).



Figura 14: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición RAE730 sobre ADN genómico de machos (**nº impar**) y hembras (**nº par**) de *R. acetosa* digerido con distintas enzimas de restricción (calles 1-2; *Apa I*, 3-4; *Brs I*, 5-6; *EcoRI*, 7-8; *Hind III*, 9-10; *Dra I*, 11-12; *Bcl I*, 13-14; *Hae III*, 15-16; *Taq I*)

Shibata y col. (2000b) describieron la existencia de unas subrepeticiones internas de unos 120 pb para esta secuencia. De esta manera, cada monómero RAE730 estaría constituido por 6 de estas subrepeticiones. El alineamiento de todos los monómeros RAE730 analizados en esta Memoria y mostrado en la **Figura 15a**, muestra las repeticiones de los motivos de 120 pb que nosotros también encontramos en estas secuencias.

Figura 16: (en la página anterior) Alineamiento de la primera parte de un monómero de RAE730 con la segunda, en unidades de aproximadamente 360 pb

Por último, analizamos la localización cromosómica de esta familia en células mitóticas de *R. acetosa*. Tal y como muestra la **Figura 17a**, se confirma que la familia de ADN satélite RAE730, se encuentra constituyendo la heterocromatina de dos prominentes segmentos heterocromáticos existentes en el par VI del complemento autosómico. Estos segmentos son fuertemente heterocromáticos y DAPI positivos (**Figura 17b**).

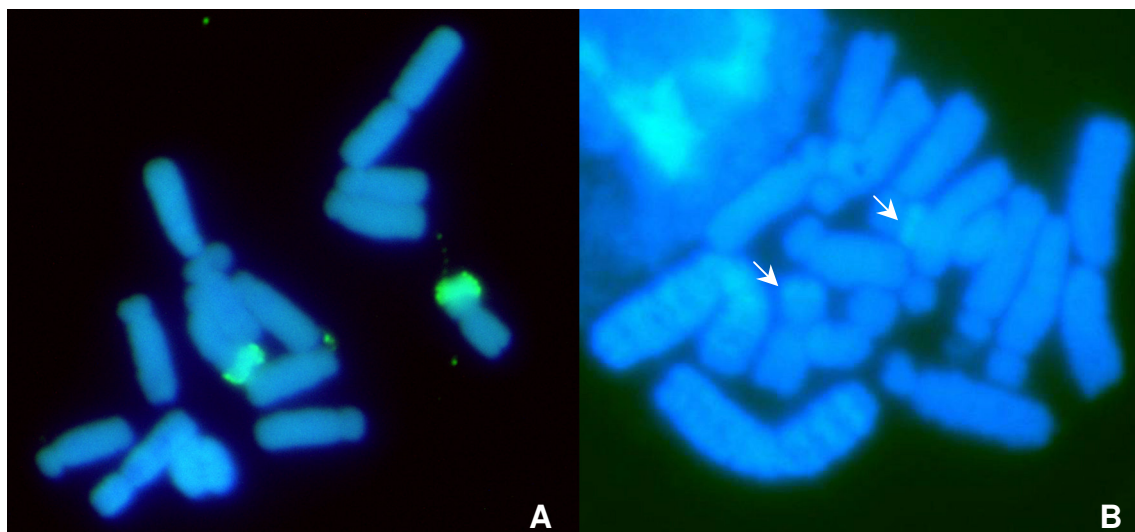


Figura 17: (A) Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE730 sobre cromosomas metafásicos de *R. acetosa*. (B) Cromosomas metafásicos de *R. acetosa* contrateñidos con DAPI. (flechas) Segmentos heterocromáticos en el par VI

4.2.3. Familia de ADN satélite RAYSI.-

De esta familia de ADN satélite, específica de los cromosomas Y, hemos obtenido un total de 42 clones a partir de machos de la especie *R. acetosa*. El tamaño total de las secuencias se encuentra comprendido entre 922 y 932 pb. Asimismo, es destacable que la repetición CAAA involucrada en procesos de rotura-uni3n se encuentra conservada entre las posiciones 224-230 y 883-887, de las secuencias monom3ricas de RAYSI (ver **Ap3ndice 7**). Se detecta la presencia de hasta 12 marcos abiertos de lectura que oscilan entre 4 y 255 nucle3tidos. En cualquier caso, los productos codificados no dieron homol3gía significativa con ninguna de las secuencias de prote3nas depositadas en la base de datos del EMBL. El contenido medio de AT es alto, del 67.7%. Se detectan 384 sitios polim3rficos, por lo que el valor del polimorfismo es 0.379. El valor de la diversidad nucleot3dica para esta secuencia es 0.103.

Cuando se hibrida esta secuencia monom3rica sobre ADN gen3mico total de machos y hembras de *R. acetosa* cortado con distintas distintas enzimas de restricci3n (*Apa I*, *Brs I*, *EcoRI*, *Hind III*, *Dra I*, *Bcl I*, *Hae III* y *Taq I*,

en este caso), observamos lo reflejado en la **Figura 18**. En primer lugar es destacable la ausencia de hibridación en todo caso en hembras. En machos, es destacable el patrón en escalera tipo A, con la presencia de varias unidades multiméricas, que originan las enzimas *Apa I*, *Brs I*, *EcoRI*, *Hind III*, *Dra I* y *Bcl I*. La enzima *Hae III* destaca por un patrón de restricción en el que se aprecian unidades menores a la unidad monomérica, lo que indica la presencia de dianas internas para esta enzima. Lo mismo sucede con la enzima *Taq I*, que da lugar a un patrón caracterizado por la presencia de un rastro intenso a lo largo de toda la calle y la existencia de múltiples bandas de distintos tamaños (**Figura 18**).

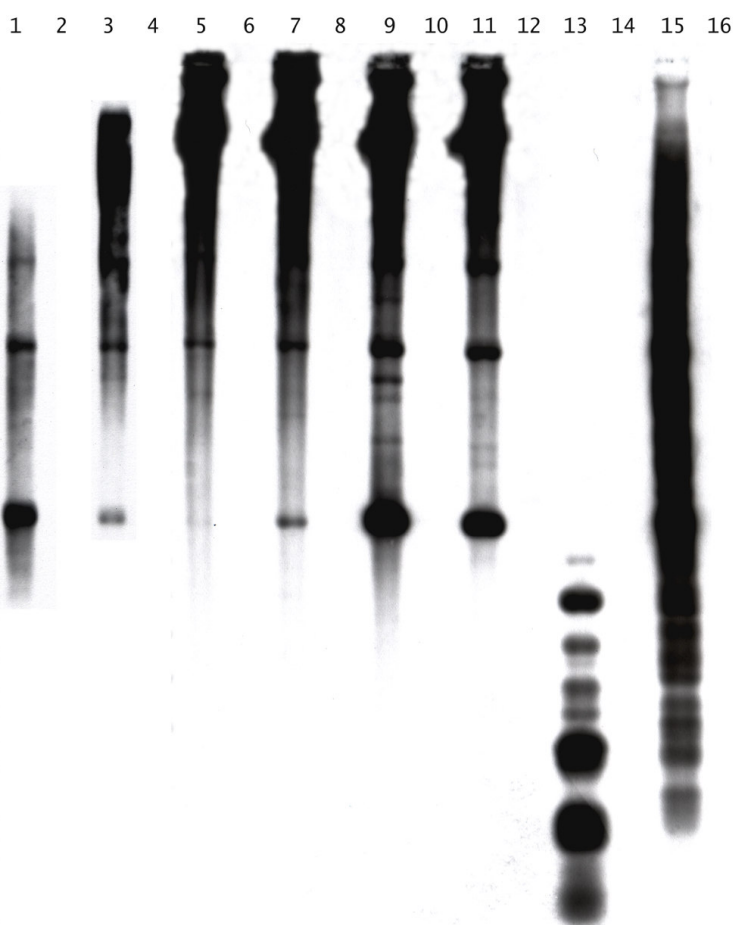


Figura 18: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición RAYSI sobre ADN genómico de machos (nº impar) y hembras (nº par) de *R. acetosa* digerido con distintas enzimas de restricción (calles 1-2; *Apa I*, 3-4; *Brs I*, 5-6; *EcoRI*, 7-8; *Hind III*, 9-10; *Dra I*, 11-12; *Bcl I*, 13-14 *Hae III*, 15-16; *Taq I*)

La matriz de distancias muestra un porcentaje de divergencia intraespecífica media del 17.3%. Un análisis filogenético basado en el método neighbor joining (NJ-Saito y Nei, 1987) usando las 42 secuencias dio lugar a un árbol dividido en dos clados bien apoyados por valores consistentes de bootstrap (**Figura 19**). Según esto, podemos considerar la existencia de dos tipos de secuencias RAYSI o subfamilias, que a partir de ahora llamaremos subfamilia RAYSI-S y RAYSI-J. Concretamente, 19 de las secuencias aisladas eran pertenecientes al tipo S, mientras que 23 lo eran del tipo J. Considerando esta vez cada secuencia según a la subfamilia a la que pertenecían, se calcularon nuevos valores “intrasubfamiliares”. El porcentaje de diferencias para la subfamilia RAYSI-S fue entonces de 4,3%, mientras que para la subfamilia RAYSI-J lo era del 4,8%. La distancia media entre ambas subfamilias es 17,9%.

Un análisis comparativo entre los dos tipos de secuencias posición a posición teniendo en cuenta el método de Strachan (1985) demuestra la existencia de 83 posiciones diagnóstico para cada una de las subfamilias (ver más adelante **Figura 39**). Esto es, se trata de mutaciones que comparten todas las secuencias de un tipo para una posición dada, mientras que las secuencias del otro presentan un nucleótido distinto en esa misma posición. Además, tanto la subfamilia S como la J tienen unas delecciones diagnósticas que las diferencian: entre las posiciones 497-511 y 579-594 para los monómeros de RAYSI-S y entre las posiciones 873-880 y 901-910, en el caso de las secuencias de RAYSI-J (ver más adelante **Figura 39**).

Finalmente, y al igual que en el caso de las secuencias de la familia **RAE-730**, hemos detectado la presencia en las secuencias monoméricas **RAYSI** de unas subrepeticiones internas de aproximadamente 120 pb (**Figura 20a**). En este caso, cada una de las secuencias monoméricas estaría comprendida por 8 de estas subrepeticiones de 120 pb cada una, lo que corresponde aproximadamente con el tamaño total del monómero. Este fenómeno es apreciable tanto en la subfamilia S como en la J. Las relaciones de parentesco entre las distintas unidades de 120 pb son, entre la 6ª repetición (RAY6) y la 1ª (RAY1), la 7ª (RAY7) y la 4ª (RAY4) y la 8ª (RAY8) con la 5ª (RAY5), respectivamente (es decir, 678/145) (**Figura 20b**). Por otro lado, la subrepetición 3ª (RAY3) es homóloga a la 1ª y a la 6ª, mientras que la 2ª (RAY2) lo es a la 4ª y a la 7ª, tal como aparece reflejado en la figura **20b**.

Según este escenario evolutivo, la explicación más plausible de la evolución de estas subrepeticiones y la configuración actual del satélite la tendríamos en la aparición de las secuencias de RAYSI mediante una serie de ciclos de amplificación y divergencia de una secuencia ancestral de 120 pb. Ésta, habría sufrido dos procesos de duplicación consecutivos, originando en primer lugar un satélite de 360 pb y posteriormente uno de 730 pb (ver más adelante **Figura 23**). Dos eventos adicionales de amplificación por entrecruzamiento desigual, explicarían la formación del actual satélite de 930 pb **RAYSI** (ver **Figura 23**).

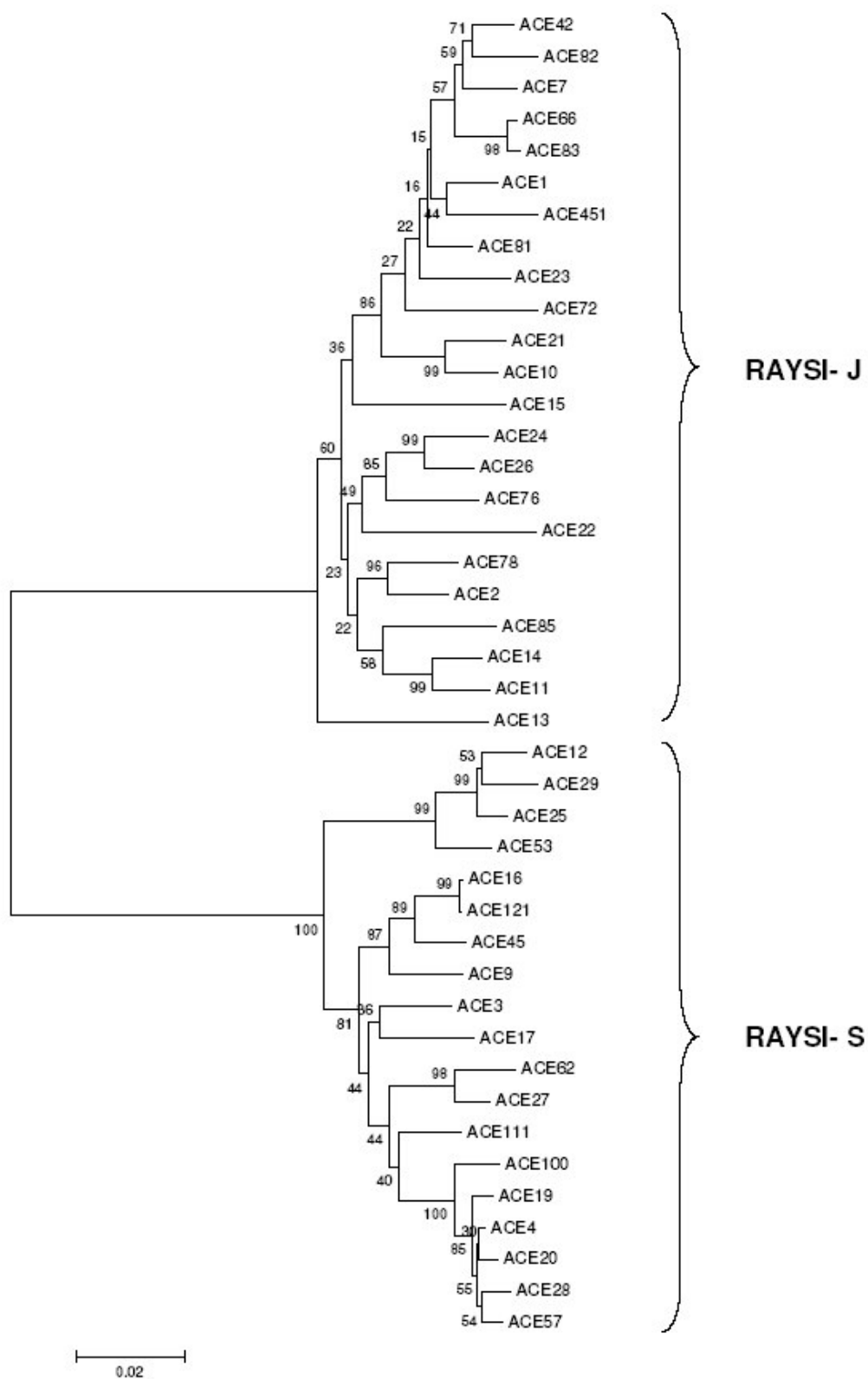


Figura 19: Árbol NJ de las secuencias de RAYSI de *R. acetosa*, indicando la presencia de dos tipos de subfamilias, RAYSI-S y RAYSI-J

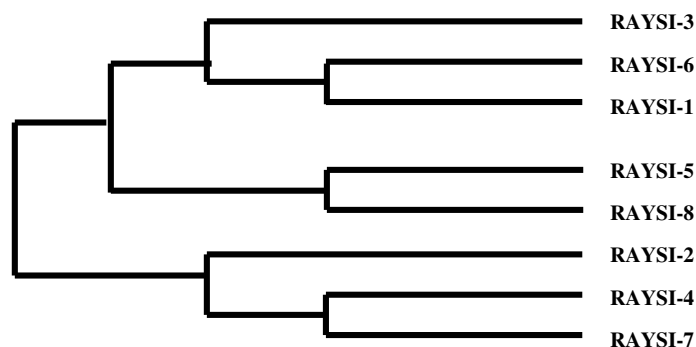
Para la localización cromosómica de la familia RAYSI en *R. acetosa*, utilizamos en primer lugar como sonda una mezcla de los insertos *RAYSI5-10* y *RAYSI5-7*, pertenecientes a las dos subfamilias descritas. Se llevaron a cabo experiencias de hibridación *in situ* simple sobre células metafásicas de *R. acetosa* (**Figura 21A**). Esta hibridación demostró que las secuencias de RAYSI son específicas de los cromosomas Y, estando presentes, por tanto, sólo en los machos y no existiendo evidencia alguna de hibridación en el resto de autosomas. El patrón de hibridación observado atendiendo a esta primera aproximación en el cromosoma Y₁, corresponde a seis bandas: tres de ellas, dos en el brazo corto y una en la zona centromérica, son bandas intensas. El resto se encuentran distribuidas en forma de señales tenues a lo largo del brazo largo (**Figura 21A**). Por otro lado, el cromosoma Y₂ presenta hibridación en una reducida zona subteloamérica (**Figura 21A**).

```

RAY-J1 --T--AA-GC AT-TATTTCT TAATTAGG-C CCAATTGAAC CATTATATT CGTTTT--GC ACCATATT--
RAY-J2 ---TG..-CT .-ACTA.G.C C..C..C.-- A.....TCCT ....C..CGA .A..G-CACG .TA..CAA--
RAY-J3 ----A..-CA .-T.TGGC.C A.C.ATT.-- T.....CCT ....C..TGA G....-CACA CTT.A..ATT
RAY-J4 -----C. .GT..CAA.C A.C.A-.-. ....CCT ...GC..CAA T....-AA. ..T.....-
RAY-J5 ----TGT-A. TAAC TGGG.C -.C..A.-G .T.G...C.T T..A.T.T.G TCGC..CGCA .TATATAA-A
RAY-J6 TA.GT...- .-T.TGG..C .....- .A.....G.. A...A...A. .A...-GACA C.ATATCA--
RAY-J7 ---GT..T.. .AC.GGGC.C A.T.----- .TCT..-C.T .A.----- -....-CACA CTATAT...-
RAY-J8 ----TGT-A. CAA.TGGG.- ...C..C.-. AT.....C.T T.A..TATAA -----ACAA TAT..CAA--

RAY-J1 AATGACTTGA ATACTT-GAT CTT-CCACTA TATA-GACTC TC---AATAG -TAATGAAGA ATGGAAA
RAY-J2 .GCATAG.AT TAT.GATC.. .CAC.--TA. .-..... .T-GA.TAT. CC..AA..CT .CAATC.
RAY-J3 GCGACA.AAT .....CAATG T.ATAGTAA. ....-CT... .AATAGT... AA..AATTTT .AT-G..
RAY-J4 ..G.CA.AAT ....ACGA.. T.ACA--A.. C...-TT... ..-GA.TA.. -CC.AA.G.C TATC...-
RAY-J5 GGCATAC.-- TA...CAATC T.CTA---T ...G-...-A AT--CG-.-. --T---.-.T .CTCG..
RAY-J6 -.G..A.AA. ....GATC T.CCA---C ...T-...T ..-A..G.. -.CGT..T. C.AT...-
RAY-J7 -GC.TAA.-- ...GACAT.C T.CCA---G ....-T.... .T-TA.TCGT -CCGAA.CCC TGTC...-
RAY-J8 -GGC.TAA-- ----GAGT-- -.CC-A-.... ...T-...A .T-GC.T.G- --T.CTC.A. -.A----
    
```

A



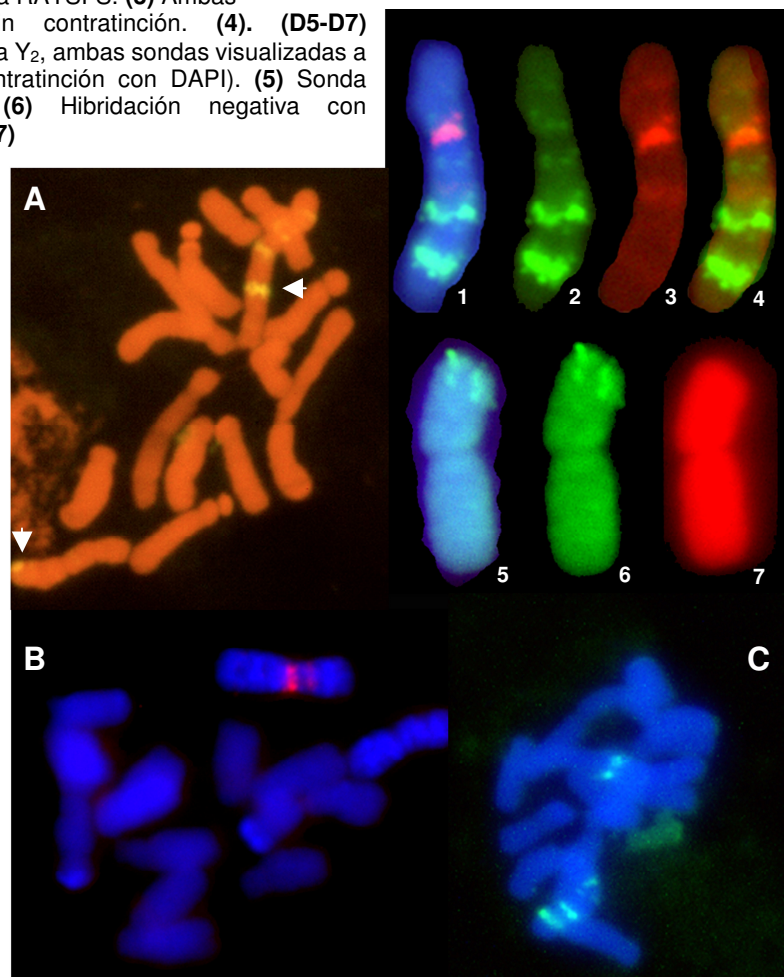
B

Figura 20: Análisis de la evolución de las unidades de repetición de RAYSI-J (**A**) Alineamiento de un monómero RAYSI en subunidades de 120 pb (**B**) Árbol NJ usando las subrepeticiones de 120 pb

Para determinar si la localización de las subfamilia S y J es diferencial o no, se utilizaron técnicas de hibridación *in situ* doble. Para ello, insertos de los dos tipos de secuencias fueron marcados diferencialmente y empleados como

sonda. De esta manera, con la sonda RAYSI-S, las señales de hibridación aparecieron en forma de una banda intensa en la zona centromérica del cromosoma Y_1 , así como en forma de dos bandas tenues a cada lado del centrómero (**Figura 21B**). Con la sonda RAYSI-J, las señales de hibridación estaban localizadas en forma de dos bandas en el brazo corto del cromosoma Y_1 , más dos bandas tenues, también situada cada una a ambos lados del centrómero (**Figura 21C**). Esta técnica se muestra más resolutive, no sólo por el esclarecimiento de la posición de cada subfamilia, sino porque es capaz de detectar más eficientemente señales de hibridación positiva menos intensas. Adicionalmente, la sonda RAYSI-J dio señal positiva en la región subtelo mérica del cromosoma Y_2 (**Figura 21C**). Notablemente, la sonda RAYSI-S no dio ninguna señal de hibridación en el cromosoma Y_2 (**Figura 21D**). Esta última aproximación utilizando técnicas de hibridación *in situ* doble (**Figura 21D**), confirmó que ambas subfamilias se encuentran ocupando loci distintos, estando yuxtapuesta una con respecto a la otra.

Figura 21: Hibridación *in situ* de utilizando como sonda las unidades de repetición de RAYSI-S y RAYSI-J, **(A)** en conjunto, con contratinción con yoduro de propidio (**flechas**) cromosomas Y. **(B)** Con la sonda RAYSI-S. **(C)** Con la sonda RAYSI-J. **(D)** Hibridación *in situ* utilizando las sondas pertenecientes a cada subfamilia marcadas diferencialmente (**verde**) RAYSI-J (**rojo**) RAYSI-S. **(D1-D4)** Cromosoma Y_1 , ambas sondas visualizadas a la vez (contratinción con DAPI). **(1)** Sonda RAYSI-J. **(2)** Sonda RAYSI-S. **(3)** Ambas sondas sin contratinción. **(4)**. **(D5-D7)** Cromosoma Y_2 , ambas sondas visualizadas a la vez (contratinción con DAPI). **(5)** Sonda RAYSI-J. **(6)** Hibridación negativa con RAYSI-S. **(7)**



4.3. Análisis comparativo de las diferentes familias de ADN satélite de *Rumex acetosa*.-

Tras el análisis por separado de cada una de las familias de ADN satélite, nos propusimos llevar a cabo un estudio comparativo entre ellas para intentar esclarecer los procesos evolutivos que han experimentado, así como sus posibles relaciones de parentesco.

De esta manera, no observamos una identidad significativa entre secuencias de la familia RAE180 con el resto de satélites. Por el contrario, hemos detectado que las secuencias de RAYSI y RAE730 muestran homología y pueden ser alineadas con una relativa precisión. El porcentaje de similitud entre ambas secuencias es del 55%. Sin embargo, esta identidad es considerablemente superior (70%) considerando determinadas zonas de las secuencias monoméricas. Esto, junto con la presencia en ambas familias de una subrepetición de 120 pb, nos ha llevado a considerar un posible origen común de ambas secuencias. De hecho, las subrepeticiones de 120 pb (R730 1 a 6 y RAY 1 a 8) pueden ser alineadas con precisión (ver **Figuras 15 y 20**).

Fruto del análisis previo, tenemos datos de la existencia de un satélite intermedio de 360 pb en el proceso evolutivo de ambos satélites. La cuestión siguiente a resolver, por tanto, es la de si este satélite intermedio es ancestral común a los dos satélites actuales o si por el contrario hubo dos eventos duplicación desde el ancestral de 120 pb ocurridos por separado en el proceso evolutivo de RAYSI y RAE730.

La comparación de unidades de 360 pb (fruto de la duplicación de tres subunidades de 120 pb) en las que se pueden dividir los monómeros de cada uno de los satélites (concretamente RAE730-123, RAE730-456, RAY-145 y RAY-678) revela un grado mayor de identidad entre los trímeros del mismo ADN satélite (75% y 68% respectivamente). Sin embargo, se revela una separación entre las unidades de una y otra familia de ADN satélite como muestra el árbol NJ de la **Figura 22**, lo que nos hace decantarnos por nuestra segunda hipótesis, que proponía dos eventos de duplicación distintos a lo largo del proceso evolutivo de estos satélites.

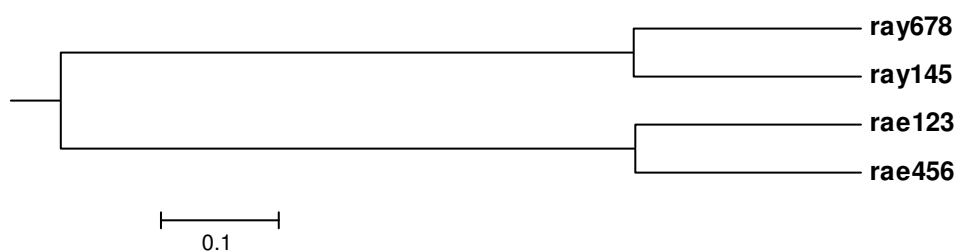


Figura 22: Árbol NJ de las unidades de 360 pb procedentes de RAE730 (**rae**) y RAYSI (**ray**)

Por último, el hecho de que la divergencia entre los trímeros de RAE730 sea menor que la divergencia entre trímeros de RAYSI ($j_c d=0.31$ frente a $j_c d=0.42$), y teniendo en cuenta además que la tasa evolutiva del satélite RAE730 es superior a la de RAYSI (como veremos más adelante a lo largo de esta Memoria), sugiere un origen más reciente en RAE730 que en RAYSI de la duplicación que condujo desde el satélite de 360 pares de bases a los actuales. Se trata, por lo tanto, de dos eventos de duplicación distintos ocurridos en momentos evolutivos distintos, siendo el primero el que dio lugar a las secuencias RAYSI, específicas de los cromosomas Y.

Esta hipótesis, entonces, asumiría que durante un periodo de tiempo evolutivo determinado habrían coexistido en el genoma de *R. acetosa* y especies emparentadas, un satélite de 360 pb con otro (de 730 pb) originado por la duplicación del mismo y que sufrió una amplificación en los cromosomas Y. Posteriormente, tuvo lugar la duplicación de ese satélite de 360 pb que se habría amplificado de manera similar en los segmentos heterocromáticos de la pareja VI originando el actual RAE730. Asimismo, eventos de entrecruzamiento desigual originaron, a partir del satélite de 730 pb acumulado en los cromosomas Y, la actual familia RAYSI de ADN satélite de 930 pb (**Figuras 22 y 23**).

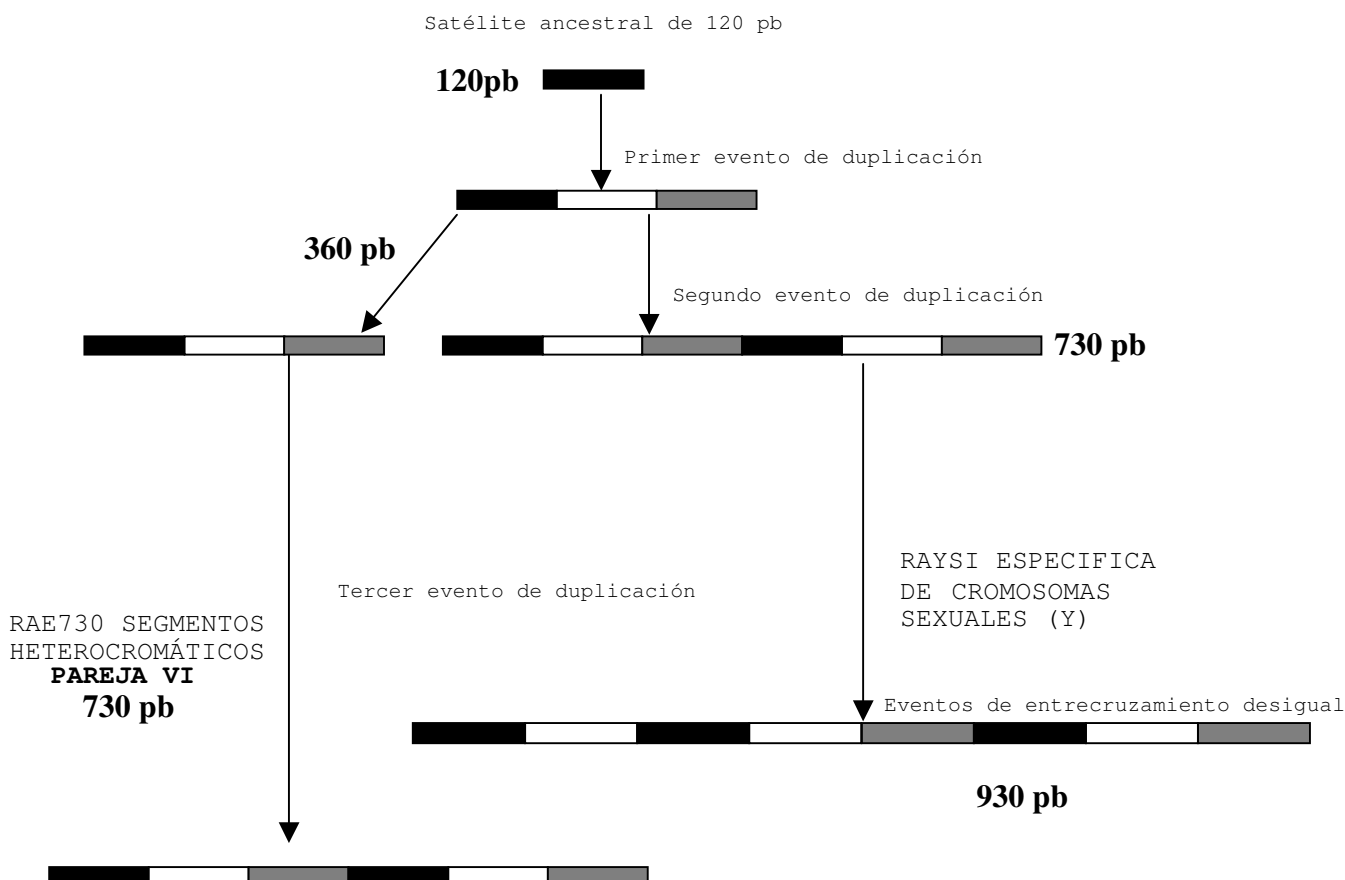


Figura 23: Esquema evolutivo de la aparición de las actuales familias de ADN satélite RAE730 y RAYSI

4.4. Presencia de las familias de ADN satélite de *Rumex acetosa* en el género *Rumex*.-

No es extraño encontrar en la bibliografía la descripción de familias de ADN satélite que están presentes en diversas especies emparentadas dentro del ámbito de un mismo género. Con la intención de analizar esta posibilidad con las familias de ADN satélite que nos ocupan, realizamos una serie de experiencias de hibridación tipo Southern-blot y PCR. Para ello seleccionamos las especies más representativas de cada grupo del género *Rumex*. El ADN genómico total de dichas especies fue digerido con *EcoRI* y fue transferido a una membrana de nylon para las hibridaciones. Concretamente las especies analizadas mediante hibridación tipo Southern-blot fueron: *R. acetosa*, *R. papillaris*, *R. intermedius*, *R. thyrsoides*, *R. tuberosus*, *R. hastatulus* (razas de Texas y North Carolina), *R. acetosella*, *R. suffruticosus*, *R. bucephalophorus*, *R. scutatus*, *R. induratus*, *R. maderensis*, *R. lunaria*, *R. vesicarius*, *R. roseus*, *R. sagittatus*, *R. crispus*, *R. conglomeratus*, *R. obtusifolius*, *R. patientia* y *R. pulcher*. Cuando la cantidad de ADN no fue suficiente, se recurrió a la técnica de hibridación tipo *dot blot*.

4.4.1. Distribución de la familia de ADN satélite RAE-180.-

Los experimentos de hibridación tipo Southern-blot utilizando como sonda el inserto aislado a partir del clon *RAE180-1-31*, dio como resultado lo reflejado en la **Figura 24**. En ella se puede observar una hibridación positiva en todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas analizadas (esto es *R. acetosa*, *R. papillaris*, *R. intermedius*, *R. suffruticosus*, *R. acetosella*, *R. hastatulus*), y ello tanto en los machos como en las hembras. Es significativa la presencia de este satélite por tanto, en especies dioicas tanto con sistemas sexuales simples XX/XY, como en especies con sistemas múltiples, XX/XY₁Y₂. Asimismo, es notable su ausencia en el resto de especies analizadas pertenecientes a los distintos clados en que se puede dividir el género, incluyendo la especie dioica africana *R. sagittatus*.

En las especies con hibridación positiva, destaca un patrón en escalera tipo A presente en las especies *R. acetosa*, *R. papillaris*, *R. intermedius* y *R. suffruticosus*, con la característica existencia de distintas señales de hibridación equidistantes correspondientes a las distintas unidades multiméricas. Para el resto de especies (*R. acetosella* y *R. hastatulus*) se observa un rastro correspondiente a fragmentos de alto peso molecular, posiblemente por la ausencia de dianas de restricción para la enzima empleada en este experimento, concretamente *EcoRI*. Además, es apreciable que para el caso de las especies con sistemas complejos XX/XY₁Y₂ (*R. acetosa*, *R. papillaris*, *R. intermedius*), la señal de hibridación es más intensa para los genomas de machos que de hembras. Esto no incluye a la raza cromosómica de North Carolina de *R. hastatulus*.

Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos de PCR utilizando la pareja de cebadores diseñada para la amplificación específica de esta familia.

Los resultados obtenidos confirmaron las observaciones efectuadas en las hibridaciones tipo Southern-blot o dot-blot (ver **Tabla 4**).

4.4.2. Distribución de la familia de ADN satélite RAE-730.-

En la **Figura 25**, se muestra el resultado de la hibridación, esta vez utilizando como sonda el inserto del clon RAE730-12-2. Como en el caso anterior, todas las especies emparentadas con *R. acetosa*, con sistemas cromosómicos de determinación sexual complejos, portan esta familia de ADN satélite. Es notable que tanto hembras como machos presentan la misma intensidad en la señal de hibridación. Asimismo, en ambos sexos se observa el típico patrón en escalera tipo A, con la presencia de distintas unidades multiméricas. Sin embargo, no existe evidencia de señal de hibridación positiva en el resto de especies analizadas, incluyendo especies con sistemas de cromosomas sexuales simples XX/XY.

Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos de PCR utilizando la pareja de cebadores diseñada para la amplificación específica de esta familia. Los resultados obtenidos confirmaron las observaciones efectuadas en las hibridaciones tipo Southern blot o dot-blot (ver **Tabla 4**).

4.4.3.- Distribución de la familia de ADN satélite RAYSI.-

La **Figura 26**, muestra la hibridación utilizando como sonda los insertos pertenecientes a los clones RAYSI 5-10 y 5-7. En ella se aprecia hibridación positiva en los machos de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*, estando ausente en todas las demás especies analizadas. Destaca el típico patrón en escalera tipo A característico de las familias de ADN satélite dispuestas en tándem, con la presencia de las distintas unidades multiméricas. Las especies con hibridación positiva pertenecen todas a la sección Acetosa, del subgénero Acetosa, y son especies caracterizadas por la presencia del sistema de determinación sexual complejo XX/XY₁Y₂. Adicionalmente, por medio de experimentos de dot-blot, otras especies pertenecientes a este grupo, *R. thyrsoides* y *R. tuberosus* concretamente, fueron analizadas, con resultados igualmente positivos. Esta familia de ADN satélite es específica de machos, no encontrándose evidencia de hibridación en los genomas de las hembras. Es especialmente reseñable que esta familia de ADN satélite se encuentra ausente de los genomas del resto de especies analizadas, incluyendo especies con sistemas cromosómicos simples XX/XY, así como a la raza de North Carolina de *R. hastatulus*, XX/XY₁Y₂.

Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos de PCR utilizando cada una de las parejas de cebadores diseñadas para la amplificación específica de secuencias RAYSI. Los resultados obtenidos confirmaron las observaciones efectuadas en las hibridaciones tipo Southern blot o dot-blot (ver **Tabla 4**).

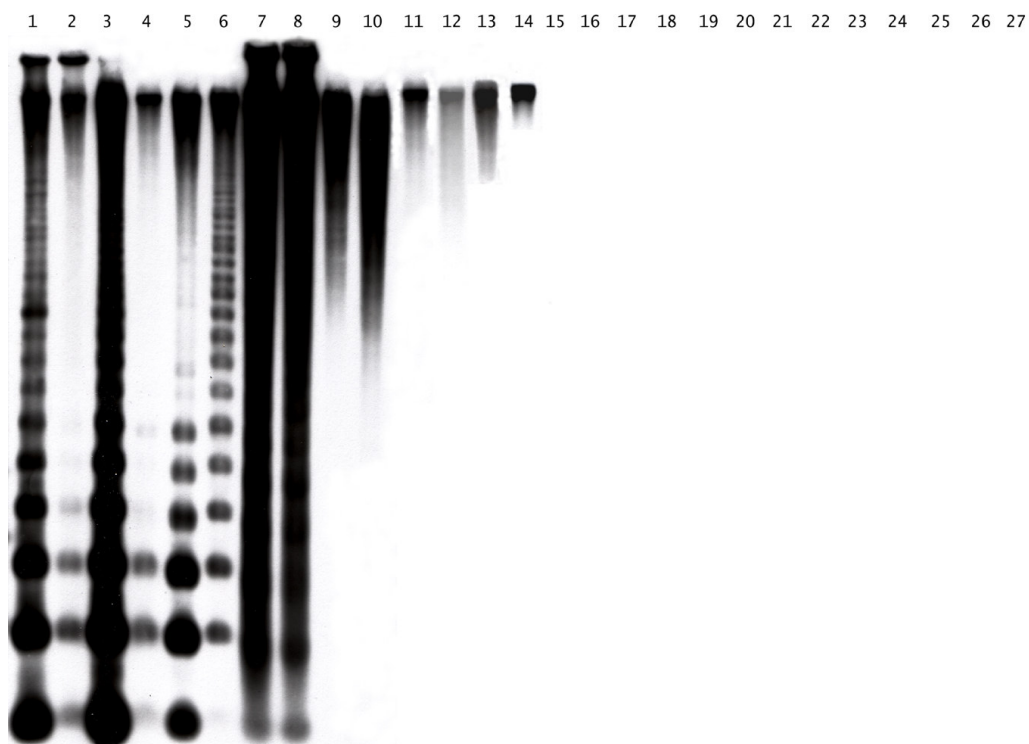


Figura 24: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RAE180 sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*: (1-2) ♂♀ *R. acetosa*, (3-4) ♂♀ *R. papillaris*, (5-6) ♂♀ *R. intermedius*, (7-8) ♂♀ *R. suffruticosus*, (9-10) ♂♀ *R. acetosella*, (11-12, 13-14) ♂♀ *R. hastatulus* (razas de Texas y North Carolina), (15) *R. bucephalophorus*, (16) *R. maderensis*, (17) *R. scutatus*, (18) *R. induratus*, (19) *R. lunaria*, (20-21) ♂♀ *R. sagittatus*, (22) *R. roseus*, (23) *R. crispus*, (24) (25) *R. conglomeratus*, (26) *R. obtusifolius* y (27) *R. patientia*

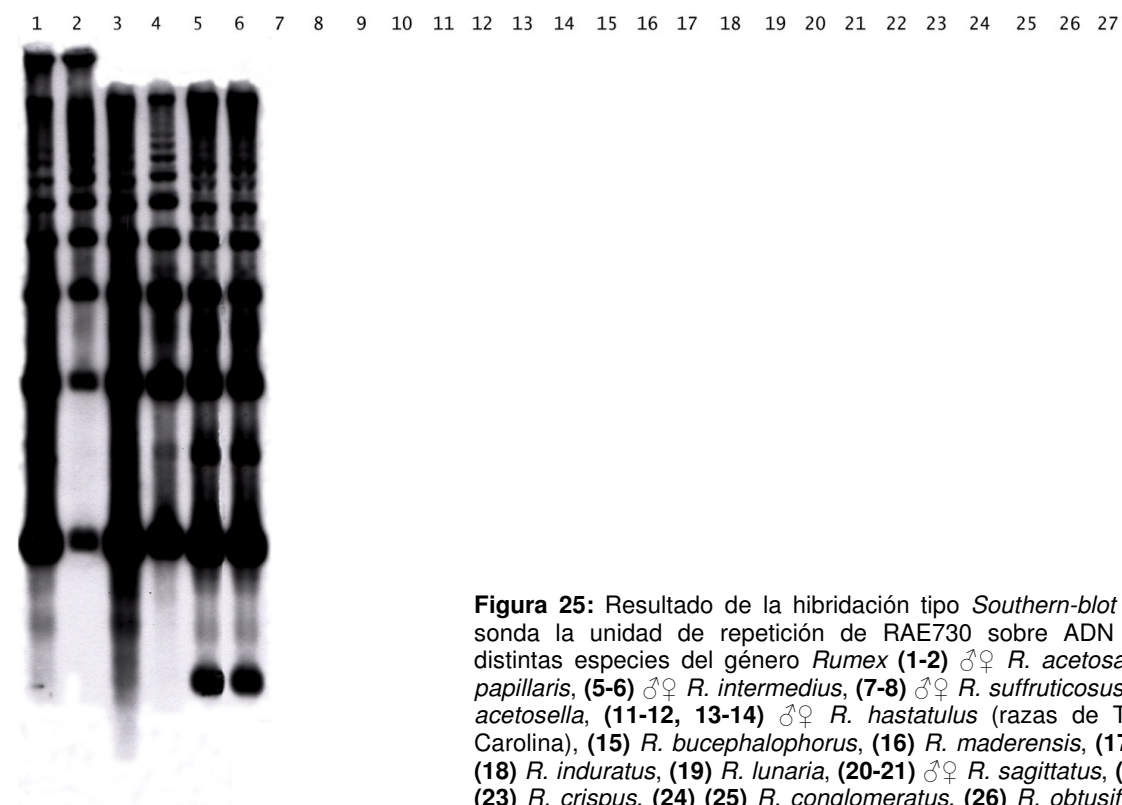
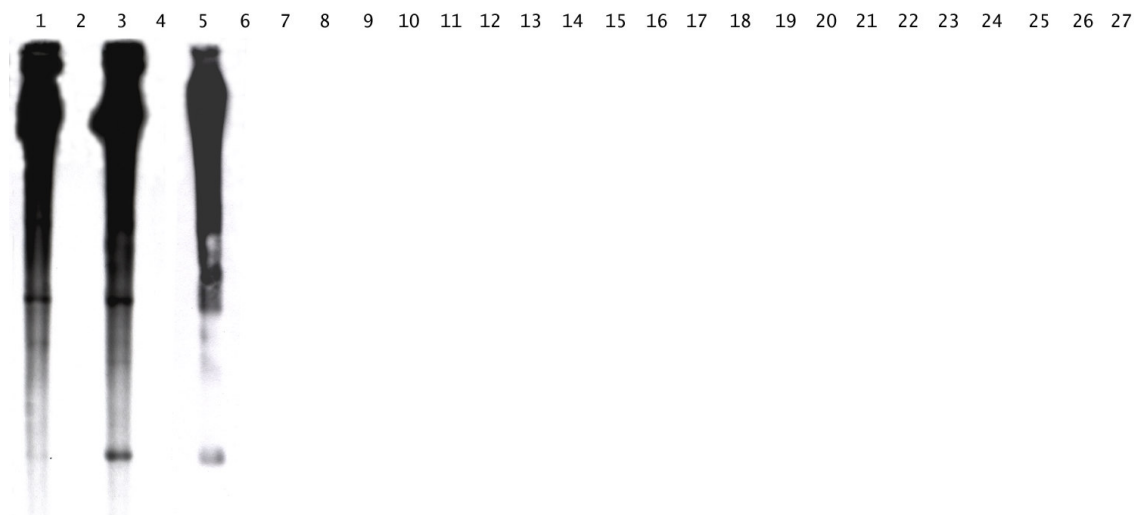


Figura 25: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RAE730 sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex* (1-2) ♂♀ *R. acetosa*, (3-4) ♂♀ *R. papillaris*, (5-6) ♂♀ *R. intermedius*, (7-8) ♂♀ *R. suffruticosus*, (9-10) ♂♀ *R. acetosella*, (11-12, 13-14) ♂♀ *R. hastatulus* (razas de Texas y North Carolina), (15) *R. bucephalophorus*, (16) *R. maderensis*, (17) *R. scutatus*, (18) *R. induratus*, (19) *R. lunaria*, (20-21) ♂♀ *R. sagittatus*, (22) *R. roseus*, (23) *R. crispus*, (24) (25) *R. conglomeratus*, (26) *R. obtusifolius* y (27) *R. patientia*

Figura 26: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RAYSI sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*: (1-2) ♂♀ *R. acetosa*, (3-4) ♂♀ *R. papillaris*, (5-6) ♂♀ *R. intermedius*, (7-8) ♂♀ *R. suffruticosus*, (9-10) ♂♀ *R. acetosella*, (11-12, 13-14) ♂♀ *R. hastatulus* (razas de Texas y North Carolina), (15) *R. bucephalophorus*, (16) *R. maderensis*, (17) *R. scutatus*, (18) *R. induratus*, (19) *R. lunaria*, (20-21) ♂♀ *R. sagittatus*, (22) *R. roseus*, (23) *R. crispus*, (24) (25) *R. conglomeratus*, (26) *R. obtusifolius* y (27) *R. patientia*



ESPECIE/SUBGÉNERO	RAE180		RAYSI		RAE730		RUSI	
	blot	PCR	blot	PCR	blot	PCR	blot	PCR
<i>R. acetosa/Acetosa</i>	●	●	♂●	♂●	●	●	∅	∅
<i>R. papillaris/Acetosa</i>	●	●	♂●	♂●	●	●	∅	∅
<i>R. intermedius/Acetosa</i>	●	●	♂●	♂●	●	●	∅	∅
<i>R. thyrsoides/Acetosa</i>	●	●	♂●	♂●	●	●	∅	∅
<i>R. tuberosus/Acetosa</i>	●	●	♂●	♂●	●	●	∅	∅
<i>R. acetosella/Acetosella</i>	●	●	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. hastatulus (TXR)/Americanae</i>	●	●	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. hastatulus (NCR)/Americanae</i>	●	●	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. suffruticosus/Scutati</i>	●	●	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. paucifolius/Americanae</i>	?	●	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. grammifolius/Acetosella</i>	?	●	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. bucephalophorus/Platypodium</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. scutatus/Scutati</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	●	●
<i>R. induratus/Scutati</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	●	●
<i>R. maderensis/Hastati</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. lunaria/Hastati</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>R. roseus/Scutati</i>	?	∅	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. hastatus/Hastati</i>	?	∅	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. cyprius/Vesicarii</i>	?	∅	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. vesicarius/Vesicarii</i>	?	∅	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. abyssinicus/Afroacetosa</i>	?	∅	?	∅	?	∅	?	∅
<i>R. sagittatus/Afroacetosa</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Subgénero <i>Rumex</i> sp.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Tabla 4: Estatus de presencia-ausencia de los ADNs satélite analizados en esta Memoria: (●) Presencia, (♂●) presencia sólo en machos, (∅) ausencia, (?) cantidad de material insuficiente para experimentos de blot

4.4.4.- Detección de una nueva familia de ADN satélite en *Rumex*.-

El diseño del experimento que se acaba de describir requirió un proceso en el que los ADNs genómicos de las distintas especies fueron analizados por medio de la restricción con distintas enzimas. En este apartado queremos destacar una serie de observaciones interesantes que realizamos en el transcurso de este proceso, y que nos llevaron a la detección de una nueva familia de ADN satélite. Son las que siguen a continuación:

Es destacable, en primer lugar, que la observación de las digestiones en geles teñidos con bromuro de etidio reflejó la presencia de patrones en escalera típicos de secuencias de ADN satélite, en determinadas especies. Así, tanto en *R. acetosa*, como en *R. papillaris* y *R. intermedius*, cuando su ADN genómico era digerido con la enzima EcoRI se observaron bandas prominentes presentes en machos y en hembras que migraban a 180, 360 y 550 pb aproximadamente. Además, estas bandas eran mucho más intensas en machos que en hembras. Adicionalmente, para esta misma enzima y en este mismo grupo de especies era observable una banda adicional correspondiente a 725 pb aproximadamente. Cuando el ADN de *R. acetosa* y *R. papillaris* era digerido con la enzima *Sca I* se observaba una banda específica de machos a aproximadamente 1 kb. Cotejando las fotos de estos geles con las membranas obtenidas tras las hibridaciones tipo *Southern*, comprobamos que estos patrones se correspondían con cada uno de los satélites descritos hasta el momento. Concretamente las bandas múltiplos de 180 pb pertenecían a la familia RAE180, mientras que la banda de 725 pb lo hacía con el satélite RAE730. Por otra parte, comprobamos que la banda específica de machos de 1 kb se correspondía con RAYSI.

Finalmente, es necesario destacar que para el resto de especies empleadas en el estudio, no observamos evidencia de la existencia de patrones en escalera en las digestiones de ADN genómico, salvo para el caso de las especies *R. scutatus* y *R. induratus*. Para éstas, cuando el ADN era digerido con la enzima *Bgl I* era observable un patrón repetitivo de bandas múltiplos de 170 pb. Dado que el ADN genómico de estas dos especies no reveló hibridación positiva con ninguno de los satélites presentes en *R. acetosa*, asumimos que se trataba de una nueva familia de ADN satélite, y procedimos a su aislamiento, clonación y análisis tal y como se describe en el apartado 4.7 de esta misma Memoria.

4.5. Evolución de las tres familias de ADN satélite aisladas en *Rumex acetosa*.-

Una vez establecida la distribución de las tres familias de ADN descritas en *R. acetosa* a lo largo del género *Rumex*, seleccionamos algunas de las especies que consideramos interesantes para realizar estudios evolutivos y aislamos varias unidades monoméricas de los satélites correspondientes en cada caso. Para ello utilizamos nuevamente los juegos de cebadores que

habíamos diseñado específicamente para cada familia (ver apartado 3.3.2.1 y **Tabla 3** de esta Memoria).

4.5.1. Familia de ADN satélite RAE180.-

El análisis de la familia RAE180 es muy interesante desde un punto de vista evolutivo ya que está presente en todas las especies dioicas de origen euroasiático y americano del género *Rumex*. Como consta en el apartado 4.2 de esta Memoria, estas especies tienen un origen común y pueden dividirse en dos subgrupos: uno de ellos incluyendo a las especies con sistemas cromosómicos simples, XX/XY, además de la raza de North Carolina de *R. hastatulus*, y otro grupo con especies de sistemas cromosómicos complejos, XX/XY₁Y₂. Es por ello, que hemos hecho un primer estudio incluyendo especies de los dos grupos por separado tal y como sigue a continuación:

4.5.1.1. Especies con sistema cromosómico complejo XX/XY₁Y₂.-

Rumex papillaris

Un total de 31 unidades monoméricas de RAE180 procedentes de machos de *R. papillaris*, y por ello asumimos que son procedentes de cromosomas Y han sido analizadas en esta Memoria. El tamaño de las secuencias está en torno a los 184 pb, excepto en el caso de los clones PAMP_83B y PAMP_77B, que presentan 168 y 175 pb respectivamente (consecuencia fundamentalmente de dos deleciones de 17 y 9 pb entre las posiciones 87-104 y 17-27 - ver **Apéndice 2**). El contenido medio de AT de estas secuencias es del 70%. El número de sitios polimórficos es 102, por lo que el valor del polimorfismo asciende a 0.554. El valor de la diversidad nucleotídica es 0.170. Un árbol filogenético NJ utilizando el conjunto de las secuencias analizadas no reveló la existencia de clados fuertemente apoyados por valores de bootstrap incluso cuando las secuencias procedían de un mismo clon. La matriz de distancias da un valor medio de variabilidad intraespecífica de 0.203 entre estas secuencias.

Por otro lado, 15 unidades monoméricas de autosomas de esta familia de ADN satélite fueron obtenidas a partir de hembras de *R. papillaris*. De manera similar a lo que ocurría en el caso de las secuencias procedentes de los Y, estas secuencias tienen un tamaño que oscila entre los 182 y 184 pb, y son ricas en AT (67.8%). El número de sitios polimórficos fue en este caso de 87, siendo el valor del polimorfismo de 0.473. La diversidad nucleotídica es, en hembras, 0.139. Nuevamente, una aproximación filogenética de estas secuencias, muestra un árbol NJ sin la existencia de clados fuertemente apoyados por valores de bootstrap. El valor medio de variabilidad intraespecífica es de 0.153.

Considerando las secuencias procedentes de cromosomas Y y autosomas en conjunto, se observa un valor de divergencia medio de 0.210, siendo la distancia entre un grupo de secuencias y otro de 0.219. Entre

secuencias procedentes de cromosomas Ys y de autosomas existen asimismo, unos 80 sitios I a III, ninguno del IV al VI, 13 polimorfismos compartidos y 78 no compartidos. Cuando construimos un árbol filogenético NJ, las secuencias no aparecen agrupadas de manera significativa en función del sexo del que fueron aisladas.

La hibridación *in situ* con secuencias de la familia RAE180, demostró la masiva presencia de esta familia de ADN satélite en los cromosomas Y, al igual que sucedía en la especie tipo *R. acetosa* (**Figura 27**). Concretamente, el cromosoma Y₁ se caracteriza por la presencia de cinco bandas prominentes de RAE180, tres de ellas en el brazo corto y el resto en el largo. El cromosoma Y₂ porta una señal intensa en la zona centromérica y otras tres adicionales en el brazo corto (**Figura 27**). Asimismo, se detectan señales de menor índole repartidas a lo largo de toda la estructura de ambos cromosomas Y (**Figura 27**). Adicionalmente, encontramos que esta familia está representada en forma de un locus puntual en la pareja autosómica I, de manera análoga al caso de *R. acetosa* (**Figura 27**).

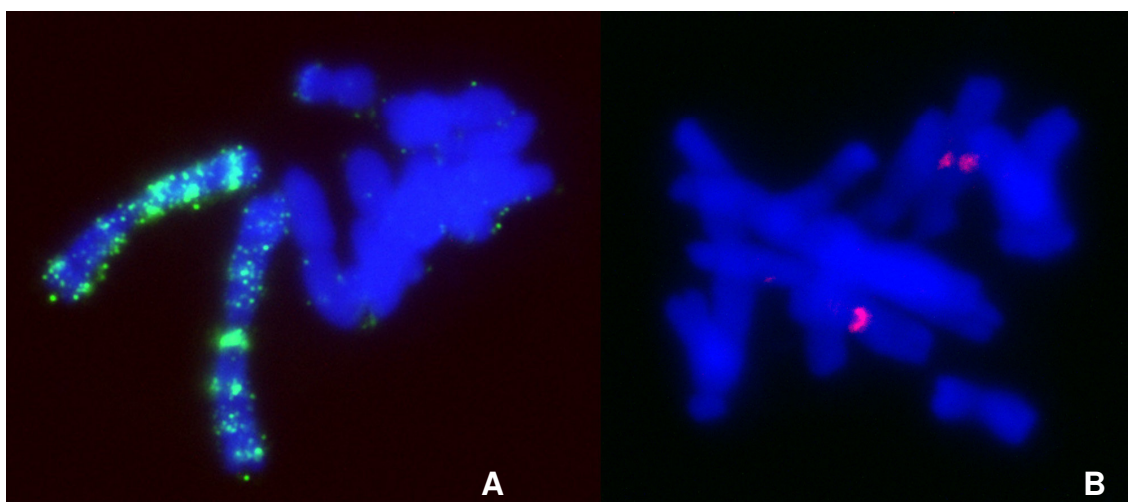


Figura 27: Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*. **(A)** Macho, donde se observa la localización de RAE180 en ambos cromosomas Y. **(B)** Hembra, donde se observa el locus autosómico de RAE180

Rumex intermedius

En el caso de la especie *R. intermedius* se secuenciaron 30 unidades monoméricas procedentes de cromosomas Y, a partir del ADN de individuos macho. Las unidades monoméricas de RAE180 obtenidas se encontraban en torno a los 184 pb de tamaño total. El clon INTM_7B, con 194 pb consecuencia de una inserción entre las posiciones 139 y 148, y el clon INTM_4A, con 163 pb debido a una delección entre las posiciones 137 y 166, son los tamaños extremos encontrados. El contenido en AT es del 73% en este grupo de secuencias. El número de sitios polimórficos es 101, por lo que el valor del polimorfismo supone un valor de 0.549. La diversidad nucleotídica calculada es de 0.167. Utilizando todo el conjunto de secuencias monoméricas hicimos una

aproximación filogenética. El árbol NJ obtenido mostraba nuevamente el conjunto de secuencias sin asociación cladística considerable. Esto era así también para los monómeros adyacentes procedentes de un mismo clon. El valor de divergencia medio es de 0.204.

Considerando secuencias de autosomas aisladas de hembras de esta misma especie, 11 fueron los monómeros de RAE180 obtenidos. Estas repeticiones tienen un tamaño de entre 182 y 185 pb y un contenido en AT del 68.4%. El número de polimorfismos encontrados es 100, siendo el valor del polimorfismo 0.544. La diversidad nucleotídica para estas secuencias es 0.180. El valor de divergencia medio entre las secuencias está en un valor de 0.211.

Al estudiar las secuencias procedentes de autosomas y de cromosomas Y en conjunto, se observa un valor medio de divergencia de 0.205. La distancia entre ambos grupos de secuencias es muy similar, de 0.206. Se detecta, asimismo la presencia de 68 posiciones de I a III, ningún estado de transición entre IV y VI, 29 polimorfismos compartidos y 51 no compartido. Tampoco en el caso de esta especie se observa agrupación cladística significativa entre secuencias procedentes del mismo sexo.

Análisis interespecífico de las secuencias de RAE180 de especies con sistemas complejos.-

Una vez analizadas las secuencias de RAE180 procedentes de las tres especies con sistema XX/X₁Y₂ analizadas, *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*, llevamos a cabo un estudio interespecífico utilizando el total de las secuencias analizadas. Para ello, analizamos comparativamente las secuencias procedentes de cromosomas Y por un lado, y las procedentes de autosomas por otro.

Con respecto a las secuencias procedentes de cromosomas Y, el **Apéndice 2** muestra la figura del alineamiento de las secuencias procedentes de las distintas especies. La distancia media entre todas las secuencias es de 0.219. Considerando la especie de la que fueron aisladas, las distancias medias son: 0.239 entre *R. acetosa* y *R. papillaris*, 0.203 entre *R. acetosa* y *R. intermedius* y 0.240 entre esta última y *R. papillaris*. Por otro lado, la **Tabla 5** muestra un resumen de las distintas posiciones detectadas en los análisis comparativos entre las especies, según el modelo de Strachan (Strachan et al., 1985).

Especies Comparadas	I-III	IV-VI	PC	PNC
<i>R. acetosa/R. papillaris</i>	74	3	20	71
<i>R. acetosa/R. intermedius</i>	42	0	25	72
<i>R. intermedius/R. papillaris</i>	35	0	13	63

Tabla 5: Resumen de las posiciones *Strachan* encontradas en el análisis interespecífico de las secuencias de la familia de ADN satélite RAE180 aisladas a partir de cromosomas Y de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*

Considerando las secuencias de RAE180 procedentes de autosomas aisladas a partir de hembras de las distintas especies obtenemos el alineamiento que aparece en el **Apéndice 3**. La divergencia media entre todas las secuencias es de 0.212. Los cálculos de distancias interespecíficas para este caso son: 0.197 entre *R. acetosa* y *R. papillaris*, 0.233 entre *R. acetosa* y *R. intermedius* y 0.206 entre esta última y *R. papillaris*. Como en el caso de las secuencias obtenidas a partir de machos, la **Tabla resumen 6**, muestra las distintas posiciones detectadas en la comparación de las tres especies.

Especies Comparadas	I-III	IV-VI	PC	PNC
<i>R. acetosa/R. papillaris</i>	72	0	21	76
<i>R. acetosa/R. intermedius</i>	66	0	17	87
<i>R. intermedius/R. papillaris</i>	63	0	19	81

Tabla 6: Resumen de las posiciones *Strachan* encontradas en el análisis interespecífico de las secuencias de la familia de ADN satélite RAE180 aisladas a partir de autosomas de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*

4.5.5.2. Especies con sistema cromosómico simple XX/XY.-

Rumex suffruticosus

Un total de 12 unidades monoméricas procedentes de machos de *R. suffruticosus* se han utilizado en los análisis de esta Memoria. El tamaño de las secuencias se encuentra nuevamente en torno a los 184 pb, así como el contenido en AT, en torno al 70% (68.5%). El número de sitios polimórficos detectados en estas secuencias es 28 y el valor del polimorfismo, por lo tanto, 0.152. La diversidad nucleotídica es 0.042. Al construir un árbol filogenético NJ no observamos asociación cladística significativa entre las secuencias analizadas, incluso cuando éstas eran monómeros adyacentes procedentes de un mismo clon. La matriz de distancias calculada da lugar a un valor de variabilidad intraespecífica medio de 0.043.

Por su parte, 16 unidades monoméricas procedentes de individuos hembra, han sido secuenciadas y analizadas. De manera muy parecida a lo descrito en machos, las secuencias mostraban un tamaño en torno a los 184 pb y una riqueza en AT del 67.5%. El número de sitios polimórficos es 44 y el valor de polimorfismo 0.239. La diversidad nucleotídica es 0.052. Nuevamente, al construir un árbol filogenético NJ con estas secuencias, no observamos la presencia de clados fuertemente apoyados por valores de bootstrap. El valor medio de divergencia entre estas secuencias es 0.054.

Al considerar las secuencias aisladas de machos y hembras en conjunto (**Apéndice 4**), detectamos una divergencia media entre las secuencias muy semejante a la variabilidad existente entre ambos grupos, machos y hembras, 0.051 y 0.052 respectivamente. Asimismo, el número de estados de transición incipientes entre secuencias de ambos sexos, I a III es 167, no presentándose

estados superiores (IV a VI). El número de polimorfismos compartidos es 7, mientras que hay 9 polimorfismos no compartidos. Tampoco observamos en esta especie que las secuencias se agrupen en función del sexo del que fueron aisladas.

Utilizando como sonda los insertos procedente de los clones suff_31 y suf_43, en experimentos de hibridación *in situ* sobre células meióticas masculinas de *R. suffruticosus*, observamos la presencia de una fuerte señal de hibridación positiva en uno de los bivalentes del complemento autosómico (**Figura 28**). (Para el análisis citogenética completo de esta especie, véase el apartado 4.8.1).

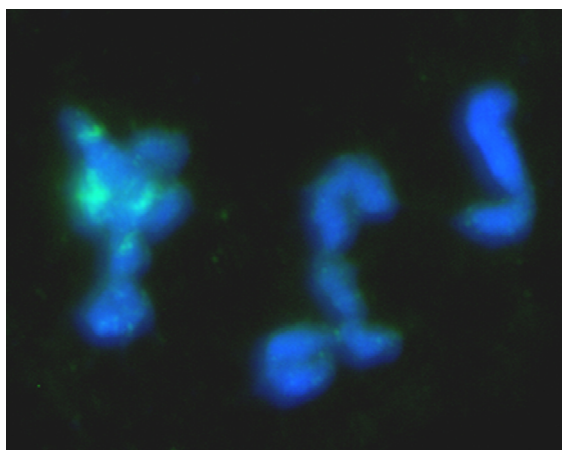


Figura 28: Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE180 sobre cromosomas meióticos de *R. suffruticosus*

Rumex acetosella

En el caso de *R. acetosella*, al llevar a cabo experimentos de PCR utilizando los cebadores específicos para el satélite RAE180, detectamos la presencia de un amplificado discreto de aproximadamente unas 800 pb (**Figura 29**). Dicho amplificado fue purificado y clonado siguiendo los protocolos correspondientes indicados en el capítulo de Material y Métodos de esta Memoria. Estas clonaciones se hicieron considerando machos y hembras por separado.

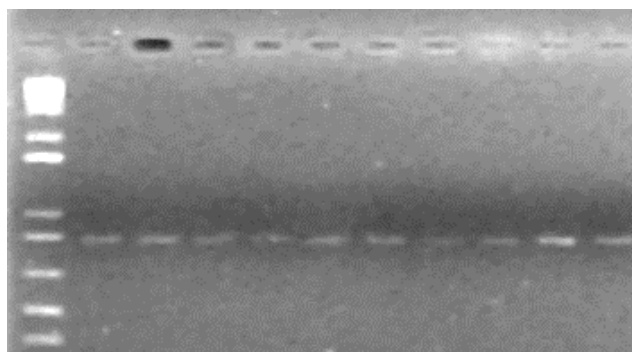


Figura 29: Electroforesis en gel de agarosa del amplificado de PCR de 800 pb correspondiente a la unidad de repetición del ADN satélite RAE180 en *R. acetosella*

Como resultado de las mismas, fueron obtenidos un total de 5 clones procedentes de machos. El tamaño de estos clones estaba comprendido entre los 726 y los 729 pb. El contenido medio de AT de estas secuencias es del 67.6%. Del alineamiento de las secuencias completas de estos clones se deduce la existencia de sólo un total de 12 sitios polimórficos, siendo el valor del polimorfismo 0.0165. La diversidad nucleotídica es también muy reducida, de 0.0089. El árbol filogenético NJ construido no demostró ninguna agrupación cladística digna de mención entre las secuencias analizadas. De hecho, el valor medio de divergencia de estas secuencias es 0.009.

Por otra parte, 8 clones han sido empleados en este análisis procedentes de hembras de *R. acetosella*. Tal y como sucedía en el estudio realizado en machos, las secuencias tienen un tamaño que oscila entre 725 y 729 pb. La riqueza en AT es también de 67.6%. Existen un total de 44 polimorfismos. El valor del polimorfismo es de 0.061 y la diversidad nucleotídica 0.0178. Un nuevo árbol NJ, no muestra afinidades cladísticas considerables entre estas secuencias. La distancia media entre las secuencias es de 0.019, a consecuencia de la presencia de la secuencia RAE725F_21, algo más divergente.

Una vez realizado este primer estudio, consideramos las secuencias tanto de machos como de hembras en global. El alineamiento requirió de una matriz de 731 caracteres en total. La matriz de distancias calculada entonces dio un valor de divergencia medio de 0.015. La distancia media entre secuencias de machos y hembras, tampoco varió significativamente, siendo 0.014. Existen entre los dos sexos 717 estados I a III, mientras que no se detectan estados de transición IV a VI. El número de polimorfismos compartidos es de 6, mientras que sólo existe 1 sitio polimórfico no compartido.

Una simple inspección óptica del alineamiento nos permitió detectar la presencia de una serie de unidades repetitivas. Concretamente, estas unidades repetitivas presentaban un tamaño de entre 75 y 184 pb, y como cabía esperar mostraban una identidad muy elevada con las secuencias de RAE180 de *R. acetosa*, depositadas en la base de datos del EMBL. Un análisis más profundo nos revela que se trata de una serie de secuencias monoméricas RAE180 dispuestas en tándem una detrás de la otra, aunque las secuencias de *R. acetosella* parecen mostrar un tipo de organización superior. Un esquema de la disposición de estas repeticiones monoméricas se muestra en la **Figura 30**. Como puede observarse, la unidad de repetición clonada en el caso de esta especie, consta básicamente de cinco repeticiones de RAE180. Dos de ellas, RACE-B y RACE-C, con 184 pb, están completas, al contrario de lo que ocurre con el resto. RACE-A (75 pb) y RACE-E (88 pb), aparecen incompletas en sus extremos 3' y 5' respectivamente, por las limitaciones de la técnica, ya que son las secuencias monoméricas donde los cebadores han hibridado. En cambio, la repetición RACE-D, con 167 pb, está incompleta a consecuencia de una delección fijada en todos los casos de 41 pb y que está presente en el final de

su secuencia, abarcando gran parte del inicio de la secuencia monomérica de RACE-E (24 de los 41 pb) en su extremo 3' (ver **Figura 30**).

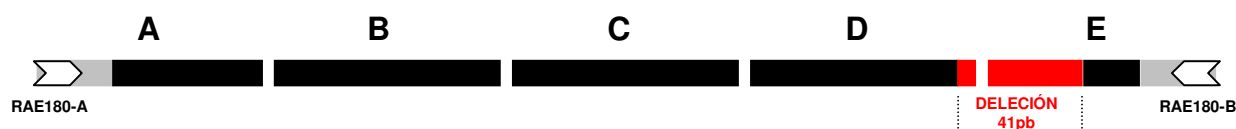


Figura 30: Representación esquemática de la estructura de la unidad de repetición de RAE180 en *R. acetosella*. (A, B, C, D y E) Primer, segundo, tercero, cuarto y quinto monómero, respectivamente

Una aproximación filogenética utilizando este nuevo grupo de secuencias se muestra en el árbol NJ de la **Figura 31**. En él podemos observar la presencia de cinco clados principales, cada uno de ellos correspondiente a cada uno de los monómeros del tándem según su posición, A, B, C, D y E. De este resultado y del hecho de que los amplificadores que se obtienen por PCR son de aproximadamente 800 pb se deduce que los monómeros RAE180 de *R. acetosella* se organizan en una unidad estructural y evolutiva de orden superior que bien podría estar constituida por al menos cinco repeticiones RAE180, aunque las limitaciones de la técnica nos impiden conocer si la magnitud de la supraorganización es mayor.

Considerando entonces estas subrepeticiones que detectamos, obtuvimos 13 unidades monoméricas de cada uno de los cinco monómeros del tándem, RACE-A, RACE-B, RACE-C, RACE-D y RACE-E, obteniendo un total de 65 nuevas unidades. Su alineamiento incluía 185 caracteres y la inclusión de los *gaps* correspondientes, a consecuencia de la existencia de los monómeros incompletos (**Apéndice 5**). De la matriz de distancias obtenida, se calculó un valor de divergencia medio, de 0.057. Los valores de divergencia para cada monómero y entre ellos se muestran en la **Tabla 7**.

	A	B	C	D	E
A					
B	0.057				
C	0.078	0.068			
D	0.059	0.060	0.077		
E	0.058	0.059	0.058	0.091	

Tabla 7: Matriz de valores medios de variabilidad entre los distintos monómeros que constituyen las unidades superiores de RAE180 en *R. acetosella*

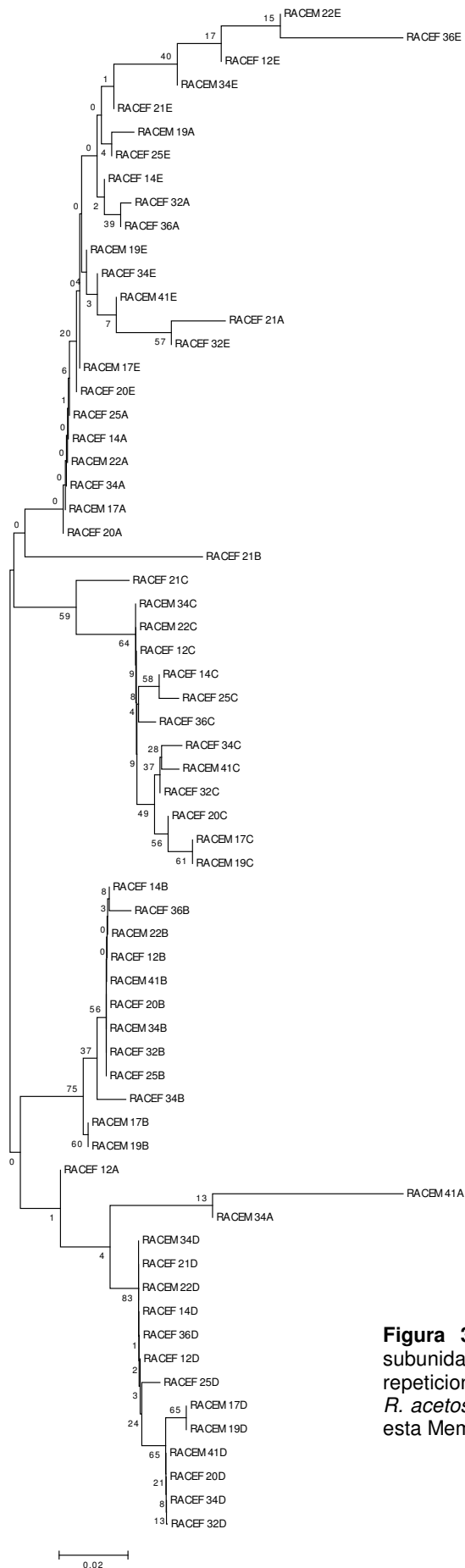


Figura 31: Árbol NJ de todas las subunidades que constituyen las repeticiones de 800 pb de RAE180 de *R. acetosella* que se han analizado en esta Memoria

Al igual que en el caso de *R. suffruticosus*, se ha probado a determinar en esta especie la localización de las secuencias R180 por hibridación *in situ*. Sin embargo, no hemos podido obtener resultados por razones que pueden ser achacables a motivos técnicos relacionados con el tipo de material utilizado (meiosis) y su mayor contracción cromosómica, unido a que el locus o los loci ocupados por estas secuencias en *R. acetosella* sean menores en tamaño que en *R. suffruticosus*.

4.5.2.- Familia de ADN satélite RAE-730.-

Para el análisis molecular de la familia de ADN satélite RAE730 seleccionamos aparte de *R. acetosa*, la especie estrechamente emparentada *R. papillaris*.

Rumex papillaris.-

Un total de 26 unidades monoméricas fueron secuenciadas en el caso de *R. papillaris*. Al igual que lo que observábamos en *R. acetosa*, *R. papillaris* presenta monómeros con tamaños alrededor de los 725 pb. Únicamente, el clon PAP_137, que presenta el principio de su secuencia deletado, con 709 pb presenta un tamaño claramente inferior. El contenido en AT se presenta nuevamente bastante significativo (70.4%), al igual que la presencia de la repetición CAAA. La divergencia intraespecífica media para este grupo de secuencias es de 3.6%. Dado un número de polimorfismos de 160, el valor del polimorfismo es 0.213. La diversidad nucleotídica calculada es 0.034.

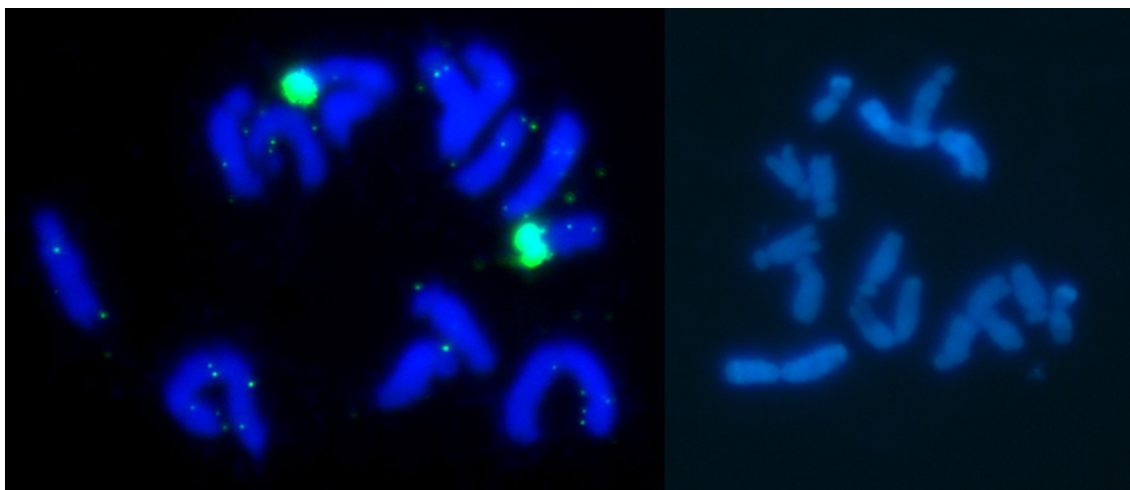


Figura 32: (A) Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAE730 sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris* (B) Cromosomas metafásicos de *R. papillaris* contrateñidos con DAPI (flechas) Segmentos heterocromáticos fijados en el par VI

La familia RAE-730 se encuentra presente en la heterocromatina de dos segmentos heterocromáticos existentes en el par autosómico VI (**Figura 32a**) de forma idéntica a lo que se observaba en *R. acetosa* (ver apartado 4.2.2 de

esta Memoria). El hecho de que estos segmentos supernumerarios sean fuertemente heterocromáticos y DAPI positivos, permite su localización rutinaria y sistemática. De esta forma hemos podido determinar que en todos los individuos analizados de *R. papillaris* pertenecientes a la población de la S^a de Baza, éstos se encontraban fijados en la pareja VI del cariotipo, como sucede en el caso de las poblaciones de S^a Nevada de *R. acetosa* (Ruiz Rejón et al., 1994; datos propios) (**Figura 32b**).

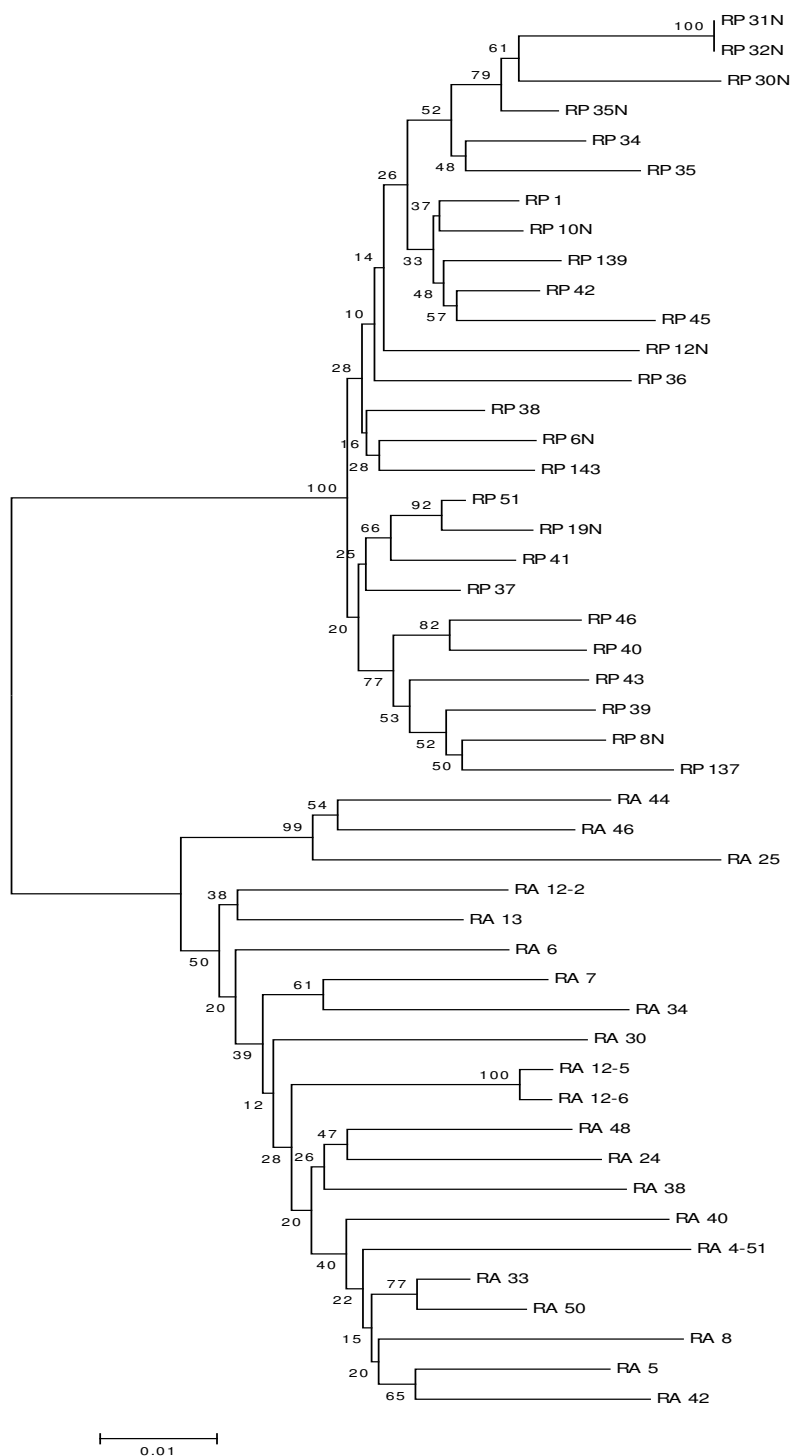


Figura 33: Árbol NJ de todas las secuencias de RAE730 de *R. acetosa* y *R. papillaris* analizadas en esta Memoria. (RP) *R. papillaris*. (RA) *R. acetosa*.

Análisis interespecífico de las secuencias RAE730.-

Con las 47 secuencias totales aisladas de las especies *R. acetosa* y *R. papillaris* (**Apéndice 6**), llevamos a cabo un estudio filogenético. El árbol NJ obtenido se muestra en la **Figura 33**. Este árbol filogenético constaba de dos clados fundamentalmente. En el primero de ellos se agrupaban por afinidad taxonómica las secuencias pertenecientes a la especie *R. papillaris*. El otro clado estaba compuesto por las secuencias RAE730 procedentes de la especie *R. acetosa*.

La divergencia media entre todas las secuencias es de un 8.0%, mientras que la distancia media entre los dos clados era de un 10.2%.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio de los estados de transición según Strachan y col. (1985). Un resumen de los datos obtenidos aparece en la **Tabla 8**. Se puede observar la presencia mayoritaria de posiciones homogenizadas cuando comparamos las secuencias de *R. papillaris* y *R. acetosa*. Es destacable la presencia de algunos estados de transición tipo 6.

Especies Comparadas	I-III	IV-VI	PC	PNC
<i>R. acetosa/R. papillaris</i>	281	47	27	72

Tabla 8: Resumen de las posiciones Strachan encontradas en el análisis interespecífico de las secuencias de la familia de ADN satélite RAE730 aisladas a partir de las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*

4.5.3.- Familia de ADN satélite RAYSI.-

De todas las especies de la sección Acetosa (subgénero Acetosa) en las que detectamos la presencia de la familia de ADN satélite RAYSI mediante hibridación tipo Southern-blot o dot-blot, seleccionamos para un análisis más detallado junto a *R. acetosa*, las especies *R. papillaris* y *R. intermedius*.

En primer lugar, con objeto de comprobar la presencia/ausencia de las dos subfamilias detectadas en *R. acetosa* (RAYS-S y RAYSI-J) (ver apartado 4.3.2) en las otras dos especies, llevamos a cabo experimentos de PCR, empleando los cebadores diseñados para la amplificación específica de cada subfamilia. Concretamente empleamos las tres combinaciones de cebadores posibles, a saber: *RAYSI-A/RAYSI-D* (combinación de cebadores comunes para secuencias RAYSI en general), *RAYSI-J/RAYSI-D* (específicos para la subfamilia J) y *RAYSI-S/RAYSI-D* (específicos para la subfamilia S).

Las tres combinaciones dieron lugar a la amplificación de los productos de PCR esperados (aproximadamente 930 y 460 pb, correspondientes a una unidad monomérica y otra menor) en *R. acetosa*. El mismo resultado

observamos para *R. papillaris* con las combinaciones *RAYSI-A/RAYSI-D* y *RAYSI-J/RAYSI-D*, pero no con *RAYSI-S/RAYSI-D*, para la que no se observó amplificación alguna. *R. intermedius* amplificó de la manera descrita para la combinación de cebadores *RAYSI-A/RAYSI-D*, no observándose amplificación en ninguno de los otros dos casos posibles. Un resumen de este experimento puede verse en la figura **Figura 34**.

De acuerdo con los resultados aquí descritos, se procedió a escindir las bandas correspondientes a las unidades monoméricas de los geles de agarosa y a su posterior aislamiento, clonación y secuenciación, en *R. papillaris* y *R. intermedius*. A continuación se describe el análisis molecular efectuado en cada caso para las secuencias de cada especie.

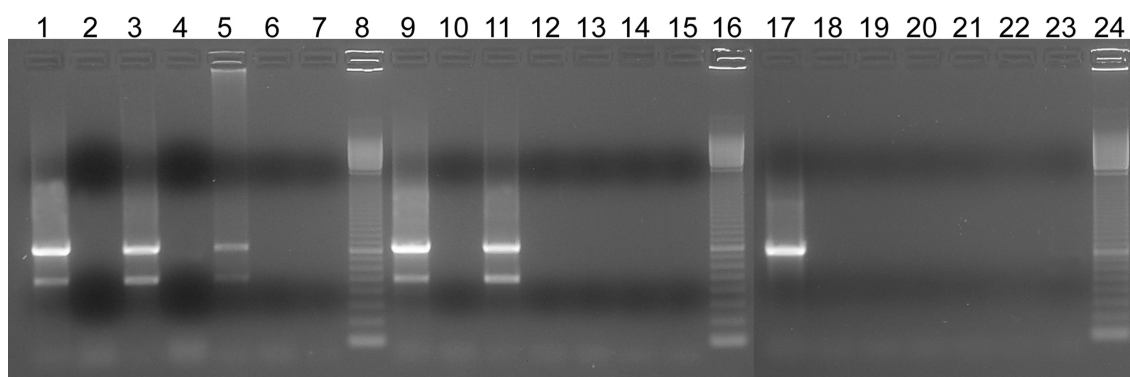


Figura 34: Electroforesis en gel de agarosa en la que se muestran los amplificados de PCR del ADN satélite RAYSI según la combinación de cebadores utilizada en las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*. (1-2/9-10/17-18) ♂-♀ *R. acetosa*. (3-4/11-12/19-20) ♂-♀ *R. papillaris*. (5-6/13-14/21-22) ♂-♀ *R. intermedius*. (7,15 y 23) Controles negativos. (8, 16 y 24) Marcador de peso molecular de 100 pb. (1-8) Cebadores universales. (9-16) Cebadores específicos RAYSI-J. (17-24) Cebadores específicos RAYSI-S

Rumex papillaris.-

Un total de 33 secuencias monoméricas fueron obtenidas de machos de *R. papillaris*. Igual que sucedía con las de *R. acetosa* se trató de secuencias ricas en AT (67.4%) y con tamaños similares, comprendidos en torno a los 924 pb, oscilando entre los 908 pb del clon PAP_26 (consecuencia de una delección entre las posiciones 156 y 174 principalmente) y los 935 pb del clon PAP_4. El número de sitios polimórficos detectados es 344, por lo que el valor del polimorfismo es 0.341. La diversidad nucleotídica, por su parte, es 0.074.

Atendiendo a los sitios diagnósticos caracterizados para cada subfamilia, determinamos que todas las secuencias obtenidas para *R. papillaris* correspondían a la subfamilia RAYSI-J (ver más adelante **Figura 39**). La variabilidad media intraespecífica calculada para este conjunto de secuencias era del 5.4% de diferencias. Un análisis filogenético de las mismas usando el método NJ, dio lugar a un árbol cuya topología no reflejaba la existencia de clados diferenciados (**Figura 35**) como ocurría con las secuencias de *R.*

acetosa. Asimismo, las secuencias RAYSI-J de *R. papillaris* poseen las dos deleciones diagnósticas presentes en las secuencias RAYSI-J de *R. acetosa* entre las posiciones 873-880 y 901-910, respectivamente (ver más adelante **Figura 39**).

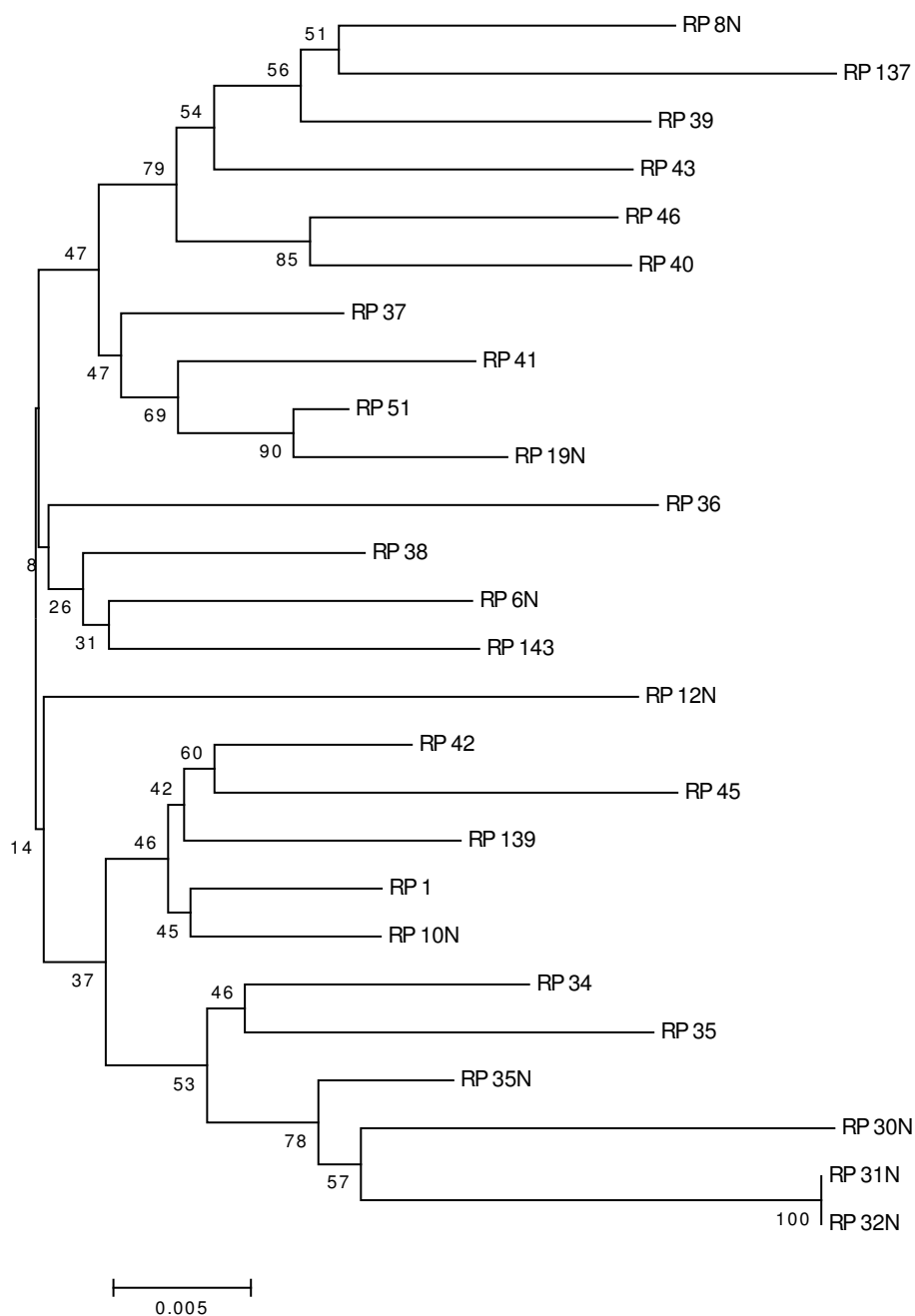
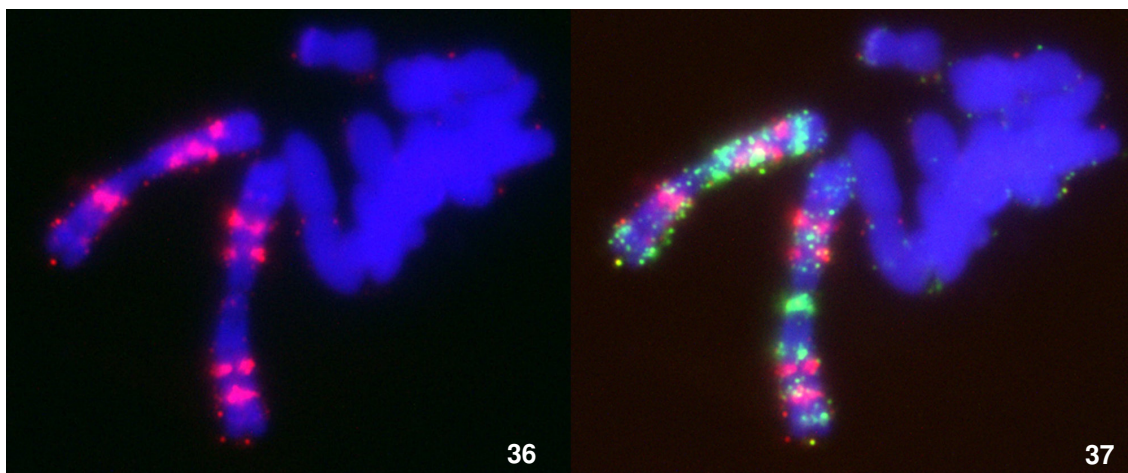


Figura 35: Árbol NJ de todas las secuencias de RAYSI de *R. papillaris* analizadas en esta Memoria

Para localizar *in situ* las secuencias de RAYSI en *R. papillaris* se utilizó como sonda el inserto procedente del clon específico de esta especie, RAYSI PAP_44. La hibridación demuestra que esta secuencia es específica de los cromosomas Y, estando presente tanto en el Y₁ como en el Y₂, y estando ausente en el resto de autosomas. Concretamente en el cromosoma Y₁ se observa un patrón de hibridación caracterizado por la presencia de tres bandas

intensas, dos de ellas presentes en el brazo corto y la otra en el brazo largo (**Figura 36**). Por su parte, en el cromosoma Y_2 destaca un patrón muy semejante, encontrándose dos bandas con señal intensa de hibridación en cada uno de sus brazos (**Figura 36**). Es destacable que este ADN satélite y el RAE180 ocupan en los cromosomas Y loci diferentes (**Figura 37**).



Figuras 36 y 37: (36) Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición RAYSI sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*. (37) Hibridación *in situ* fluorescente doble usando como sondas las unidades de repetición RAE180 (verde) y RAYSI (rojo) sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*

Además, con objeto de descartar la presencia de secuencias de la subfamilia RAYSI-S en *R. papillaris*, realizamos experiencias de hibridación *in situ* doble, utilizando por un lado la sonda específica para esta especie de RAYSI-J (clon PAP_44) y la sonda RAYSI-S aislada a partir de *R. acetosa* (clon ACE_5-10). En ningún caso se detectó la presencia de secuencias de RAYSI-S en los cromosomas de *R. papillaris*.

Rumex intermedius.-

Un total de 25 secuencias fueron obtenidas de machos de *R. intermedius*. De manera similar a lo que sucedía con las anteriores especies, el contenido en AT era alto (67.5%). El tamaño total de las unidades monoméricas se encuentra en torno a los 940 pb, tamaño ligeramente superior que en *R. papillaris* o *R. acetosa*, concretamente oscilando entre los 914 pb del clon INT_45 y los 947 pb del clon INT_35. El número de sitios polimórficos encontrados en este conjunto de secuencias es 309 y, por tanto, el valor del polimorfismo, 0.305. La diversidad nucleotídica calculada es 0.089.

La matriz de distancias demostró un porcentaje medio de diferencias del 16.4% entre todas las secuencias analizadas. Esto se debió a la existencia nuevamente de dos subfamilias tal y como reveló la topología del árbol NJ calculado (**Figura 38**). Considerando, por tanto, las secuencias según su afiliación cladística, el porcentaje intrasubfamiliar fue entonces de 7.0% para una y de 5.4% para la otra subfamilia.

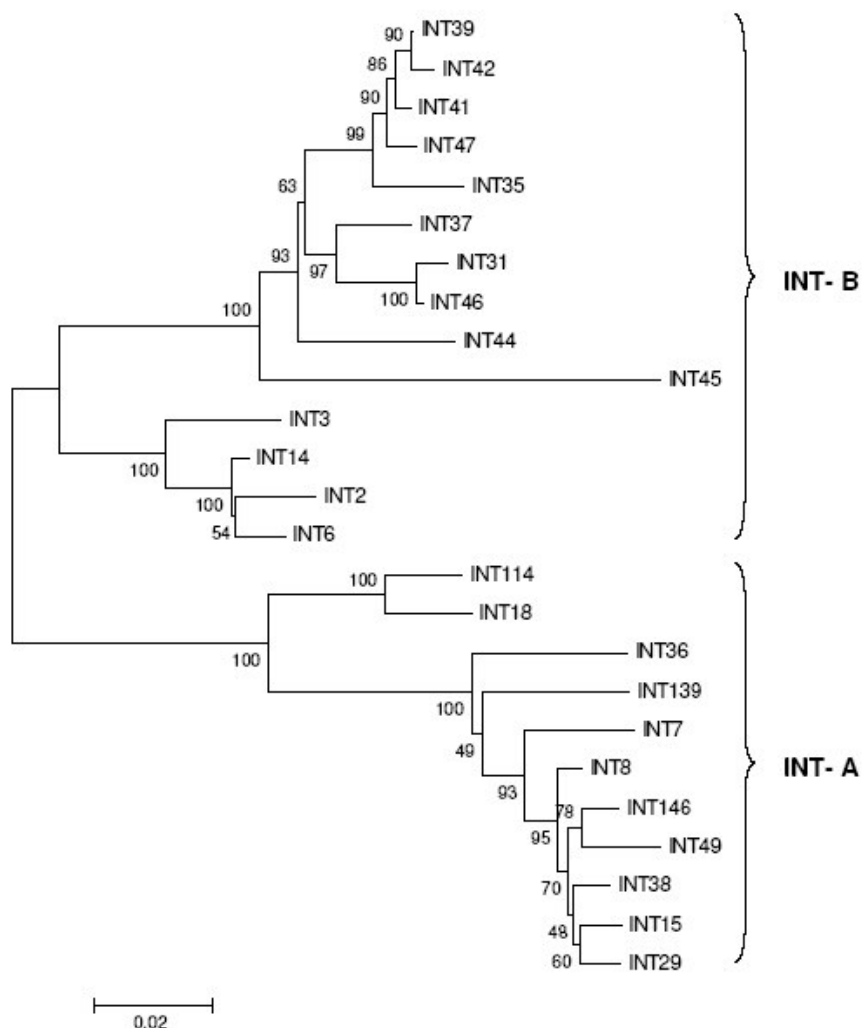


Figura 38: Árbol NJ de las secuencias de RAYSI de *R. intermedius*, indicando la presencia de dos tipos de subfamilia, INT-A e INT-B

Estas dos subfamilias presentaban 30 sitios diagnósticos que las diferenciaban entre ellas (ver más adelante **Figura 39**). Además, como se discutirá a continuación, presentan 83 y 27 sitios que las diferencian tanto de la subfamilia J como de la S. Por ello, consideramos que se trata de nuevas subfamilias y las nombramos como INT-A (11 de las secuencias analizadas) e INT-B (las 14 secuencias restantes) (**Figura 38**).

Notablemente, ninguna de estas dos subfamilias comparten las deleciones diagnósticas de J o de S tal y como aparece en la **Figura 39**, en la que se muestra un alineamiento de las secuencias consenso de cada uno de los tipos de RAYSI encontrados en *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*, de ahí que las secuencias consenso de esta última especie presenten un tamaño mayor que las de las otras dos especies. Para una correcta comparación interespecífica usamos una secuencia consenso de cada una de las subfamilias aisladas en *R. acetosa* y *R. intermedius*, así como la secuencia consenso de *R. papillaris*.

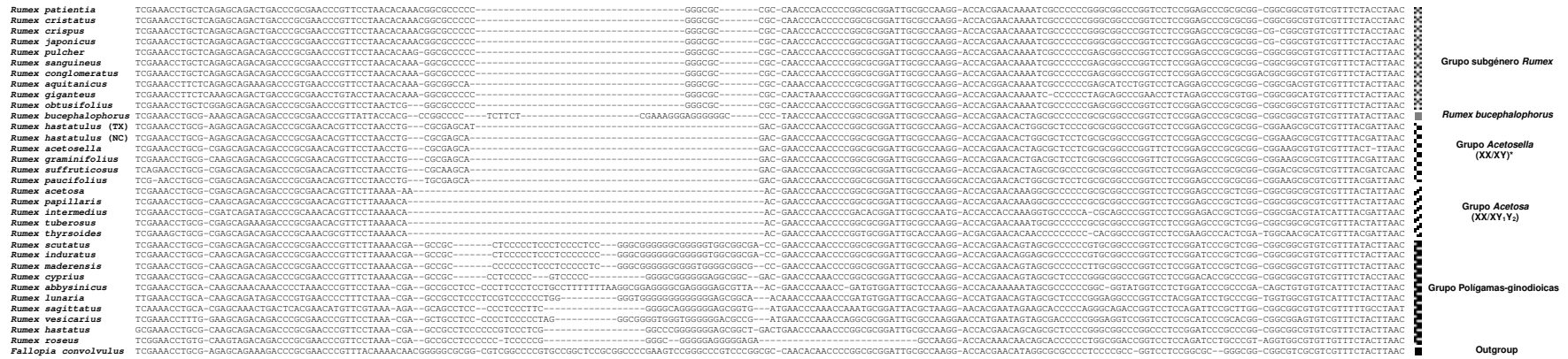


Figura 6: Alineamiento de las secuencias ITS1 mostrando las deleciones diagnósticas

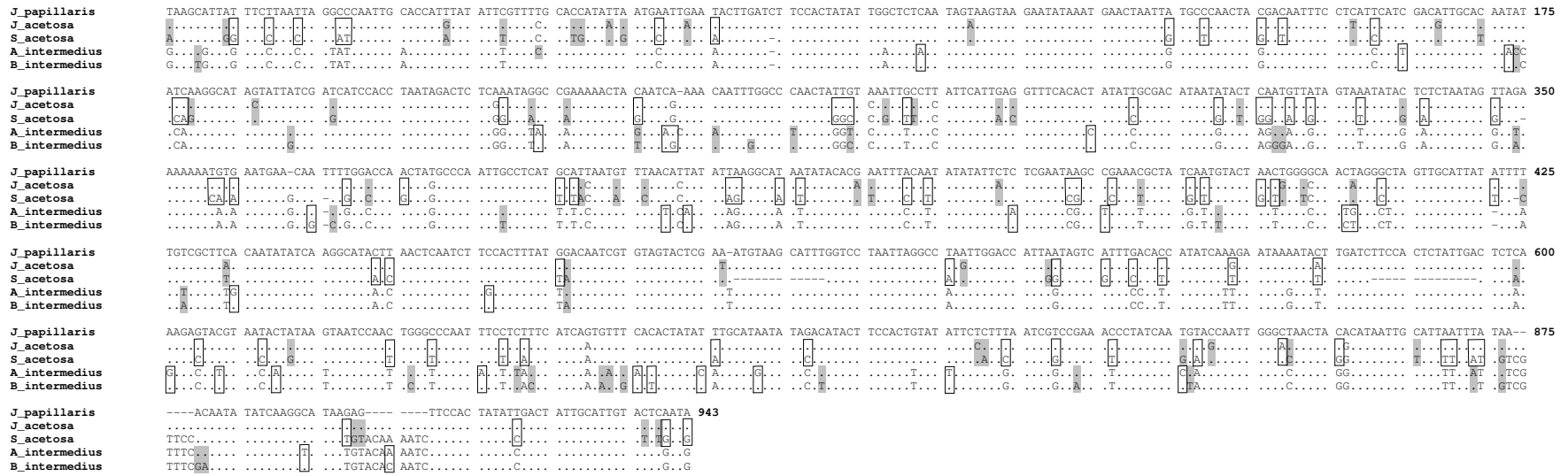


Figura 39: Alineamiento de las secuencias consenso de cada una de los tipos de RAYSI analizados en esta Memoria (RAYSI-J de *R. acetosa* y *R. papillaris*, RAYSI-S de *R. acetosa* e INT-A e INT-B de *R. intermedius*) indicando las posiciones fijadas (cajas) y las posiciones polimórficas (sombreado).

Finalmente, es necesario decir que tanto en el caso de *R. papillaris* como en el de *R. intermedius*, fue posible detectar la presencia de las subrepeticiones de 120 pb de manera análoga a lo que sucedía en *R. acetosa* (**Figura 40**). Asimismo, hemos encontrado la presencia significativa en ambas especies de la subrepetición CAAA (ver **Apéndice 7**).

```

pap678 TATGTAAGCA TTTGGTCCTA ATTAGGCCTT TTTGGACAA TTAATAATCA TTTGACACCA TATCAAGGAA
pap145 ----..... ..ATT..T.. .....CA A..-A..C. ..T...T..G ...TG..... ...T..T..C
int145 ----G...TG ..A.T..... .C...TATCA A..-A..C. ..T...T.TG ...TG..... ...T..T.C.
int678 --..... .. .. ..AA A..-...C. ...G..G... ...CC..T.. ...TT...

pap678 TAAAATACTT GATCTTCCAC TCTATTGACT TTCAA-AG-- AGTACG---- TAATA--CTA T-AAGT--AA
pap145 .TG..... .. .. .A..A.... C...T..TA .TG.A.AATG G..A---GA. CC.GT.AC..
int145 .TG..A.... ..-..... .A..... C...T..TA ...A.AATA ...A.ATGA. GC..T.GGGC
int678 ...G...T.. .. .. .. C-----TA ..AGACTATG ...C.--A.. ..-..T.--..

pap678 TGCAACTGGG CCCAATTTCC TCTTTCATCA ATGTTTCACA CTATAT--TT GCGTAATATA GACATACTTC
pap145 CC-....A.. .. .. .A.G..... .. .. .TAAG ..A..... C..GA.T..A
int145 CC-....A.. .. .. .A...T... .. .. .AGAG ..AA.T.... C..GA.T...
int678 .C...T.C.T T.....T ..AC..... ..A..G..T. ....--A. ..A..... C.T.....

pap678 CACTGTATAT ACICTTTAAT CGTCCGAAAC CCTGTCAATG TACCAATTGG GCTAACTACG CATAATTGCA
pap145 ..A.AC.... T....CG... AAG..A...G G..A..... ..T..C... ..C.....A. GC..G....
int145 ..T.A.... T....CG... ..G.....T G..A.G.T.T ..T..... ..C.....G. .T..G....
int678 ....T.... T....G... ..G..A...T ...A.....T A..... ..C.....G. ....

pap678 TTA-ATTTAT AAA-----C AATATATCAA GGCATA---- ----AGAGTT CCACTATATT GACTATTGCA
pap145 ...T...T. GTCGCTTCG. ....A.. .. ..CTTA ACTC.ATC.. .T...T...G ...A..C.TG
int145 ...T-..... G.CGCTTTA. .... .. ..ATCA ACTC.ATC.. .. ..T.... A..A..C.TG
int678 ..TT-...T. GTCGTTTCGA. .... .. ..ATGT ACAC.ATC.. .....C .....

pap678 TTGTAAGCA ATA
pap145 .A.....G. ---
int145 .A.....G. ...
int678 .....G. ..G

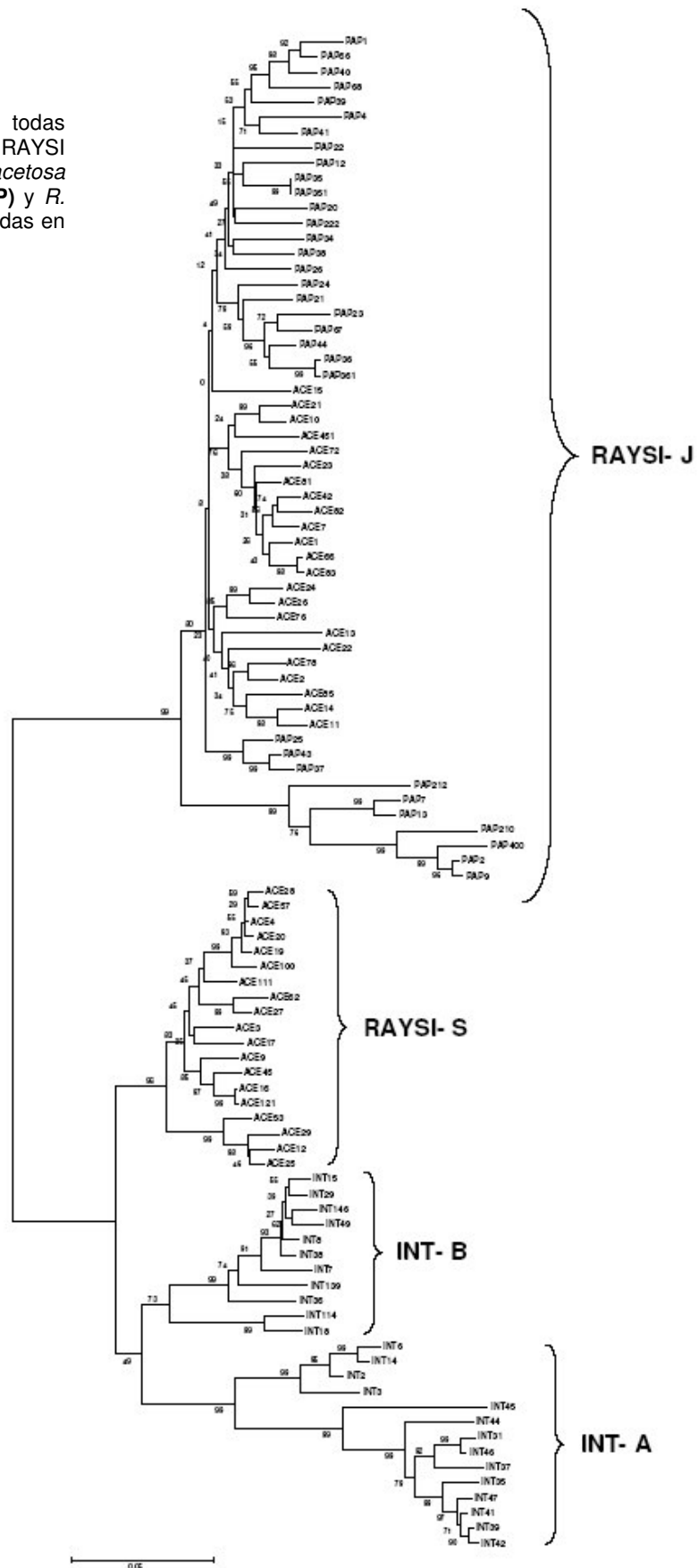
```

Figura 40: Alineamiento de las subunidades de 120 pb de RAYSI en las especies *R. papillaris* (**pap**) y *R. intermedius* (**int**)

Análisis interespecífico de las secuencias RAYSI.-

Usando todo el conjunto de secuencias de RAYSI procedentes de cada una de las especies analizadas, *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius* (**Apéndice 7**), llevamos a cabo un estudio filogenético. El árbol NJ generado demuestra la existencia de dos clados principales apoyados por el 100% de las réplicas de bootstrap (**Figura 41**): uno de ellos incluye las secuencias RAYSI-J de *R. acetosa* y *R. papillaris* mientras que el otro comprende las secuencias RAYSI-S de *R. acetosa* y todas las secuencias de *R. intermedius*. Dentro del clado de RAYSI-J, las secuencias de *R. acetosa* y *R. papillaris* no se agrupan por afinidad taxonómica. Sin embargo, en el segundo clado se observan tres subclados bien diferenciados: por un lado las secuencias RAYSI-S de *R. acetosa* y, por el otro, las secuencias de *R. intermedius* separadas en dos grupos de secuencias, esto es, INT-A e INT-B.

Figura 41: Árbol NJ de todas las secuencias de RAYSI procedentes de *R. acetosa* (ACE), *R. papillaris* (PAP) y *R. intermedius* (INT) analizadas en esta Memoria



Un estudio comparativo de las secuencias de las tres especies, nos demuestra cómo los valores de divergencia de las secuencias de una misma subfamilia, oscilan entre un 8% y un 13%, como se calcula de las comparaciones de las secuencias RAYSI-J de *R. acetosa* y *R. papillaris* y de la comparación de las secuencias RAYSI-S de *R. acetosa* y *R. intermedius*, respectivamente. Por el contrario, al comparar secuencias de distintas subfamilias obtenemos valores de divergencia más elevados, en torno al 25%, como calculamos de las comparaciones entre las subfamilias RAYSI-S y RAYSI-J en las distintas especies.

4.6.- Tasas evolutivas de las tres familias de ADN satélite RAE180, RAE730 y RAYSI-

Hemos llevado a cabo un estudio evolutivo de las secuencias monoméricas pertenecientes a las distintas familias de ADN satélite descritas inicialmente en *R. acetosa*, **RAE180**, **RAE730** y **RAYSI**. Pretendemos con esta aproximación, analizar si la evolución que siguen las secuencias de ADN satélite cuando están en cromosomas que, como en el caso de los cromosomas Y, no recombinan, es distinta con respecto a la que siguen los que se encuentran en autosomas, que sí lo hacen. Las especies de la sección Acetosa (subgénero Acetosa) suponen un modelo ideal para este tipo de ensayos, ya que contamos con secuencias de ADN satélite relacionadas con los cromosomas Y (que en el sistema complejo que constituyen, XX/XY₁Y₂, no aparean entre sí), así como otras específicas de autosomas. Para ello, junto con las secuencias obtenidas para la especie *R. acetosa*, utilizamos las secuencias aisladas de las tres familias de ADN satélite en la especie, también dioica y estrechamente relacionada, *R. papillaris*.

Dado que en esta Memoria describimos por primera vez la presencia de estos tres satélites en la especie *R. papillaris* fue necesario comprobar su localización cromosómica, ya que de otra manera las comparaciones que nos habíamos propuesto no serían correctas. Como se ha descrito en los apartados anteriores, la localización de los distintos satélites en *R. papillaris* y *R. acetosa* es similar en todos los casos.

Una vez comprobada la localización cromosómica procedimos al diseño del experimento. Para ello, seleccionamos varios individuos de cada especie y analizamos varios monómeros de cada uno de ellos.

Para el análisis de la evolución de secuencias repetidas en los cromosomas Y, hemos comparado las secuencias de la familia RAYSI, por un lado, y las secuencias RAE180 procedentes únicamente de machos (que asumimos provienen de los cromosomas Y), por otro. En el caso de la familia RAYSI se compararon las secuencias RAYSI-J dado que en *R. papillaris* sólo detectamos la presencia de esta subfamilia. Con respecto al análisis de las secuencias de autosomas, hemos estudiado comparativamente, las secuencias RAE730 de ambas especies.

Para cada uno de los tres satélites encontramos valores de variabilidad similares dentro de individuos y entre individuos de una misma especie. En el caso de la familia RAE180, donde algunos de los clones secuenciados contenían varios monómeros adyacentes, los niveles de variación detectados entre monómeros contiguos y no contiguos eran también equiparables.

La **Tabla 9** contiene un resumen de los datos de variabilidad inter e intraespecífica para las tres familias de ADN satélite analizadas. Comparada con la divergencia interespecífica, la variabilidad intraespecífica observada para los satélites relacionados con los cromosomas Y, RAYSI-J y RAE180, es mucho mayor en comparación con lo observado para las secuencias autosómicas de RAE730. De hecho, un estudio filogenético de las secuencias de ambas especies para cada familia de ADN satélite refleja, en el caso de los satélites relacionados con los cromosomas Y, árboles en cuya topología no se observa la separación de las secuencias en clados distintos según la especie de la que proceden (**Figuras 42 y 43**). Por el contrario, la topología del árbol NJ obtenido a partir de las secuencias RAE730 obtenidas de *R. acetosa* y *R. papillaris*, demuestra la existencia de dos clados apoyados por valores de bootstrap altos (100% de las réplicas), correspondientes a las secuencias de una y otra especie (**Figura 33**).

ADN Satélite	Variabilidad ace/pap	Divergencia ace/pap
RAE730	0.055/0.036	0.099
RAYSI-J	0.048/0.054	0.063
RAE180	0.195/0.203	0.228

Tabla 9: Tabla resumen del análisis comparativo de las tasas de evolución de RAE180, RAE730 y RAYSI, considerando los polimorfismos compartidos

Por lo tanto, al contrario de lo que ocurre en RAE730, encontramos en los satélites RAYSI-J y RAE180, distancias intraespecíficas medias altas (más en el caso de RAE180) y significativamente similares a las medias interespecíficas (**Tabla 9**). Gran parte de esta variación estimada en primera instancia podría ser explicada considerándola variación ancestral, pero no auténtica divergencia. Por ello, identificamos los polimorfismos compartidos existentes entre las dos especies comparadas para cada uno de los satélites. Estos polimorfismos compartidos fueron considerados reflejo de una variación ancestral, anterior a la divergencia de *R. acetosa* y *R. papillaris*, y por consiguiente, eliminados de los alineamientos y no considerados para el resto de cálculos de tasas y distancias genéticas. Por el contrario, los polimorfismos no compartidos son autapomorfías que representan distintos estados transicionales en el proceso de homogeneización intraespecífica y divergencia interespecífica, y por ello, considerados para el análisis.

Figura 42: Árbol NJ de todas las secuencias analizadas en esta Memoria de RAE180 de cromosomas Y aisladas de *R. acetosa* (RA) y *R. papillaris* (PAP)

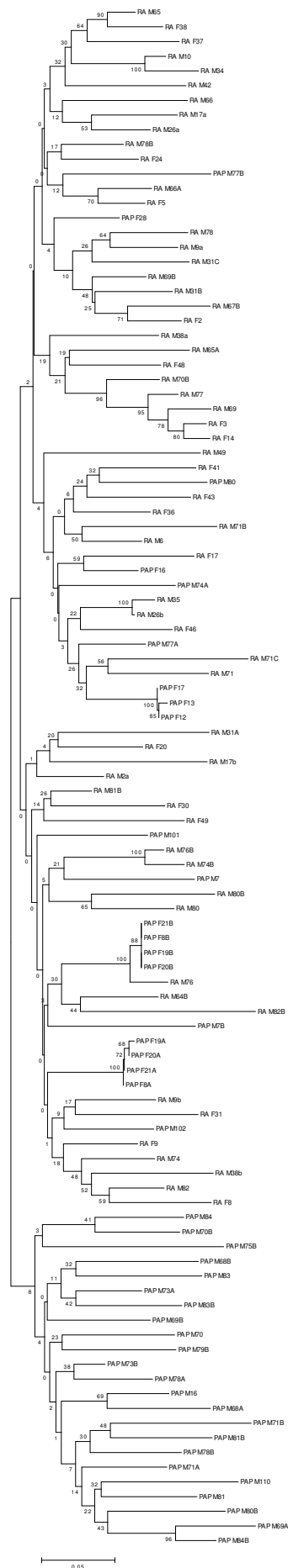
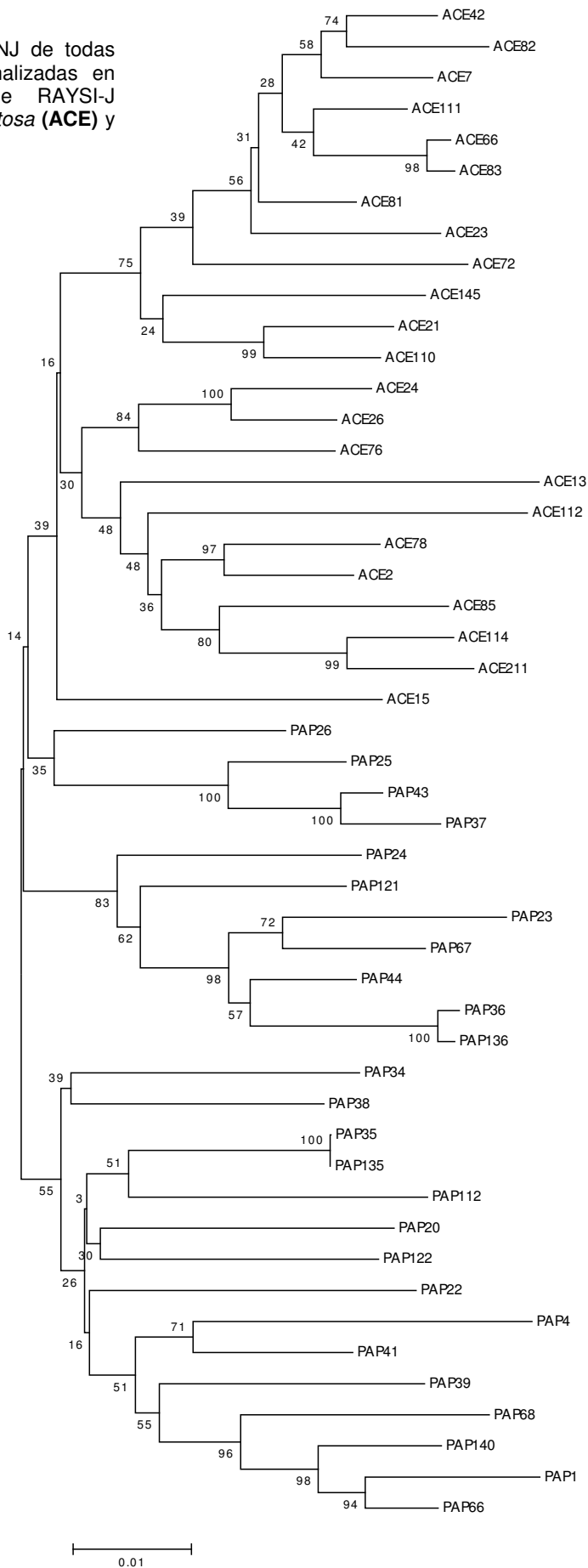


Figura 43: Árbol NJ de todas las secuencias analizadas en esta Memoria de RAYSI-J aisladas de *R. acetosa* (**ACE**) y *R. papillaris* (**PAP**)



Una vez realizadas estas consideraciones, se llevó a cabo el cálculo de las distancias Jukes-Cantor (J_{cd}), para posteriormente estimar la tasa de cambio (que considera *mutación + homogenización + fijación*).

Los resultados se resumen en la **Tabla 10**. Como puede observarse, la divergencia media entre *R. acetosa* y *R. papillaris* para la familia de ADN satélite RAE730 es del orden de 2 a 3 veces superior que la divergencia intraespecífica. Por su parte, la relación entre variabilidad intraespecífica y divergencia interespecífica entre las dos especies para las otras dos familias, RAYSI-J y RAE180, es ligeramente inferior (en torno al 0.7%). Asimismo, la **Tabla 10** muestra el cálculo de las tasas de cambio de cada satélite. Estas tasas de cambio han sido calculadas teniendo en cuenta un tiempo de divergencia, a partir de un ancestral común, estimado para las dos especies en unos 2 millones de años. Esta divergencia la dedujimos a partir de los datos obtenidos mediante el análisis de secuencias de espaciadores intergénicos de genes ribosómicos, ITSs (ver apartado 4.2 de esta Memoria). La tasa evolutiva obtenida para RAE730 es dos veces superior a las tasas de cambio calculadas para las secuencias de los otros dos satélites, RAYSI-J y RAE180 (**Tabla 10**).

ADN Satélite	Variabilidad ace/pap	Divergencia ace/pap	Tasa Evolutiva	Sitios I-III	Sitios IV-VI
RAE730	0.046/0.029	0.088	$22,00 \times 10^{-9}$	281	47
RAYSI-J	0.037/0.042	0.047	$11,74 \times 10^{-9}$	407	3
RAE180	0.036/0.037	0.045	$11,25 \times 10^{-9}$	74	3

Tabla 10: Tabla resumen del análisis comparativo de las tasas de evolución de RAE180, RAE730 y RAYSI, eliminando los polimorfismos compartidos

Por último, un estudio detallado posición a posición de los diferentes estadios del proceso de evolución concertada (Strachan et al., 1985) reveló que, mientras que para las secuencias de RAE730, un gran porcentaje de las posiciones estaban completa o casi completamente homogenizadas (estados de transición 4 y 5 de acuerdo con Strachan et al., 1985), para RAYSI-J y RAE180, la mayoría de los sitios polimórficos divergentes se encontraban en estadios iniciales del proceso de homogenización (estados 2 y 3), presentando un número muy reducido de posiciones homogenizadas (**Tabla 11**).

Adicionalmente, llevamos a cabo un estudio de las secuencias de RAE180 de autosomas, aislados para ello de hembras de las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*, con objeto de analizar el comportamiento de estas secuencias presentes en un locus autosómico puntual. Un primer análisis revela la existencia de una alta variabilidad en las mismas, más significativa en

el caso de *R. acetosa*. Concretamente, estos valores medios son de 0.232 y 0.153, para *R. acetosa* y *R. papillaris*, respectivamente, mientras que la distancia media interespecífica es 0.197. De manera análoga a como se había procedido en los casos anteriores, detectamos y descartamos para el análisis un total de 62 polimorfismos compartidos entre las secuencias de las dos especies. Hecho esto, los valores medios de divergencia son de 0.035 y 0.079, para *R. acetosa* y *R. papillaris*, siendo la divergencia interespecífica media de 0.062. A partir de estos valores, se calcula una tasa de cambio para estas secuencias de 15×10^{-9} por sitio y año, similar a la observada para las secuencias RAYSI y RAE180 presentes en los cromosomas Y.

Es importante destacar nuevamente en este punto, que en esta Memoria hemos realizado un estudio comparativo entre las secuencias procedentes de cromosomas Y y autosomas en las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*. En conjunto, se observan valores de divergencia medios altos entre ambos tipos de secuencias (0.209 y 0.219, respectivamente). Asimismo, mayoritariamente se observa la presencia de estados de transición incipientes I a III (40 y 80, respectivamente) y la ausencia de estados del IV al VI. El número de polimorfismos compartidos es por su parte 42 y 13 y el de polimorfismos no compartidos 80 y 78, respectivamente para cada especie. Todos estos datos, como se discutirá más adelante, confirman la ausencia de intercambio entre las secuencias RAE180 de los autosomas y las de los cromosomas Ys, así como su diferenciación inicial (ralentizada por la propia ausencia de recombinación intracromosómica). Estos datos representan una prueba indirecta de que las secuencias aisladas a partir de machos pueden ser consideradas provenientes de los cromosomas Y.

4.7. Aislamiento, clonación y caracterización de la familia de ADN satélite RUSI.-

Digiriendo ADNs genómicos de las distintas especies de *Rumex* con una batería de enzimas de restricción de manera sistemática detectamos el típico patrón en escalera característico de una familia de ADN satélite, en las especies *R. induratus* y *R. scutatus* y para la enzima *Bgl I*, tal y como ha quedado dicho en el apartado 4.5 de esta Memoria.

Con objeto de aislar, clonar y analizar en profundidad estas secuencias, 10 µg de ADN genómico total de cada una de estas especies fue digerido con la enzima *Bgl I*. Al someter a una electroforesis en gel de agarosa estas digestiones, eran observables una serie de bandas que migraban aproximadamente a 170 y 340 pb.

Asumiendo que se trataba de unidades multiméricas de una repetición de unos 170 pb, procedimos a aislarlas de los geles de agarosa y a purificarlas.

Estas bandas fueron ligadas en el vector pUC19 y clonadas usando la cepa bacteriana competente DH5- α de *E. coli* (ver apartado 3.3.1 de Material y Métodos). Este proceso se realizó separadamente para *R. induratus* y para *R. scutatus*.

De cada clonación se obtuvieron distintos clones recombinantes que fueron secuenciados. Obtuvimos secuencias pertenecientes a los dos tamaños clonados, concretamente de 170 y 340 pb. El análisis de estas secuencias reveló que todas ellas pertenecían a una misma familia ADN y que existía un motivo de unos 170 pb que se encontraba repetido en tándem. Por tanto, las secuencias de 170 pb se correspondían con una unidad monomérica y las de 340 pb se corresponden con un dímero. Asimismo, las secuencias de una y otra especie presentaban una identidad significativa.

La existencia de repeticiones internas de aproximadamente 170 pb, así como la existencia de un patrón de restricción en escalera para la enzima *Bgl I*, nos indica que esta secuencia podría ser una familia de ADN satélite. Para corroborar este supuesto el ADN genómico total de varios individuos de *R. induratus* y *R. scutatus* fue sometido a digestiones con distintas enzimas de restricción y transferido posteriormente a membranas de nylon. Sobre esta membrana llevamos a cabo hibridaciones tipo Southern-blot, utilizando como sonda parte del ADN purificado que se empleó en la ligación. El resultado de estas hibridaciones se muestra en la **Figura 44**. Concretamente en este ensayo utilizamos las enzimas de restricción *EcoRI*, *Hind III*, *Dra I* y *Bcl I*. En ambas especies observamos un patrón en escalera tipo B en las restricciones con la enzima *EcoRI*, así como un patrón típico en escalera A con el resto de restrictasas (**Figura 44**).

La secuencia nucleotídica de estos clones fue contrastada con el resto de secuencias existentes en la base de datos del EMBL. Las secuencias que nosotros aislamos no mostraron identidad significativa en ningún caso con ninguna de las secuencias depositadas. Asumimos, por lo tanto, que se trata de secuencias pertenecientes a una nueva familia de ADN satélite descrita aquí por primera vez, y que nosotros nombramos como **RUSI (RUMex Induratus Scutatus)**.

En este momento, para facilitar el aislamiento rutinario de secuencias monoméricas de esta nueva familia de ADN satélite, diseñamos unos cebadores específicos para *R. induratus* y *R. scutatus* (ver apartado 3.3.2 del capítulo de Material y Métodos de esta Memoria). Los experimentos de PCR utilizando estos cebadores con las especies citadas dieron lugar a la notable amplificación de unidades monoméricas y diméricas (**Figura 45**).

Es notable que mediante PCR y usando esta pareja de cebadores específicos, no encontramos indicios de amplificación de esta secuencia en

ninguna de las especies de *Rumex* analizadas en esta Memoria, excepto en *R. induratus* y *R. scutatus*. Asimismo, se llevaron a cabo experimentos de hibridación tipo Southern-blot utilizando como sonda la secuencia de RUSI sobre la membrana con varias especies de *Rumex* empleada en el apartado 4.5 de esta Memoria. Los resultados obtenidos son coherentes con los de PCR, mostrándose este satélite presente sólo en *R. induratus* y *R. scutatus* (**Figura 46**).

Un total de 16 secuencias monoméricas fueron analizadas en la especie *R. induratus*. El tamaño de sus secuencias se encuentra comprendido entre los 167 y los 171 pb, con la excepción del clon Ri_17, que tiene 182 pb. El contenido medio en AT es de un 73.7%. Se han detectado 83 sitios polimórficos, por lo que el valor del polimorfismo es 0.485. La diversidad nucleotídica de las unidades de repetición de RUSI en *R. induratus* es 0.145. El construir un árbol filogenético NJ, no observamos una asociación cladística significativa entre las unidades monoméricas analizadas, incluso cuando éstas habían sido aisladas de un mismo clon. La matriz de distancias da lugar a un valor medio de divergencia entre estas secuencias de 0.165.

En el caso de la especie *R. scutatus*, 5 fueron los monómeros analizados. Éstos están comprendidos entre los 169 y 172 pb en cuanto a tamaño se refiere, y presentan una riqueza en AT del 74%. Existe un total de 16 sitios polimórficos en el alineamiento de este conjunto de secuencias. El valor del polimorfismo es, por tanto, de 0.094, mientras que la diversidad nucleotídica es 0.043. Un árbol NJ construido a partir de estas secuencias, no revela la existencia de clados fuertemente apoyados por valores de bootstrap. La matriz de distancias arroja un valor medio de divergencia de 0.045.

Utilizando el clon RI_19 como sonda, llevamos a cabo experimentos de hibridación *in situ* sobre células metafásicas de *R. induratus*. Concretamente utilizamos material procedente de la localidad de Padul, Granada (ver **Tabla 2**), cuyo nivel de ploidía es $2n=28$. Como se puede apreciar en la **Figura 47**, la señal de hibridación se encuentra distribuida a lo largo de la mayor parte de los cromosomas, en su zona telomérica. Asimismo, es destacable la presencia de señales de hibridación intensas en los centrómeros de algunos de los cromosomas (**Figura 47**).

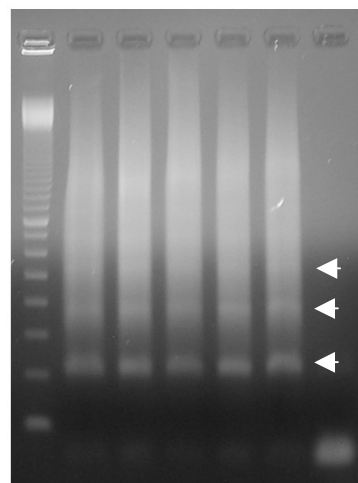
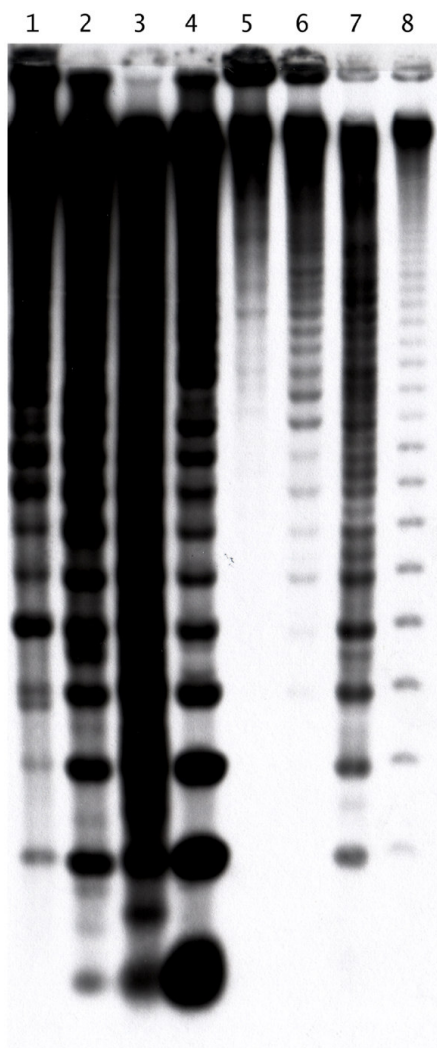


Figura 45: Electroforesis en gel de agarosa de los distintos amplificados de PCR de las secuencias del ADN satélite RUSI en *R. induratus* y *R. scutatus*, (flechas) unidades monoméricas, diméricas y triméricas

◀ **Figura 44:** Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RUSI sobre ADN genómico *R. scutatus* (1-4) y *R. induratus* (5-8), digerido con distintas enzimas de restricción (calle 1; *EcoRI*, 2; *Hind III*, 3; *Dra I*, 4; *Bcl I*)



Figura 46: Resultado de la hibridación tipo *Southern-blot* usando como sonda la unidad de repetición de RUSI sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*: (1-2) ♂♀ *R. acetosa*, (3-4) ♂♀ *R. papillaris*, (5-6) ♂♀ *R. intermedius*, (7-8) ♂♀ *R. suffruticosus*, (9-10) ♂♀ *R. acetosella*, (11-12, 13-14) ♂♀ *R. hastatulus* (razas de Texas y North Carolina), (15) *R. bucephalophorus*, (16) *R. maderensis*, (17) *R. scutatus*, (18) *R. induratus*, (19) *R. lunaria*, (20-21) ♂♀ *R. sagittatus*, (22) *R. roseus*, (23) *R. crispus*, (24) (25) *R. conglomeratus*, (26) *R. obtusifolius* y (27) *R. patientia*

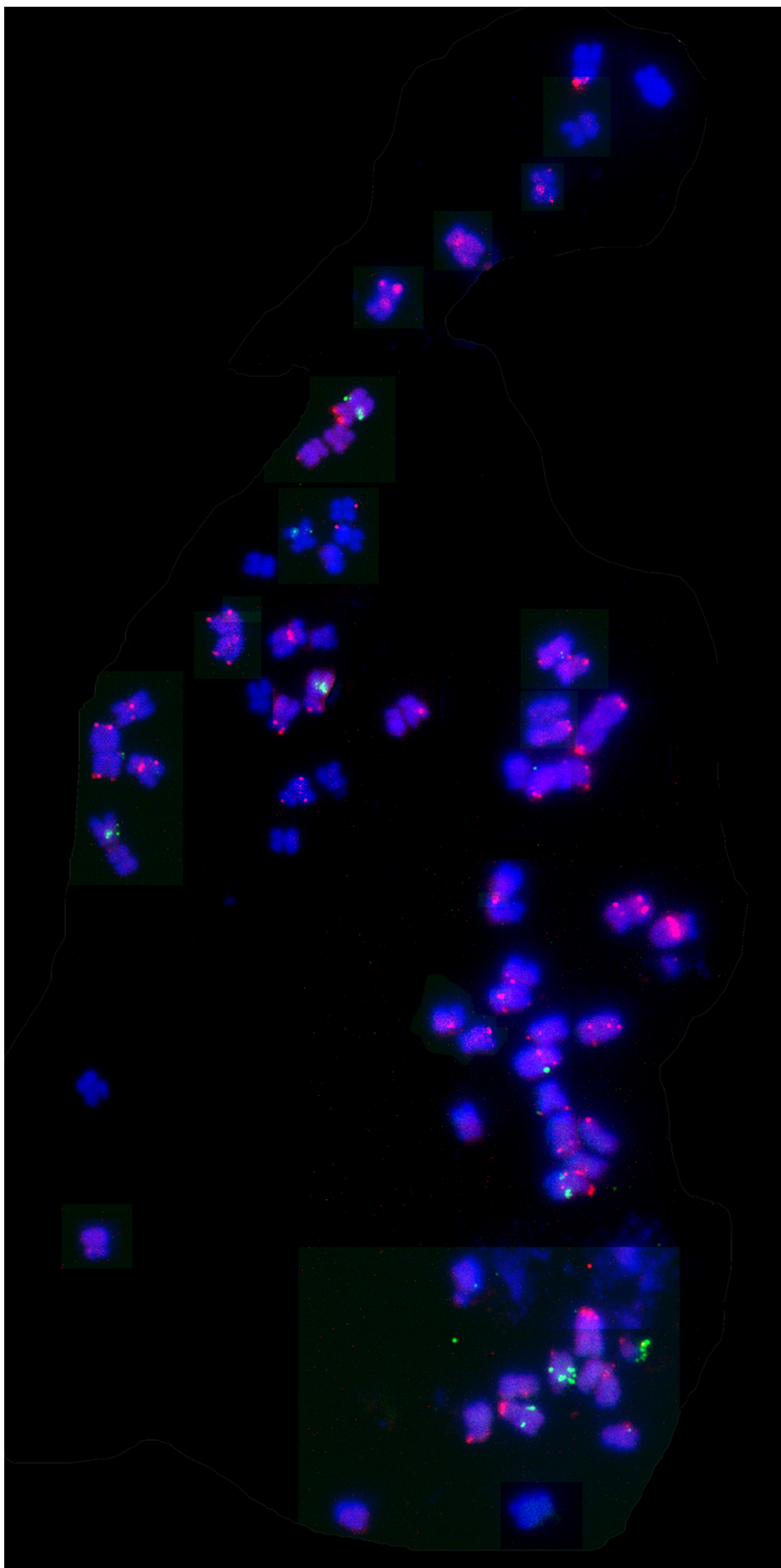


Figura 47: Hibridación *in situ* fluorescente usando como sonda la unidad de repetición de RUSI (**rojo**) sobre cromosomas metafásicos de *R. induratus* (2 células). Como control positivo se ha utilizado la sonda de la unidad ribosómica 5S de plantas (**verde**)

Análisis interespecífico de las secuencias de RUSI.-

Al comparar las secuencias de la familia de ADN satélite RUSI procedentes de las especies *R. induratus* y *R. scutatus*, generamos un alineamiento con 188 caracteres, a consecuencia de *gaps* menores que fue necesario introducir (**Apéndice 8**). La divergencia media entre ambos grupos de secuencias es 0.142. Al construir un árbol filogenético NJ con todas ellas, no se aprecia la existencia de clados fuertemente separados y apoyados mediante un análisis de bootstrap. Sin embargo, sí se observa una marcada tendencia a la agrupación de secuencias según la especie de la que fueron aisladas (**Figura 48**). El número de sitios I a III es 124. Asimismo existen 4 posiciones que representan un estado de transición IV. El número de polimorfismos compartidos es 5 y el de no compartidos 25.

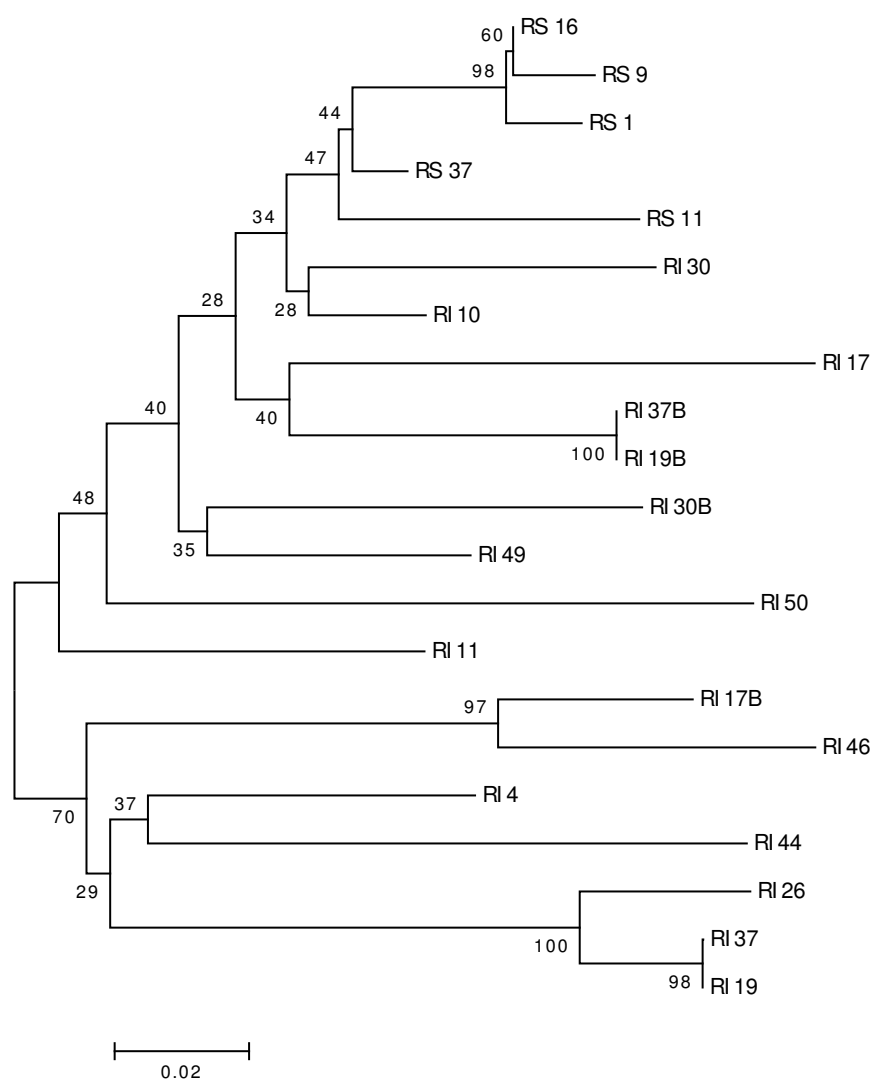


Figura 48: Árbol NJ de todas las secuencias analizadas en esta Memoria de RUSI aisladas de *R. induratus* (RI) y *R. scutatus* (RS)

4.8. Evolución cariotípica de las especies representativas del género *Rumex* L.

Como hemos visto en el desarrollo de esta Memoria, las especies del género *Rumex*, habrían sufrido a lo largo de su evolución una reducción en su número cromosómico básico. Fundamentalmente, esta reducción habría tenido lugar desde $x=10$ hasta $x=7$, con estadios intermedios de $x=9$ y 8 y reducciones extremas de $x=5$ y 4 (ver **Figura 9**).

Así, es destacable que las especies hermafroditas del grupo (las pertenecientes al subgénero *Rumex* y gran parte de las del subgénero *Acetosa*), presentan un número cromosómico básico $x=10$, con la existencia de distintos niveles de ploidía (**Figura 49A-B**).

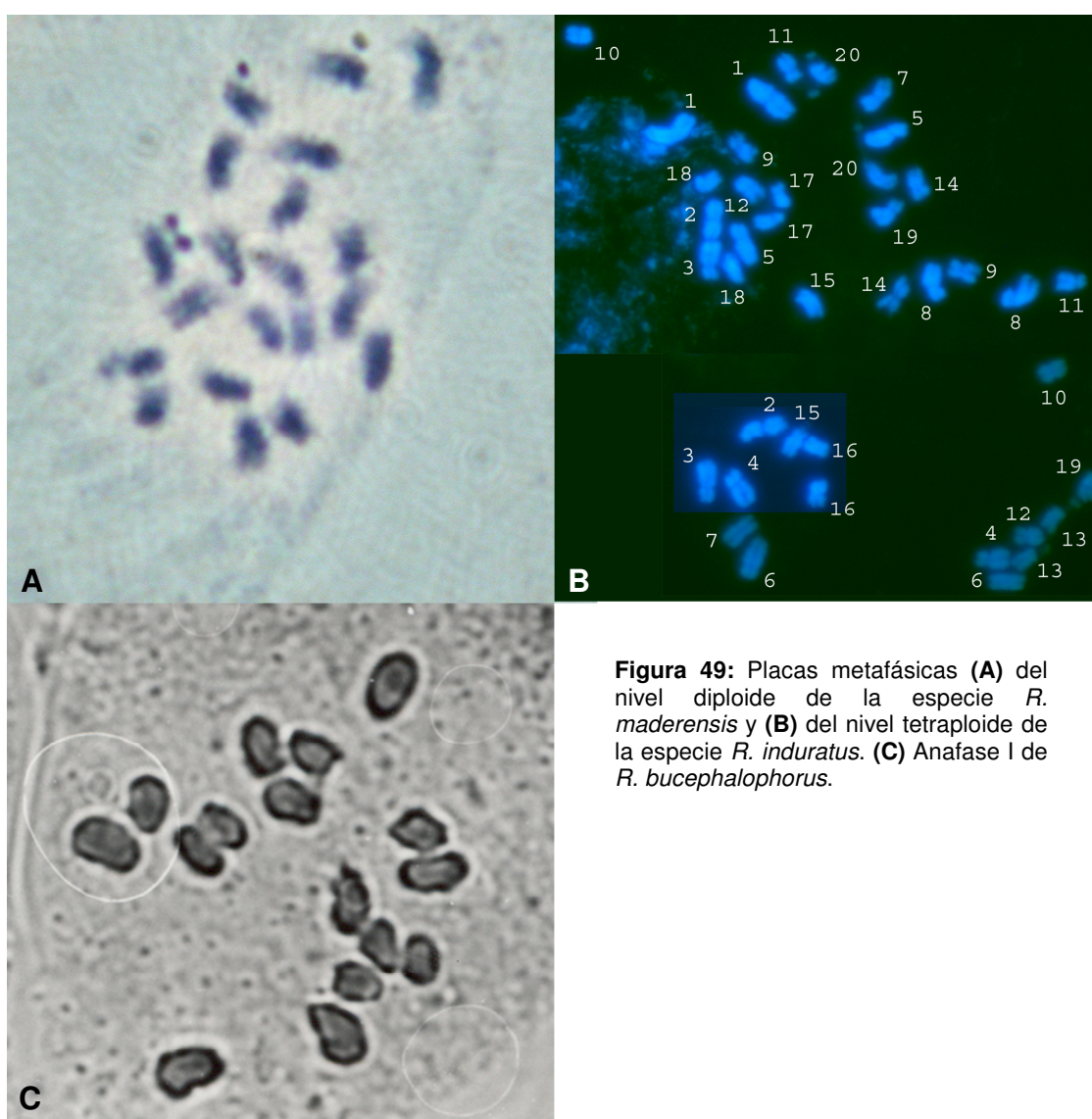


Figura 49: Placas metafásicas (A) del nivel diploide de la especie *R. maderensis* y (B) del nivel tetraploide de la especie *R. induratus*. (C) Anafase I de *R. bucephalophorus*.

Adicionalmente es posible encontrar algunas especies hermafroditas-polígamas del subgénero *Acetosa*, con un número cromosómico básico $x=9$.

Además, la especie *R. bucephalophorus* (del subgénero *Platypodium*), también hermafrodita, representaría una reducción adicional hasta el nivel $x=8$. Concretamente, nosotros hemos analizado células meióticas de esta especie y hemos detectado la presencia de 8 bivalentes homomórficos y muy homogéneos en cuanto a tamaño (**Figura 49C**).

Las especies dioicas del género *Rumex* (las pertenecientes a los subgéneros *Acetosa* y *Acetosella*) presentan un número cromosómico básico $x=7$. Esto lo encontramos en especies como *R. acetosa*, *R. papillaris* o *R. acetosella* (ver **Figuras 50 y 52**). Excepcionalmente, nosotros hemos encontrado que la especie también dioica *R. suffruticosus*, tiene un número cromosómico básico $x=8$ (ver **Figura 54**). Asimismo, otra excepción la supone la reducción cromosómica sufrida por la especie *R. hastatulus*, también dioica y endémica del norte del continente americano, que presenta números cromosómicos básicos $x=4$ y 5 según la raza que consideremos.

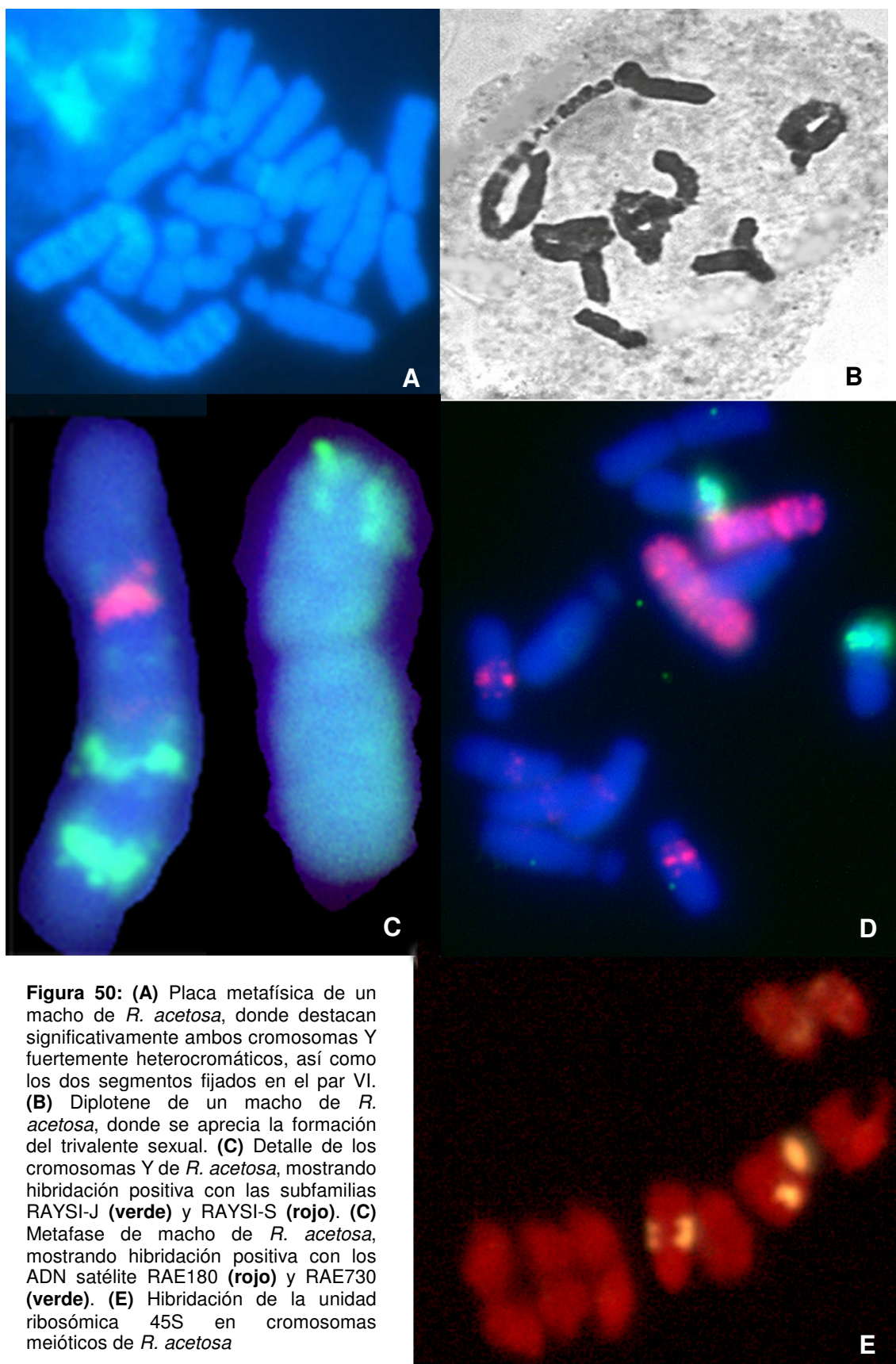
A continuación, vamos a analizar en más detalle la estructura cromosómica de alguna de estas especies dioicas.

4.8.1. Caracterización citogenética de las especies *Rumex acetosa*, *Rumex acetosella* y *Rumex suffruticosus*.-

Rumex acetosa

El cariotipo de la especie tipo de esta sección, *R. acetosa*, fue descrito por primera vez por Kihara y Ono (1923), siendo una de las únicas especies vegetales para las que se había descrito la presencia de cromosomas sexuales hasta esa fecha. Desde entonces ha sido ampliamente descrita y caracterizada a pesar de presentar cierto nivel de polimorfismo sus cromosomas. En esta Memoria hemos estudiado en profundidad su cariotipo empleando técnicas citogenéticas clásicas así como técnicas de tinción fluorescente, FISH y *spreading* para la observación de complejos sinaptonémicos. Concretamente hemos analizado individuos procedentes de las poblaciones de Sierra Nevada (Granada).

El cariotipo de *R. acetosa* está fundamentalmente caracterizado por la presencia de un sistema de determinismo sexual complejo en el que las hembras son $2n=14$ (con 12 autosomas + XX) y los machos $2n=15$ (con 12 autosomas + XY_1Y_2). Encontramos la existencia de un cromosoma X metacéntrico, que es el más grande del cariotipo. Asimismo, hay un cromosoma Y_1 , segundo en tamaño y metacéntrico, mientras que el Y_2 es ligeramente menor y submetacéntrico. Los autosomas son mucho menores en tamaño que el complemento sexual. Las parejas I a V son acrocéntricas. La pareja VI en las poblaciones analizadas es casi metacéntrica, a consecuencia de la fijación de dos segmentos supernumerarios heterocromáticos DAPI +. (ver **Figura 50**).



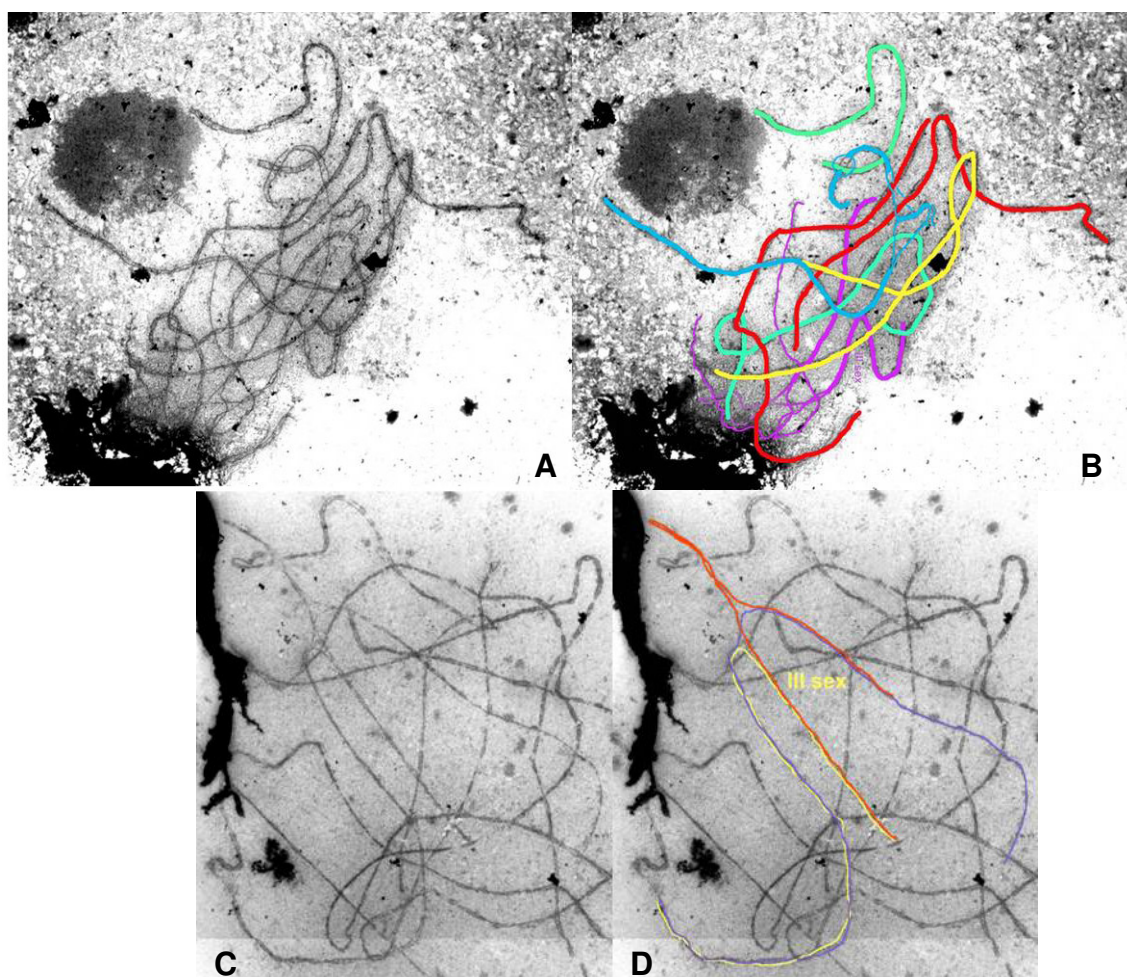


Figura 51: (A-B) Visualización de los complejos sinaptonémicos de un macho de *R. acetosa* y su interpretación. (C-D) Detalle del complejo sinaptonémico del trivalente sexual y su interpretación

Los cromosomas Y de *R. acetosa*, presentan claras evidencias de degeneración: son heteropicnóticos en su mayor parte por lo que se tiñen positivamente con el fluorocromo DAPI, lo que indica su alto contenido en secuencias repetitivas ricas en AT (ver **Figura 50A**). Además, aparecen como cromocentros en las interfases de núcleos somáticos y como elementos enormemente condensados en las profases mitóticas. A lo largo de esta Memoria hemos caracterizado dos familias de ADN satélite involucradas en la degeneración molecular de estos cromosomas (**Figura 50C-D**). Además, hemos caracterizado una familia de ADN satélite específicamente acumulada en segmentos supernumerarios heterocromáticos de la pareja VI (**Figura 50D**).

Mediante el análisis de células meióticas de *R. acetosa* observamos la formación en la interfase-I de machos de un trivalente formado por los cromosomas sexuales. En él, ambos cromosomas Y no recombinan entre sí, y lo hacen con el cromosoma X mediante una pequeña región pseudoautosómica presente en ambos extremos (**Figura 50B**).

La observación de los complejos sinaptonémicos en células meióticas de *R. acetosa*, en paquitene, muestra la existencia de 6 bivalentes correspondientes al complemento autosómico, así como la presencia de un trivalente sexual. Como las primeras observaciones indicaban, los dos extremos del cromosoma X aparecen asociados a los distintos Y por una zona en la que se observa la presencia de sinapsis (lo que sería la región homóloga) (**Figura 51**). Asimismo, se observa una amplia zona con la ausencia de complejo sinaptonémico (región no homóloga) que abarca la parte central del cromosoma X, así como el resto de los cromosomas Y (**Figura 51**). También es destacable en alguno de los núcleos la presencia de cierta sinapsis no homóloga a lo largo de los cromosomas Y (**Figura 51**).

Además de la heterocromatina de los segmentos supernumerarios y de los cromosomas Y, se distinguen dos regiones heterocromáticas, esta vez CMA₃-positivas, en el brazo corto del tercer par autosómico, que coinciden con el organizador nucleolar (NOR). Mediante experiencias de FISH utilizando como sonda la unidad ribosómica 45S completa, encontramos la existencia de un locus ribosómico adicional a éste en el par cromosómico V (**Figura 50E**).

Rumex acetosella

Como queda reseñado en el capítulo de Introducción, la especie *R. acetosella* constituye un complejo poliploide. Concretamente, aquí hemos estudiado cromosómicamente individuos procedentes de la población de Navacerrada (Segovia), cuyo nivel de ploidía es 4n, con 28 cromosomas ($x=7$).

La observación de cromosomas metafásicos de estos individuos revela la existencia significativa de un par de cromosomas grandes y metacéntricos que podrían estar involucrados en la determinación sexual de esta especie (**Figura 52A**).

Por otro lado, cuando observamos células meióticas de esta especie, observamos la presencia generalizada de 14 bivalentes. Sin embargo, frecuentemente observamos la aparición de tetravalentes de origen poliploide, en número variable ente 1 y 3. Además, es significativamente destacable la presencia de un bivalente ligeramente heteromórfico (**Figura 52B-D**).

Los complejos sinaptonémicos de esta especie, así como su interpretación se pueden apreciar en la **Figura 53**. En ella, se aprecia la presencia de 10 bivalentes y 2 tetravalentes. De la misma manera, es destacable que uno de los bivalentes es heteromórfico, con la presencia de una amplia zona con ausencia de complejo sinaptonémico (**Figura 53**).

Por otro lado, utilizamos preparaciones cromosómicas a partir de células mitóticas para experimentos de hibridación *in situ* utilizando como sondas la unidad ribosómica 45S y la sonda correspondiente a la unidad ribosómica 5S. Tal y como aparece en la **Figura 52E**, la unidad 45S aparece distribuida en 4 bivalentes, mientras que la unidad 5S lo está en sólo 2 de ellos.

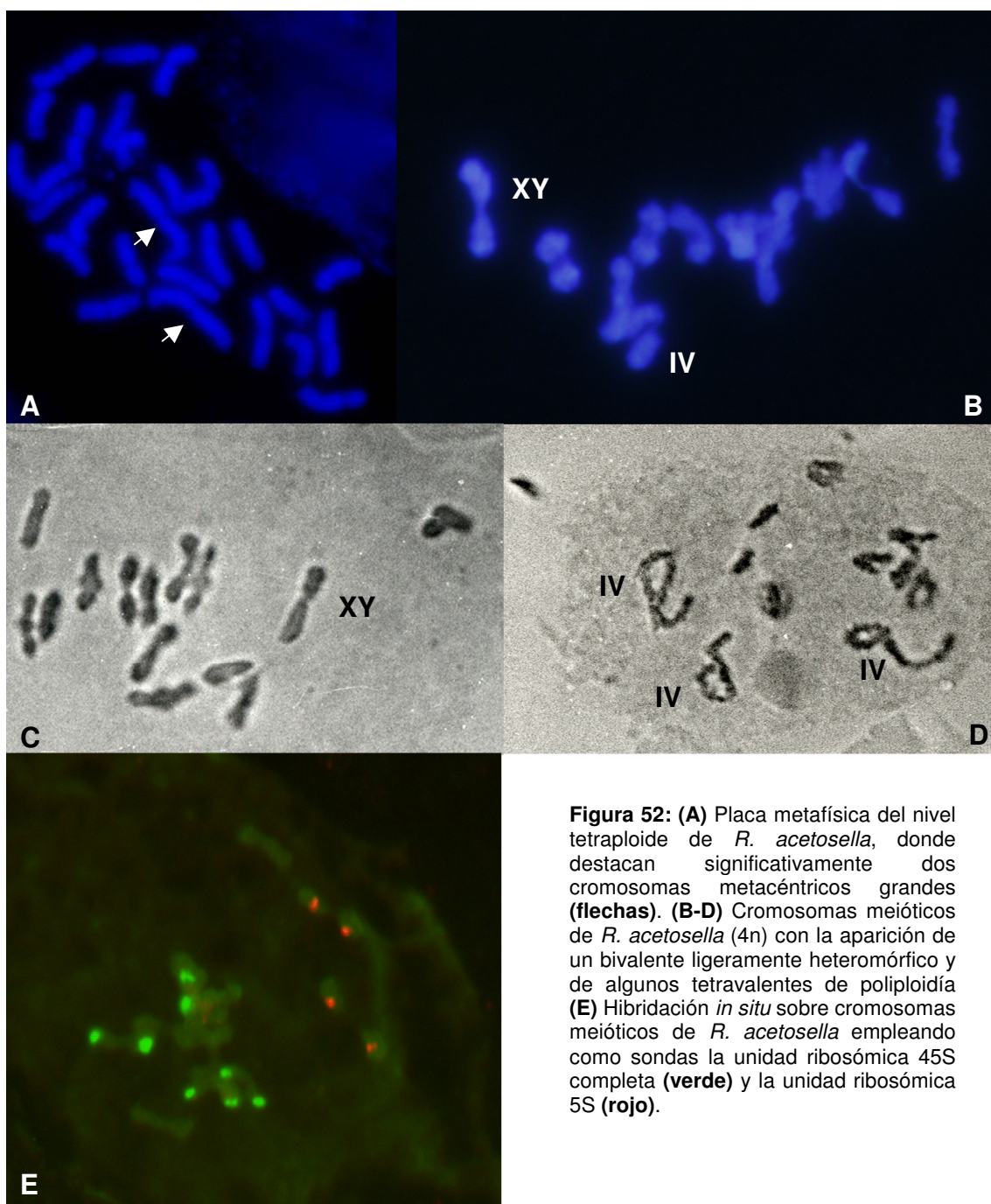


Figura 52: (A) Placa metafísica del nivel tetraploide de *R. acetosella*, donde destacan significativamente dos cromosomas metacéntricos grandes (flechas). (B-D) Cromosomas meióticos de *R. acetosella* ($4n$) con la aparición de un bivalente ligeramente heteromórfico y de algunos tetravalentes de poliploidía (E) Hibridación *in situ* sobre cromosomas meióticos de *R. acetosella* empleando como sondas la unidad ribosómica 45S completa (verde) y la unidad ribosómica 5S (rojo).

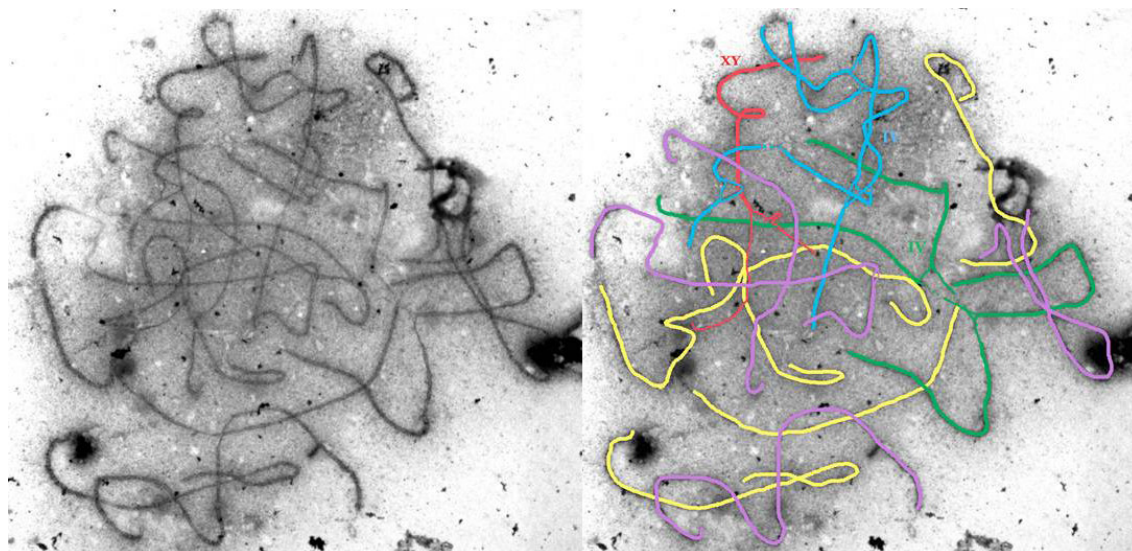


Figura 53: Visualización de los complejos sinaptonémicos de *R. acetosella* y su interpretación. (rojo) Bivalente sexual heteromórfico. (verde y azul) Tetravalentes de origen poliploide. (amarillo y morado) Bivalentes

Rumex suffruticosus

El cariotipo de *R. suffruticosus* es por primera vez analizado en esta Memoria. Para ello analizamos yemas florales masculinas tomadas de la población de la Sierra de Navacerrada (Segovia). Hemos determinado a partir de células mitóticas de origen meiótico un cariotipo para esta especie con $2n=16$ cromosomas, con la presencia de una pareja de cromosomas sexuales heteromórfica (ver **Figura 54A**). Esta especie, por tanto, tiene un número cromosómico básico $x=8$ y un sistema de cromosomas sexuales del tipo XX/XY.

La observación de células meióticas en interfase-I muestra la presencia en esta especie de 8 bivalentes en todos los individuos analizados. De ellos, 7 son homomórficos, siendo el octavo marcadamente heteromórfico (ver **Figura 54B**). La configuración de este bivalente recuerda mucho a lo que se observa en la especie *S. latifolia*, por lo que asumimos que se trata de un bivalente sexual XY, en el que el cromosoma de mayor tamaño es el cromosoma Y. Además, llevando a cabo una contratinción con DAPI, observamos que este cromosoma Y presenta una heterocromatina difusa con la presencia de una banda DAPI+ tenue y la ausencia de bandas C (ver **Figura 54D**).

A continuación analizamos el comportamiento de los cromosomas meióticos de *R. suffruticosus* mediante visualización de los complejos sinaptonémicos. Aparte de los 7 bivalentes homomórficos, es destacable nuevamente la presencia del bivalente sexual marcadamente heteromórfico. Este bivalente presenta una amplia zona en la que no existe complejo sinaptonémico (**Figura 55**). Asimismo, es destacable que los elementos axiales

de este bivalente son fuertemente heteromórficos con respecto a su tamaño (**Figura 54C-D**).

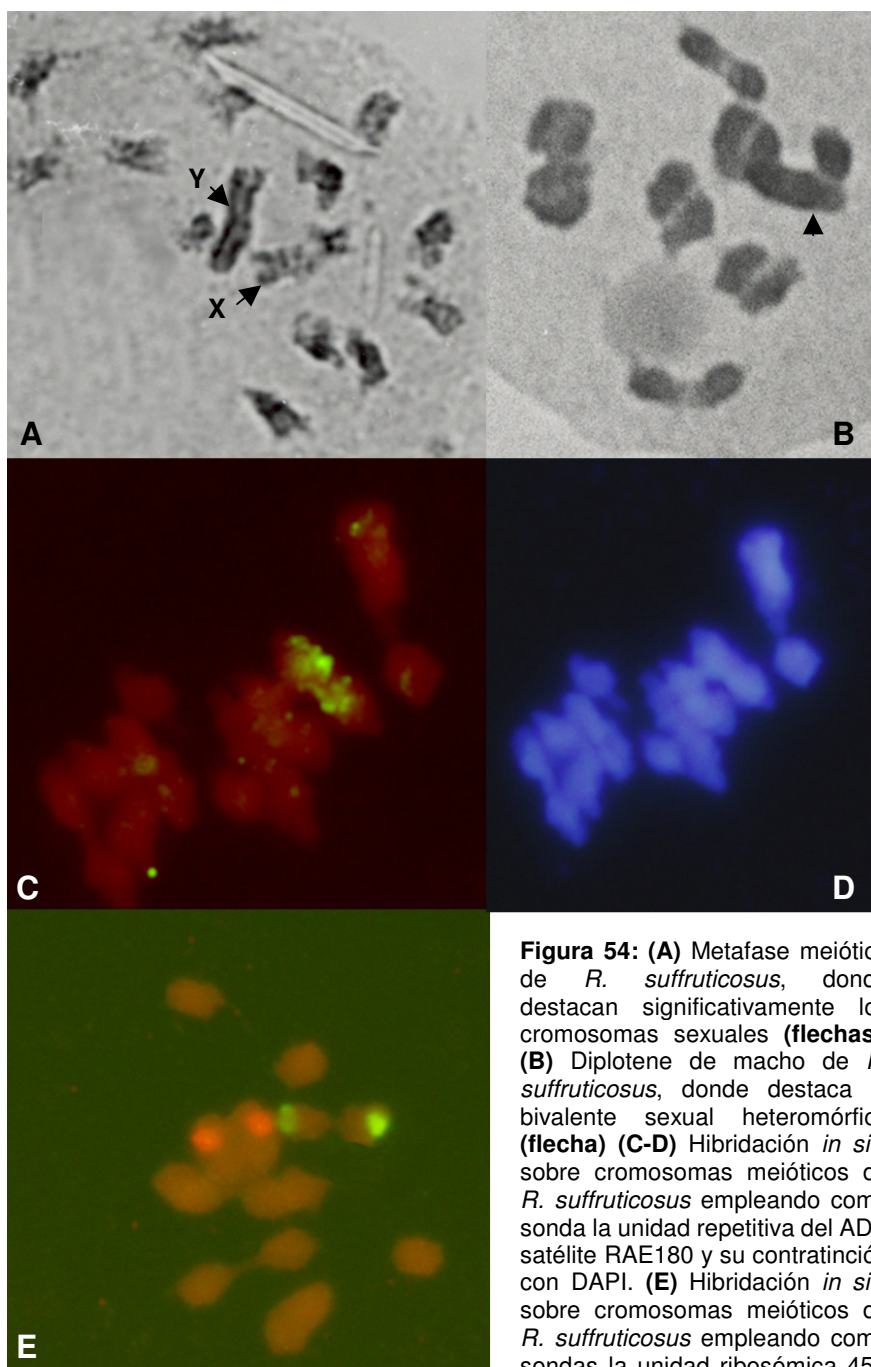


Figura 54: (A) Metafase meiótica de *R. suffruticosus*, donde destacan significativamente los cromosomas sexuales (**flechas**). (B) Diplotene de macho de *R. suffruticosus*, donde destaca el bivalente sexual heteromórfico (**flecha**) (C-D) Hibridación *in situ* sobre cromosomas meióticos de *R. suffruticosus* empleando como sonda la unidad repetitiva del ADN satélite RAE180 y su contraincisión con DAPI. (E) Hibridación *in situ* sobre cromosomas meióticos de *R. suffruticosus* empleando como sondas la unidad ribosómica 45S completa (**verde**) y la unidad ribosómica 5S (**rojo**).

Para completar la caracterización cariotípica de esta especie, hibridamos la sonda de la unidad ribosómica 45S así como la unidad 5S. La sonda 45S mostró una fuerte hibridación positiva en un bivalente autosómico como se observa en la **Figura 54E**. De la misma manera, la unidad ribosómica 5S se encuentra presente en otro bivalente autosómico (**Figura 54E**).

Por último, es necesario recalcar que la única familia de ADN satélite descrita hasta el momento para esta especie (la familia RAE180), se encuentra acumulada masivamente en un locus autosómico, estando completamente ausente de los integrantes del par cromosómico sexual (**Figura 54C**).

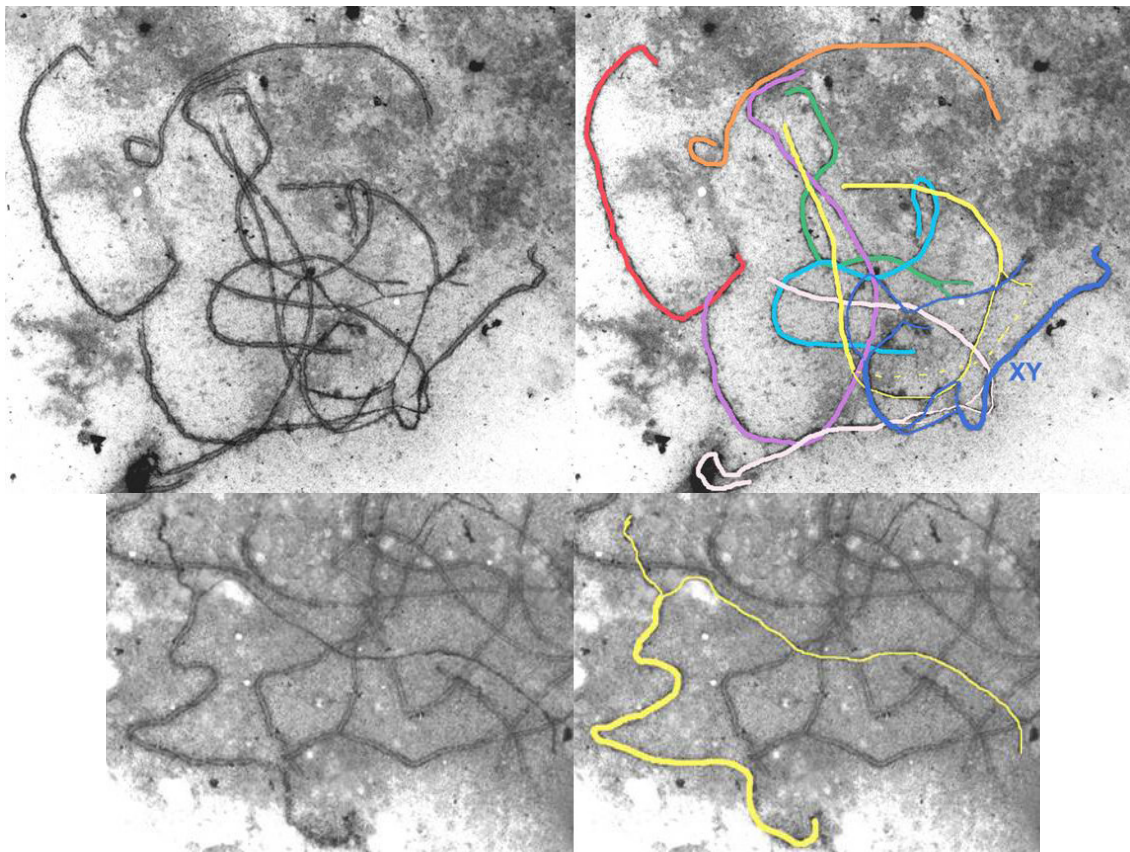


Figura 55: (A-B) Visualización de los complejos sinaptonémicos de un macho de *R. suffruticosus* y su interpretación, destacando la presencia de un bivalente sexual heteromórfico (azul). (C-D) Detalle del complejo sinaptonémico del bivalente sexual y su interpretación

5.- DISCUSIÓN

5.1. La evolución de los sistemas reproductivos y de los mecanismos de determinación sexual en el género *Rumex* utilizando marcadores nucleares y cloroplastidiales.-

El género *Rumex* se encuentra actualmente clasificado en cuatro subgéneros, *Acetosella*, *Acetosa*, *Rumex* y *Platypodium* (Rechinger, 1937, 1964; Löve, 1944, Löve y Kapoor, 1967; López González, 1990). Algunos autores, han dado incluso a estos grupos categoría de género (Löve y Kapoor, 1967). El subgénero *Rumex* incluye especies hermafroditas estrictas con la excepción de algunos endemismos monoicos hawaianos. El número cromosómico básico en cualquier caso es $x=10$. El subgénero *Platypodium*, por su parte, engloba a la especie también hermafrodita *R. bucephalophorus* como único integrante y su número cromosómico básico es $x=8$. El subgénero *Acetosella*, por otro lado, incluye a *R. acetosella* y *R. graminifolius* ambas especies dioicas XX/XY y con número cromosómico básico $x=7$. El sistema de control genético del sexo está basado en la presencia de un Y activo. El resto de las especies dioicas del género se encuentran clasificadas en distintas secciones del subgénero *Acetosa*. Concretamente la sección *Acetosa* reúne a la especie *R. acetosa* y especies emparentadas, todas ellas con sistema de cromosomas sexuales complejo, XX/XY₁Y₂, y un número cromosómico básico $x=7$. El sistema de control genético del sexo en este caso está basado en la relación X:A. La sección *Americanae* incluye a los endemismos americanos *R. paucifolius* y *R. hastatulus*. La especie *R. paucifolius* presenta un sistema cromosómico simple XX/XY, un número cromosómico básico $x=7$ y un sistema de control genético basado en la presencia de un Y activo. La especie *R. hastatulus*, por otro lado, incluye dos razas cromosómicas bien diferenciadas aunque morfológicamente indistinguibles. La raza de Texas, presenta un sistema cromosómico simple XX/XY, un número cromosómico básico $x=5$ y un sistema de control genético basado en la presencia de un Y activo. Por el contrario, la raza de North Carolina, se caracteriza por un sistema de cromosomas sexuales complejo XX/XY₁Y₂, un número cromosómico básico $x=4$ y un sistema de control genético del sexo basado en la relación X:A. Adicionalmente, encontramos otras dos especies dioicas clasificadas en otras dos secciones del subgénero *Acetosa*. Concretamente, la especie africana *R. sagittatus*, dioica sin cromosomas sexuales y con número cromosómico básico $x=9$, está clasificada en la sección *Afroacetosa*, y el endemismo ibérico *R. suffruticosus*, especie para la que no existían hasta ahora datos cromosómicos, y que se encuentra clasificada en la sección *Scutati*. El resto de las especies clasificadas en el subgénero *Acetosa*, dentro las secciones *Scutati*, *Hastati*, *Vesicarii* y *Afroacetosa*, son hermafroditas, polígamas o ginodioicas.

Esta clasificación ha sido realizada atendiendo exclusivamente a criterios morfológicos. Sin embargo, estos caracteres morfológicos, tales como el tamaño y la forma de la valva o de las hojas, no suponen un juego de caracteres lo suficientemente robusto como para mantener de manera sólida esta agrupación en cuatro subgéneros distintos. Nuestra clasificación basada en criterios moleculares apoya una clasificación diferente del género *Rumex*. Concretamente, nosotros según esta aproximación encontramos la existencia

de tres grupos de especies dentro del género, lo que implicaría una revisión en la sistemática del mismo. Así, todas las especies del subgénero *Rumex* aparecen estrechamente emparentadas en un clado apoyado por valores de bootstrap del 100%, por lo que la existencia de este subgénero sería coherente. Sin embargo, nosotros no encontramos motivo para el mantenimiento de los subgéneros *Platypodium* y *Acetosella*. Así, *R. bucephalophorus*, único integrante del subgénero *Platypodium*, y las especies pertenecientes al subgénero *Acetosella*, se encuentran estrechamente emparentadas con las especies dioicas euroasiáticas y americanas pertenecientes al subgénero *Acetosa*. Por ello, nuestra filogenia sugiere la inclusión de las especies de ambos subgéneros (*Acetosella* y *Platypodium*) dentro del subgénero *Acetosa*. Por lo tanto, el subgénero *Acetosa* quedaría dividido en dos grupos: uno que incluye a la especie *R. bucephalophorus* y al resto de especies dioicas euroasiáticas y americanas de los subgéneros *Acetosa* y *Acetosella*, y otro, que incluiría las especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas del subgénero *Acetosa* junto con la especie dioica africana *R. sagittatus* (también del subgénero *Acetosa*). Es destacable que esta clasificación estaría no sólo apoyada por los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias ITS y cloroplastidiales (**Figuras 7, 8 y 9**), sino también por el carácter cladístico de las deleciones presentes en las secuencias de los espaciadores internos de genes ribosómicos (ITS) (ver **Figura 6**). Así, las especies portadoras de un sistema XX/XY se caracterizan por una deleción de 53 pb, mientras que las especies con sistemas XX/XY₁Y₂, lo hacen por una deleción característica de 63 pb. Asimismo, el resto de especies se diferencian de sus parientes dioicos por la presencia de otras deleciones menores. Es muy significativo, igualmente, el hecho de que estos resultados se vean confirmados por otros marcadores nucleares adicionales. Por un lado, las diferentes familias de ADN satélite aquí analizadas confirman un origen único de la dioecia en el género (ver apartado siguiente). Por otro lado, el análisis de diferentes familias de retrotransposones también apoya el origen único de la dioecia (Mariotti et al., en prensa).

Nuestros resultados también se correlacionan de manera significativa con la evolución cariotípica de las especies del género y apoyan una relación entre ésta y la evolución de los sistemas de determinación sexual (**Figura 9**). Concretamente, en *Rumex* destaca la presencia de especies con números cromosómicos básicos $x=7$, $x=8$, $x=9$ y $x=10$. (Degraeve, 1975a, 1975b, 1976) propuso que la reducción desde un ancestral común $x=10$, varias veces a lo largo de la evolución del género, hacia el resto de niveles cromosómicos. Estos datos implican la aparición de especies dioicas $x=7$ en distintos pasos evolutivos. Sin embargo, Smith (1969), mediante un estudio de la evolución cariotípica de las especies de este género, propuso un único origen de las especies dioicas ($x=7$) a través de la reducción en el número cromosómico básico de un ancestral común. Estos últimos datos son coherentes con la nueva clasificación que aquí proponemos para el género *Rumex*. Implícitamente, nuestro punto de vista y el de Smith (1969) sugieren que la filogenia del grupo podría ser inferida a partir de la evolución cromosómica, que indica que ha habido un proceso de reducción cromosómica desde un número cromosómico básico $x=10$ hasta $x=7$, a través de intermediarios con $x=9$ y $x=8$. Nuestra filogenia, además, apoya la idea de que el número cromosómico

básico $x=10$ sería el estado ancestral (*Fallopia convolvulus*, especie utilizada como outgroup es también $x=10$ - Bailey et al., 1992), y que habría persistido en las especies del subgénero *Rumex* así como en las especies polígamas de la sección *Scutati* del subgénero *Acetosa* (*R. scutatus*, *R. induratus* y *R. roseus*) y *R. maderensis* (sección *Hastati*). Estas especies forman un clado con las especies polígamas $x=9$ (*R. abyssinicus*, *R. vesicarius* y *R. cyprius*) y con las especies polígamo-ginodioicas *R. hastatus* y *R. lunaria*, también $x=9$. *R. sagittatus*, la especie dioica africana carente de cromosomas sexuales es también $x=9$, y se encuentra relacionada con las especies polígamas y ginodioicas de este clado. Es por ello, que esta especie podría ser considerada como un estadio avanzado en la transición del estado polígamo-ginodioico hasta la dioecia. El tercer clado está compuesto por dos especies $x=8$, la hermafrodita *R. bucephalophorus* y la especie dioica *R. suffruticosus*, así como por las especies dioicas euroasiáticas y americanas, todas ellas $x=7$. En este grupo se encuentra clasificada, asimismo, la especie *R. hastatulus*, cuyas dos razas, la raza de Texas ($x=5$) y la de North Carolina ($x=4$) representan una reducción adicional. En el caso de la raza de North Carolina, el proceso de reducción ha llevado consigo una translocación X-autosomas, dando lugar a la aparición de un sistema cromosómico complejo XX/XY₁Y₂ (Smith, 1964, 1969).

Los resultados expuestos en esta Memoria apoyan la existencia de un ancestral común que dio lugar a las especies dioicas euroasiáticas y americanas del grupo. Esta nueva visión contradice la actual clasificación morfológica del género *Rumex*, que asume que la dioecia ha aparecido independientemente varias veces en la evolución. Asimismo, parece evidente que el sistema reproductivo ancestral del género es el hermafroditismo. Sin embargo, estos datos también sugieren la intervención de un estadio intermedio de ginodioecia en el paso evolutivo desde especies hermafroditas hasta especies dioicas. Esto se deduce de la existencia de un segundo linaje africano, representado por la especie *R. sagittatus* y especies emparentadas, en el que la dioecia habría aparecido directamente desde un ancestral ginodioico. De hecho, hay que mencionar que en el clado en el que se integran estas especies (con integrantes polígamos, ginodioicos y con dioecia incipiente), algunas de ellas tendrían el número cromosómico básico ancestral ($x=10$), mientras que otros presentan un número intermedio, $x=9$.

Existen varios casos en la bibliografía en los que se ha analizado la evolución de la dioecia en plantas. Así, por ejemplo, la dioecia ha aparecido al menos dos veces en el género *Silene* como un estado derivado de la ginodioecia, siendo el hermafroditismo el estado ancestral (Desfeux et al., 1996). Lo mismo parece haber ocurrido en el género *Ribes* (Selters y Soltis, 2003). Por el contrario, en la familia *Siparunaceae*, la dioecia habría aparecido también repetidas veces, pero en este caso a partir de la monoecia (Renner y Won, 2001). Sin embargo, parece poco frecuente que la monoecia aparezca como un estado de transición hacia la dioecia, al menos en monocotiledóneas (Weiblen et al., 2000). La existencia de especies monoicas en el género *Rumex* nos permite testar en cierta medida esta hipótesis. Concretamente, hemos incluido en nuestro análisis a la especie monoica *R. giganteus*, perteneciente al subgénero *Rumex*. Éste y otros dos endemismos hawaianos, como son *R. albescens* y *R. skottbergii*, parecen haber evolucionado hacia la monoecia. Sin

embargo, este fenómeno parece responder a las particularidades de las poblaciones insulares y que sus representantes estarían siguiendo un patrón evolutivo distinto al del resto de especies del género *Rumex* (Wagner et al., 1999). De hecho, algunas especies adscritas al subgénero *Rumex*, estrictamente hermafroditas en el continente americano o europeo, aparecen ocasionalmente en las poblaciones hawaianas como monoicas, como es el caso de *R. obtusifolius* (Wagner et al., 1999).

Considerando únicamente el clado formado por las especies dioicas euroasiáticas y americanas, encontramos la presencia de dos subclados. El primer subclado está compuesto por especies con sistemas cromosómicos simples XX/XY, incluyendo el endemismo ibérico cuyo cariotipo hemos descrito en esta Memoria por primera vez, *R. suffruticosus*, así como *R. acetosella* y la especie emparentada *R. graminifolius* y los endemismos americanos *R. paucifolius* y *R. hastatulus* (cuya raza de North Carolina habría evolucionado secundariamente hacia un sistema complejo XX/XY₁Y₂). El otro subclado está constituido por la especie *R. acetosa* y especies emparentadas. Estas especies constituyen un grupo muy homogéneo en función de sus características morfológicas y cariotípicas, incluyendo un sistema complejo XX/XY₁Y₂ (Degraeve, 1976; Wilby y Parker, 1988). Es destacable que trabajos anteriores habían apuntado la idea de que dentro de las especies americanas del grupo, *R. paucifolius* estaría estrechamente emparentada con *R. acetosella*, mientras que *R. hastatulus* lo estaría con la especie *R. acetosa* y especies relacionadas (Smith, 1968, 1969). Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados (**Figura 9**), tanto *R. paucifolius* como *R. hastatulus*, compartirían un ancestral común con *R. acetosella* y *R. graminifolius*. De hecho, estas dos últimas especies y *R. hastatulus*, son las especies más emparentadas dentro del grupo según nuestra filogenia. Asimismo, *R. paucifolius* y *R. suffruticosus* estarían más relacionadas entre sí.

En otros grupos vegetales, se ha encontrado que la dioecia es un evento evolutivo relativamente reciente (Desfeux y Lejeune, 1996; Desfeux et al., 1996; Guttman y Charlesworth, 1998). Filatov y col. (2000), teniendo en cuenta una tasa de cambio para el ADN nuclear de plantas del 0.6% por sitio y millón de años (Gaut, 1998), han estimado que la dioecia en el género *Silene* habría aparecido hace entre 10 y 20 millones de años. Nosotros, en el presente trabajo, tomando en cuenta la misma tasa de cambio empleada por estos autores y la media de las distancias corregidas inferidas a partir de los datos de ITS, estimamos que la dioecia habría aparecido en *Rumex* hace unos 15-16 millones de años. Asimismo, la divergencia entre los dos subclados en que se dividen las especies dioicas, habría ocurrido hace 12-13 millones de años. Para realizar estos cálculos, eliminamos aquellas ramas que no presentaban una tasa constante de cambio y construimos entonces un árbol linealizado asumiendo una tasa de cambio constante mediante el programa LINTRE (Takezaki et al., 1995).

El establecimiento de una filogenia molecular en el género *Rumex*, ha demostrado ser informativo en el análisis de la evolución de los cromosomas sexuales y de los mecanismos de determinación sexual. Se ha venido aceptando que el sistema cromosómico complejo (XX/XY₁Y₂) presente en las

especies de la sección *Acetosa*, habría evolucionado a partir de un sistema simple (XX/XY) (Charlesworth, 1996), cosa que nuestros datos apoyan. Dos hipótesis han sido propuestas para explicar este paso evolutivo. Una primera hipótesis dice que el sistema de cromosomas múltiples se habría originado a través de un proceso de translocación cromosómica entre un par autosómico y el cromosoma X ancestral presente en los sistemas XX/XY. Concretamente, esta es la hipótesis que ha sido utilizada para explicar la aparición secundaria de un sistema complejo en la raza de North Carolina de la especie *R. hastatulus*, a partir de un sistema simple, que caracteriza a la raza de Texas (Smith, 1969). La descripción de una tercera raza cromosómica, que representa un estadio intermedio entre los dos extremos, descrita para esta especie, confirmaría esta hipótesis (Smith, 1969). La hipótesis alternativa sugiere que la aparición de los dos cromosomas Y de los sistemas complejos se habría producido a partir de un proceso de misdivisión del cromosoma Y ancestral. Esta hipótesis ha sido utilizada para explicar la aparición de los sistemas de cromosomas múltiples en *R. acetosa* (Wilby y Parker, 1988b; Ruiz Rejón et al., 1994). La primera hipótesis es obviamente aceptable para explicar la aparición del sistema múltiple en *R. hastatulus*, y en consecuencia, también parece la más plausible para explicar el origen del sistema XX/XY₁Y₂ de *R. acetosa*. En este último caso, la hipótesis de la translocación requiere una reducción cromosómica desde un nivel $x=8$ hasta el nivel $x=7$. En cambio, la hipótesis de la misdivisión apunta a la existencia de un ancestral dioico $x=7$. Desafortunadamente, los datos de los que disponemos para establecer nuestra filogenia, no nos permiten decantarnos de manera definitiva hacia una u otra hipótesis, ya que en el subclado de especies con sistema XX/XY, sería posible encontrar ancestrales dioicos $x=8$ y $x=7$, que habrían dado lugar al sistema complejo.

En relación con los sistemas de control genético del sexo, Westergard (1958) propuso que los sistemas X/A habrían evolucionado secundariamente a partir de sistemas basados en la presencia de un cromosoma Y activo. Con respecto a la determinación sexual, los sistemas X/A impiden la existencia de fenómenos de poliploidía (Muller, 1925), estando el sexo controlado por sistemas basados en un Y activo en casos demostrados de poliploidía (Smith, 1969). El género *Rumex* es muy interesante desde este punto de vista por la presencia de ambos sistemas de control genético del sexo. Concretamente, en esta Memoria hemos analizado cinco especies con un sistema X/A (*R. acetosa*, *R. papillaris*, *R. tuberosus*, *R. thyrsoides* y *R. intermedius*, todas ellas pertenecientes a la sección *Acetosa* del subgénero *Acetosa*) y cuatro especies con sistemas basados en un Y activo (*R. acetosella* y *R. paucifolius*, para las que han sido descritos distintos niveles de ploidía, *R. graminifolius*, que es hexaploide, y la especie *R. suffruticosus*, para la que el único dato cromosómico ($x=8$; XX/XY) de que disponemos es el obtenido en esta Memoria, y para la que asumimos la presencia de este sistema basado en un Y activo. La topología del árbol obtenido en este trabajo, demuestra que las especies con sistema X/A y sistemas X/Y son grupos hermanos. Sin embargo, dentro de la especie *R. hastatulus*, encontramos cómo en la raza de North Carolina habría evolucionado secundariamente un sistema del tipo X/A, a partir de uno basado en la presencia de un cromosoma Y activo. De manera muy significativa, el mismo cambio evolutivo desde sistemas XX/XY (con sistemas

X/Y) hasta sistemas complejos XX/XY_1Y_2 (con sistemas X/A) parece estar ocurriendo en dos linajes distintos. Uno en el ancestral común de *R. acetosa* y especies emparentadas, y otro en la especie americana emparentada con *R. acetosella*, *R. hastatulus*, como habían propuesto anteriormente Smith (1969) y Degraeve (1976). Nuestros datos asimismo apoyan la idea de que los sistemas X/A son derivados de los X/Y. El hecho de que estos últimos se encuentren distribuidos más ampliamente evolutivamente hablando que los primeros (Charlesworth, 1996), supone una prueba adicional para ello. Además, aquí aportamos la idea de que los sistemas basados en la presencia de un Y activo es el estado primitivo en el género *Rumex*.

En conclusión, como respuesta a las cuestiones que nos habíamos planteado al principio de este estudio, demostramos: 1) que todas las especies dioicas de distribución euroasiática y americana del género *Rumex* presentan un origen común y que la ginodioecia podría suponer un estadio intermedio hacia la aparición de la dioecia, como parece estar ocurriendo en el linaje africano de *R. sagittatus*; 2) que el sistema de control genético basado en la presencia de un Y activo es más antiguo que el basado en la relación X/A y que los sistemas de cromosomas sexuales múltiples habrían derivado de los sistemas simples XX/XY; y 3) que la nueva clasificación infragenérica propuesta para el género *Rumex* sería consistente con la evolución de los sistemas reproductivos y con la evolución cariotípica del género.

5.2. Utilidad del ADN satélite como marcador cladístico en el género *Rumex*.

En esta Memoria hemos analizado cuatro familias de ADN satélite presentes en los genomas de las especies del género *Rumex*. Concretamente, hemos aislado tres familias de ADN satélite, RAE180, RAE730 y RAYSI, de la especie *R. acetosa*. Asimismo, la familia RUSI, ha sido caracterizada a partir de las especies *R. induratus* y *R. scutatus*. Una vez caracterizadas y aisladas, hemos analizado la distribución de cada una de estas secuencias en un grupo representativo de especies pertenecientes a este género. Se demuestra que se trata de familias de ADN satélite restringidas a unas pocas especies muy emparentadas entre sí. Concretamente, la familia RAE180, sería la que está conservada en un número más amplio de especies, puesto que estaría presente en las especies dioicas con distribución euroasiática y americana del grupo. Las familias RAE730 y RAYSI, sin embargo, estarían únicamente presentes en las especies dioicas emparentadas con *R. acetosa* y con sistemas de cromosomas sexuales complejos. Finalmente, la familia de ADN satélite RUSI, restringida exclusivamente a las dos especies donde fue caracterizada, *R. induratus* y *R. scutatus*.

Y es que, gran parte de las familias de ADN satélite descritas en la bibliografía se encuentran restringidas a una especie o a unas pocas especies emparentadas (Singer, 1982). Esto es coherente con el hecho de que estos ADNs tienen una tasa de aparición y desaparición brusca muy alta (Miklos, 1985). Los casos del ADN satélite PIM357 de algunas poblaciones canarias de especies del género *Pimelia* (Pons et al., 2002), las familias CgoA y CgoB

características del primate *C. goeldii* (Fanning et al., 1989) o el caso del género *Triturus* (Cremisi et al., 1988) han sido algunos de los ejemplos mencionados a lo largo de esta Memoria para argumentar esta acumulación específica.

En algunas ocasiones, sin embargo, se ha detectado una distribución más amplia de algunas familias de ADN satélite. Así, un ADN satélite puede distribuirse en grupos amplios de especies como en el caso de todas las especies de una familia. Un ejemplo lo constituyen los ADNs satélite de las familias *Felidae* y *Cervidae* (Fanning et al., 1988 y 1993). Más aún, la distribución puede ser mayor y existir secuencias de ADN satélite relacionadas entre sí en un grupo de familias emparentadas, caso del suborden Mysticeti del orden *Cetacea* (Arnason, 1990). Asimismo, una familia de ADN satélite puede encontrarse conservada en todas las especies de un orden, como es el caso del ADN satélite centromérico, la familia alpha, de primates (Willard, 1991; Fanning et al., 1993) o el satélite “común” de los cetáceos (Arnason, 1990).

En cualquier caso, la presencia de una familia de ADN satélite en un grupo determinado puede emplearse con valor cladístico. Se asume que todas las especies que comparten esa secuencia, comparten a su vez un mismo ancestral, y por tanto se puede inferir un origen común de las mismas (Garrido-Ramos et al., 1998; Rajagopopal et al., 1999). Así, encontramos en la bibliografía algunos ejemplos de filogenias resueltas mediante el uso del ADN satélite como marcador cladístico, como es el caso de los clásicos estudios del grupo de Arnason en cetáceos (Arnason, 1990; Arnason et al., 1992; Grétarsdóttir y Arnason, 1992, 1993), el del satélite PIM357 en el género *Pimelia* (Pons et al., 2002) o el caso de la filogenia de la familia de peces *Sparidae* (de la Herrán et al., 2001), inferida mediante la integración de varias familias de ADN satélite. Asimismo, análisis del estatus de presencia/ausencia de determinadas familias de ADN satélite han sido utilizados con éxito para diferenciar especies de los géneros *Pagrus* y *Sparus* (Garrido-Ramos et al., 1998), para diferenciar las especies de esturión *Acipenser naccarii* y *A. sturio* (Garrido-Ramos et al., 1997) o para la caracterización de diversas especies del género *Populus* (Rajagopopal et al., 1999).

En este sentido, nosotros hemos determinado que los ADN satélites estudiados en esta Memoria son útiles desde el punto de vista cladístico mediante un simple análisis de presencia/ausencia de las diferentes familias de secuencias repetidas estudiadas, tal como en su día propusieran Murata et al. (1993). Así, estas familias de ADN satélite vienen a confirmar dos conclusiones clave de nuestro análisis filogenético. En primer lugar, que todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas comparten un ancestral común y, en segundo lugar, que existen dos subclados dentro de las especies dioicas claramente diferenciados por el tipo de determinación sexual de las especies: un subclado con sistema cromosómico simple y otro con sistema de determinación compleja. Concretamente, hemos encontrado que la familia de ADN satélite RAE180 está representada en todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas de *Rumex* analizadas en esta Memoria, tanto las pertenecientes al subclado con sistema cromosómico simple (*R. acetosella* del subgénero *Acetosella* y *R. suffruticosus* y *R. hastatulus*, de la secciones *Scutati* y *Americanae* del subgénero *Acetosa*, respectivamente) como aquellas

pertencientes al subclado con sistemas complejos (*R. acetosa*, *R. papillaris*, *R. intermedius*, *R. thyrsoides*, *R. tuberosus*, todas ellas de la sección *Acetosa* del subgénero *Acetosa*). Por lo tanto, el análisis del estatus de presencia/ausencia de la familia RAE180 nos permite diferenciar a las especies dioicas euroasiáticas y americanas del resto de integrantes del grupo, incluida la especie dioica africana, *R. sagittatus*, en virtud de la presencia de la familia de ADN satélite RAE180 en aquéllas y su ausencia en el resto de especies. Esto se habría producido hace en torno a 15-16 millones de años, fecha en que hemos datado la aparición de la dioecia en el género. Por otro lado, encontramos que las otras dos familias de ADN satélite aisladas a partir de *R. acetosa*, RAE730 y RAYSI, se encuentran distribuidas de forma exclusiva en el clado que forma esta especie junto con especies emparentadas, todas ellas portadoras de un sistema cromosómico complejo, XX/XY₁Y₂. Significativamente, no hemos encontrado estos satélites en ninguna otra especie del género, incluyendo las especies dioicas XX/XY agrupadas en el otro clado y la raza cromosómica de North Carolina de *R. hastatulus*, también XX/XY₁Y₂ (**Tabla 4**). Como hemos visto en esta Memoria, RAE730 y RAYSI presentan origen común en una secuencia ancestral de 120 pb, esta secuencia se habría acumulado y amplificado de manera preferencial en segmentos heterocromáticos presentes en la pareja VI (RAE730) y en los cromosomas Y (RAYSI), de cuya heterocromatina estos satélites son principales constituyentes. Queda patente, por tanto, que la expansión de RAE730 y RAYSI se produjo en un momento muy próximo a la formación del sistema de cromosomas complejo presente en el grupo de especies relacionadas con *R. acetosa*, habiendo participado en cierta medida en el proceso de degeneración de los cromosomas Y. Asimismo, no encontramos indicios de la presencia de ninguna de estas dos familias de ADN satélite en la raza de North Carolina de *R. hastatulus*, cosa que supone una prueba adicional de que la formación de ambos tipos de sistemas cromosómicos tuvo lugar separadamente a lo largo de la evolución. A partir de nuestra filogenia, hemos estimado un tiempo de divergencia entre los subclados de especies con sistemas complejos y simples respectivamente de unos 12 a 13 millones de años.

Por último, es destacable que no hemos podido encontrar ninguna familia de ADN satélite presente en las especies del subgénero *Rumex*. Asimismo, no hemos encontrado un ADN satélite como marcador del clado constituido por especies polígamas, ginodioicas, hermafroditas y la dioica africana *R. sagittatus*, pertenecientes al subgénero *Acetosa*. Si bien, hemos aislado y caracterizado por primera vez en esta Memoria, la familia de ADN satélite RUSI, que se encuentra presente exclusivamente en las especies hermafroditas *R. induratus* y *R. scutatus*, también pertenecientes al subgénero *Acetosa*. Según la nueva filogenia que hemos obtenido basándonos en marcadores ribosómicos y cloroplastidiales, estas dos especies se encuentran estrechamente emparentadas y forman un clado con la especie *R. maderensis*, de la que según nuestros cálculos se separaron hace 4.8 millones de años. Estos datos apoyan un origen muy reciente de esta familia de ADN satélite. Nosotros, basándonos en una tasa de cambio de 0.6% por sitio y millón de años (Gaut, 1998) y los datos de distancia obtenidos a partir del análisis de las secuencias ITS, hemos calculado que esta familia de ADN satélite se habría originado hace aproximadamente unos 2.5 millones de años.

5.3. Características generales de las familias de ADN satélite RAE180, RAE730, RAYSI y RUSI.-

Una de las características que definen a una gran parte de familias de ADN satélite estudiadas hasta la fecha es el contenido en A+T tan elevado que suelen presentar. Los estudios realizados en vegetales revelan porcentajes muy variados, desde el 22% hasta un 75% (Macas et al., 2001). A pesar de ello, la riqueza media para los satélites vegetales estudiados está en un 58% (Macas et al., 2001). Frecuentemente, se ha relacionado esta riqueza en A+T y la presencia de tramos cortos de A+T con la capacidad que poseen los ADN satélite para adquirir curvaturas estables, las cuales podrían estar relacionadas con la unión a proteínas (Radic et al., 1992; Pons et al., 1997). Estas estructuras estarían, por tanto, involucradas en el empaquetamiento del ADN y las proteínas en la heterocromatina. Este hecho establecería, entonces, una presión selectiva positiva sobre estas secuencias con el resultado del mantenimiento de su estructura (Plohl et al., 1998). Los ADN satélites analizados en esta memoria, presentan un sesgo en el contenido de bases claramente inclinado al par adenina/timina. Concretamente, la riqueza en A+T en la familia RAE180 es de un 69,88%, mientras que para la familia RAE730 y la familia RAYSI, esta riqueza alcanza valores del 70,45% y del 67,53%, respectivamente. Estos valores son de 73,85% para la familia RUSI.

Es de destacar que en dos de los satélites analizados en esta Memoria, RAYSI y RAE730, existe un motivo muy característico (el motivo CAAAA) que se repite varias veces en cada una de las repeticiones monoméricas. En este sentido, la repetición del motivo CAAAA en plantas parece estar muy generalizada (se presenta en un 86.8% de las familias de ADN satélite vegetales estudiadas) y se lo relaciona con procesos de rotura-reunión (Macas et al., 2001). La repetición de este y otro tipo de motivos también cortos suele estar relacionada con fenómenos de deslizamiento de las cadenas durante la replicación (Devilee et al., 1986) y explican parte del proceso de formación de una unidad repetitiva de un ADN satélite (De la Herrán et al., 2001b). De hecho, otro de los aspectos interesantes que parece ser común a la mayor parte de las familias de ADN satélite analizadas hasta la fecha, es el origen de las unidades de repetición (monómeros actuales) a partir de unidades más pequeñas. Estas unidades pueden ser repeticiones de muy pocos nucleótidos, como se ha descrito para explicar el origen de dos familias de ADN satélite centromérico, una presente en *Mus musculus* (Horz y Altenburger, 1981) y la otra en *Sparus aurata* (Garrido-Ramos et al., 1994), así como en el satélite de *Oreochromis mossambicus/hornarum* (Wright, 1989).

Macas et al. (2001) han revisado los tamaños de las unidades monoméricas de diferentes familias de ADN satélite de vegetales y han encontrado que el tamaño de la unidad de repetición más común en vegetales es de unos 165 pb y sus múltiplos, siendo, también muy frecuente el tamaño entre 315 y 375 pb. En cualquier caso, el 91% de los monómeros se encuentra por debajo de los 600 pb. En los casos en los que la unidad de repetición suele ser mayor de 165 pb, muchas veces se trata de ADN satélites con unidades

iniciales de 165 pb que han evolucionado hacia un proceso en el que la unidad de homogeneización ha pasado a ser el dímero o el trímero de la unidad inicial.

En esta Memoria se han analizado tres familias de ADN satélite aisladas a partir de la especie dioica *R. acetosa* y especies estrechamente emparentadas, y otra familia, RUSI, aislada a partir de las especies *R. scutatus* y *R. induratus*.

La familia RAE180 está presente en la heterocromatina de los cromosomas Y y en un reducido locus autosómico en las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*, pero en un locus que representa un gran bloque heterocromático en un autosoma de la especie *R. suffruticosus*. La longitud de su unidad de repetición es de 180 pb, lo que coincide aproximadamente con el caso general. No hemos encontrado en las unidades repetitivas de este ADN satélite la presencia de subrepeticiones internas dignas de mención a la hora de explicar el origen de dichas unidades a partir de subunidades más pequeñas cuya probabilidad y ocurrencia hemos destacado anteriormente. Aproximadamente las mismas consideraciones pueden ser hechas para la familia de ADN satélite RUSI, ya que sus unidades monoméricas presentan un tamaño entorno a los 170 pb y no se observan motivos internos destacables repetidos a lo largo de su secuencia. Como hemos visto en el apartado 4.7 de Resultado, esta familia de ADN satélite está presente en regiones subtelméricas y pericentroméricas (**Figura 47**).

Por el contrario, las otras dos familias de secuencias aisladas del grupo de especies representado por *R. acetosa* y otras dioicas con sistema múltiple de cromosomas sexuales (RAE730 y RAYSI) pueden ser considerados ADNs satélite complejos y excepcionalmente grandes en cuanto a la longitud de su unidad monomérica. Las unidades de repetición de estas dos familias tienen una longitud de 930 pb (familia RAYSI) y de 730 pb (familia RAE730). Las dos tienen un origen común y guardan un 55% de identidad. Además, como se ha comentado anteriormente en el capítulo de Introducción de esta Memoria, Shibata y col. (2000b) detectaron que la familia RAE730 está constituida a partir de la organización en tándem de subrepeticiones menores de 120 pb. Nosotros, hemos corroborado este hecho, habiendo descrito además, que la familia RAYSI también está constituida a partir de repeticiones de esa longitud (ver **Figuras 15 y 20**). Por lo tanto, un satélite de 120 pb habría evolucionado de tal forma que la unidad de homogeneización se habría ido amplificando hasta dar lugar a nuevos satélites (los actuales RAYSI y RAE730), como se ha demostrado que ocurre en otros casos. Así, por ejemplo, la unidad monomérica inicial del ADN satélite *alpha* del centrómero de humanos tiene una longitud de unos 170 pb y, sin embargo, la unidad de evolución de este ADN satélite es dimérica (Willard, 1990). En este sentido y con respecto a los satélites estudiados por nosotros, es importante destacar que Charlesworth et al. (1994) han desarrollado un modelo del que se deduce que estas repeticiones de rango superior a la unidad monomérica se originan con el tiempo, generalmente, en regiones con baja tasa de recombinación.

Finalmente, queremos hacer mención en este apartado de la Discusión al hecho de que en varias de las especies analizadas en esta Memoria

coexistan distintas familias de ADN satélite. Por lo general, cuando existen varias familias de ADN satélite dentro de un genoma, cada una ocupa una localización diferente e, incluso si ocupan una misma región, suele ocurrir que cada una se encuentre en un locus diferente dentro de dicha región (Jamilena et al., 1993). Pero, también conviene destacar que, en muchas ocasiones, las diferentes familias de ADN satélite de una especie suelen estar relacionadas en origen conservando algunas regiones de homología (John, 1988; McGregor y Sessions, 1986; Jamilena et al., 1993). Analizando exhaustivamente la relación entre las secuencias de las cuatro familias de ADN satélite estudiadas en esta Memoria, hemos detectado una homología significativa entre las familias RAYSI y RAE730. El porcentaje de similitud entre ambas es del 55%, aunque el estudio de zonas concretas nos revela una similitud superior al 70%. Estos datos, unidos al hecho de que ambas familias están constituidas a partir de una unidad de repetición menor de 120 pb, nos ha llevado a la conclusión que ambas presentan un origen común. Es más, si consideramos repeticiones de 360 pb, esta similitud aumenta de manera considerable, siendo factible alinear las secuencias procedentes de distintas familias con relativa precisión (**Figuras 16 y 22**). Así, el análisis comparativo mediante métodos de inferencia filogenética de trímeros de cada una de estas dos familias de ADN satélite (RAE730 y RAYSI), construidos a partir de 3 subrepeticiones de 120 pb, revela una mayor identidad entre trímeros pertenecientes a la misma familia de ADN satélite (ver **Figura 22**). Esto, junto con que la divergencia entre los trímeros de RAYSI es mayor que la existente entre los trímeros de RAE730, y con que la tasa evolutiva de este último satélite es superior a la de RAYSI, indica que la evolución de estos satélites ha tenido lugar a través de un paso intermedio, implicando un satélite intermediario de 360 pb, y que la duplicación de éste que originó los satélites actuales, ocurrió más recientemente en la familia RAE730 que en RAYSI.

De esta manera, la hipótesis que proponemos, asumiría la existencia de un satélite ancestral de 120 pb (RAE120), que habría dado lugar a uno de 360 pb (RAE360). Durante un cierto tiempo evolutivo habrían coexistido en los genomas de las especies correspondientes, este satélite de 360 pb con otro de 730 (RAE730-Y), originado por la duplicación del primero y que sufrió una amplificación en los cromosomas Y. Posteriormente, tuvo lugar una amplificación similar de RAE360, esta vez en los segmentos cromosómicos del par VI (RAE730-S). Asimismo, eventos de entrecruzamiento desigual, originaron, a partir del satélite RAE730-Y (acumulado en cromosomas Y) la actual familia de ADN satélite RAYSI, de 930 pb.

Ponemos, entonces, de manifiesto en este trabajo el origen común de dos familias de ADN satélite (RAYSI y RAE730), presentes en el genoma de *R. acetosa* y especies estrechamente emparentadas (sección *Acetosa*, subgénero *Acetosa*). Estos satélites, además, habrían sufrido una amplificación y acumulación diferencial (su secuencia ha divergido) en dos zonas del genoma tan particulares como son los segmentos heterocromáticos (en condición polimórfica en poblaciones de Japón e Inglaterra y fijados en el par VI de las poblaciones españolas) y los cromosomas Y. De hecho, tradicionalmente se han relacionado segmentos supernumerarios y cromosomas sexuales (principalmente cromosomas Y), así como cromosomas B (también llamados

supernumerarios), por tratarse de regiones con características comunes (Hewitt, 1979; Amos y Dover, 1981; Jones y Rees, 1982; Camacho et al., 2000; Houben et al., 2000;). Incluso existen hipótesis que establecen el origen de los cromosomas B a partir de los cromosomas sexuales (Hewitt, 1937; López-León, et al., 1994; Sharbel et al., 1998; Camacho et al., 2000).

Normalmente, los cromosomas sexuales, los segmentos supernumerarios así como los cromosomas B, tienen regiones heterocromáticas y acumulan secuencias repetidas (transposones y ADN satélite). Se conoce que los segmentos supernumerarios (*knobs*) de maíz, por ejemplo, están constituidos a partir de secuencias repetidas en tándem y retrotransposones (Ananiev et al., 1998). Los segmentos supernumerarios de *Brachyome dichromosomatica* están constituidos por repeticiones en tándem de un motivo de 92 pb (Houben et al., 2000). Por otro lado, los cromosomas B de la compuesta *Crepis capillaris* (Jamilena et al., 1994) y del saltamontes *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero, et al., 1999), muestran también acumulación de secuencias repetidas. Pero sin duda, el ejemplo mejor conocido es el de los cromosomas Y (Ruiz Rejón et al., 1994; Ali y Hasnain, 2002). Es sabido que una de las etapas finales del proceso de evolución de los cromosomas sexuales (Charlesworth, 1991) implica la inactivación de los genes del cromosoma Y, así como la acumulación por parte de éste de secuencias repetidas, como ADN satélites o transposones (Ruiz Rejón et al., 1994; Sakamoto et al, 1995; Shibata et al., 1999). Es por ello, que el escenario que presenta el género *Rumex* y la acumulación de secuencias repetitivas que hemos descrito, son puntos muy interesantes para el análisis del origen y la evolución de los cromosomas sexuales.

5.4. Evolución de los ADNs satélite RAE180, RAE730, RAYSI y RUSI.-

5.4.1. Análisis comparativo de las tasas de evolución de RAE180, RAE730 y RAYSI.-

Los modelos acerca de la dinámica evolutiva de las secuencias repetitivas, predicen la acumulación preferencial de secuencias dispuestas en tándem en regiones cromosómicas con reducidas tasas de recombinación y con baja presión selectiva en cuanto al tamaño de las repeticiones (Charlesworth et al., 1994). Una de las regiones más estudiadas del genoma con estas características es el segmento diferencial de los cromosomas Y. La supresión gradual de la recombinación entre el cromosoma X e Y da lugar a una degeneración progresiva de los Y por la pérdida de función de la mayoría de los genes que portan (Filatov et al., 2000) y a la expansión de los tándemes de familias repetitivas (Charlesworth 1996; Jobling y Tyler-Smith, 2003). Sin embargo, la degeneración de los cromosomas Y sólo puede ser estudiada en modelos en los que dicho proceso evolutivo está aún operando (Charlesworth, 2002). Así, las plantas dioicas suponen un caso excepcional dada la variedad de especies existentes ilustrando los distintos estadios en la evolución de los cromosomas sexuales (Charlesworth, 2002; Ruiz Rejón, 2004).

R. acetosa, en contraste con otras especies dioicas como *S. latifolia*, ha demostrado ser un excelente modelo para el estudio de acumulación de familias de ADN satélite, ya que sus cromosomas Y son masivamente heterocromáticos y ricos en secuencias de ADN satélite (Ruiz Rejón et al., 1994; Shibata et al., 1999). De hecho, a pesar de que la dioecia ha aparecido en ambos géneros hace aproximadamente el mismo tiempo (Dexfeux y Lejeune, 1996; esta Memoria), las especies dioicas de *Silene* no parecen haber acumulado secuencias repetitivas en sus cromosomas Y (Buzek et al., 1997; Scutt et al., 1997; Garrido-Ramos et al., 1999). Por el contrario, en las especies de *Rumex* con sistemas cromosómicos múltiples, como hemos visto a lo largo de esta Memoria, la degeneración de los cromosomas Y se ha visto acelerada por la acumulación fundamentalmente de las familias RAE180 y RAYSI. Esta acumulación ha ido presumiblemente acompañada por reordenaciones cromosómicas que han dado lugar al sistema XX/XY₁Y₂. Además, en el género *Rumex* existen especies con sistemas simples que como *R. acetosella* y *R. suffruticosus* presentan cromosomas Y no degenerados como en el caso de *S. latifolia*.

Comparando secuencias procedentes de las especies emparentadas *R. acetosa* y *R. papillaris*, nosotros en esta Memoria hemos encontrado tasas de evolución y de homogenización muy bajas en los ADN satélite ligados a los cromosomas Y (RAE180 y RAYSI), en relación a lo que ocurre con las secuencias de RAE730, presente en autosomas (**Tabla 9**). Esta diferencia es especialmente destacable en RAE730 con respecto a RAYSI, ya que a pesar de presentar un origen común, ambas han evolucionado por caminos diferentes a consecuencia de su localización diferencial. Esta idea apoya la idea de que los cromosomas Y en estos sistemas no recombinan y que esta situación afecta en gran medida al patrón evolutivo de las secuencias que éstos portan. Además, la existencia de varias subfamilias dentro de las secuencias RAYSI, podría ser una prueba más para apoyar la existencia de mecanismos que impiden la recombinación entre los cromosomas Y, dado que tales mecanismos, que impiden los intercambios cromosómicos, podrían dar lugar a la formación de estas variantes (Pons y Gillespie, 2003). Además, la variabilidad que hemos encontrado entre monómeros adyacentes en el tándem, es similar a la que encontramos entre repeticiones que no están contiguas. Si la recombinación estuviera teniendo lugar, cabría esperar mayores niveles de homogenización entre secuencias contiguas con respecto a las no contiguas (Schueler et al., 2001).

Una familia de ADN satélite evoluciona rápidamente por medio de evolución concertada (Dover, 1982; Ugarkovic y Plohl, 2002) y presentan una tasa de cambio mayor que cualquier otro tipo de secuencia presente en el genoma eucariota (Ugarkovic y Plohl, 2002). Diferentes mecanismos como el entrecruzamiento desigual y la conversión génica, son causantes de la expansión de las nuevas mutaciones a través de los miembros de la familia, de tal forma que la tasa de esta transferencia horizontal es mayor que la velocidad a la que nuevos cambios aparecen (Dover, 1982, 1986; Ohta y Dover, 1984; Scholetterer y Tautz, 1994). Por lo tanto, los mecanismos que impiden el intercambio cromosómico (vgr. ausencia de recombinación) afectarán negativamente al proceso de la evolución concertada, como es esperable para

las secuencias RAYSI y RAE180 de los cromosomas Y no recombinantes. La tasa de evolución calculada para el ADN satélite del grupo de *Drosophila obscura* es 30×10^{-9} por sitio y por año (Bachmann y Sperlich, 1993). Una tasa de cambio muy alta como lo es también la que nosotros hemos estimado para la familia de ADN satélite RAE730. Concretamente, este valor es de 22×10^{-9} , unas cuatro veces superior a la tasa de cambio de secuencias no repetitivas en plantas (Gaut, 1998). Sin embargo, como habíamos propuesto más arriba, las familias RAE180 y RAYSI están evolucionando a una tasa aproximadamente la mitad de lo obtenido para RAE730 ($11,25 \times 10^{-9}$ y $11,74 \times 10^{-9}$ y $22,00 \times 10^{-9}$, respectivamente- ver **Tabla 10**). De esta manera, nuestros datos apoyan la hipótesis de que las secuencias de ADN satélite presentes en los cromosomas Y muestran unas tasas evolutivas menores que las de los presentes en autosomas.

Para estimar estas tasas evolutivas, y dada la presencia de gran cantidad de polimorfismos compartidos entre las secuencias de las dos especies comparadas, analizamos sitio a sitio los alineamientos, descartando estas posiciones compartidas para el posterior análisis, mientras que el resto de polimorfismos representa las distintas etapas de transición. Tasas evolutivas menores que las obtenidas por nosotros pueden ser calculadas a partir del valor D_a (Nei, 1987), dando lugar a valores de dos a cinco veces mayores para RAE730 (14×10^{-9} ; $D_a=0.056$) que para las secuencias RAE180 (7×10^{-9} ; $D_a=0.028$) y RAYSI-J (3×10^{-9} ; $D_a=0.012$). Sin embargo, este parámetro no distingue entre los polimorfismos nuevos y ancestrales, y por lo tanto, ignoraría los estados de transición en el proceso de diferenciación. Nuestro procedimiento asume que los polimorfismos compartidos son ancestrales. Esta asunción implica cierta subestimación de la divergencia (despreciable con respecto a D_a), ya que no permite distinguir entre polimorfismos ancestrales y mutaciones paralelas. No obstante, es esperable una frecuencia aleatoria de mutaciones paralelas similar para las tres familias de ADN satélite (i.e. comparable subestimación de la divergencia), y por tanto, podríamos también esperar que las variaciones en las tasas evolutivas fueran proporcionales para las tres familias.

Nosotros hemos encontrado que dentro de las unidades repetitivas de RAE180 aproximadamente el 49% de los sitios son polimorfismos compartidos entre *R. acetosa* y *R. papillaris*. Asimismo, para estas dos especies hemos detectado sólo tres sitios prácticamente fijados (lo que supone un 1,5% del total) y un 38% de estados de transición. Estos datos contrastan con lo encontrado en las secuencias RAE730. En este caso, el 4% de las posiciones son polimorfismos compartidos, mientras que el 6,5% representan posiciones fijadas diferencialmente para las dos especies y un 38% constituyen estadios intermedios de transición. Claramente, estos datos apoyan la idea de que la tasa de evolución concertada es menor en las secuencias de RAE180 de los cromosomas Y, que para las secuencias autosómicas de RAE730. El caso de RAYSI es muy similar a lo encontrado en las secuencias RAE180, ya que presenta sólo un 0,3% de posiciones fijadas y un 43% de posiciones en distintos estadios de transición. Sin embargo, al contrario de lo que sucede en RAE180, las secuencias RAYSI de *R. acetosa* y *R. papillaris*, presentan sólo un 5% de polimorfismos compartidos. Esta diferencia en el número de posiciones

polimórficas compartidas se podría explicar asumiendo que las secuencias RAE180 son más antiguas que las de RAYSI, y que por tanto habrían acumulado mayor número de polimorfismos ancestrales. Algo que ha quedado igualmente demostrado en esta Memoria (ver además apartado 5.4.3).

Por último, para completar este estudio hemos analizado secuencias de RAE180 procedentes de autosomas, que aislamos a partir de ADN de hembras de las distintas especies. Cabría esperar que las secuencias de RAE180 presentes en el locus autosómico se comporten como lo hacen las secuencias de RAE730. Sin embargo, hemos detectado que en el caso de RAE180, incluso las secuencias aisladas a partir de autosomas presentan una alta variabilidad intraespecífica, así como valores de divergencia interespecífica elevados. Concretamente, considerando a las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*, observamos que no existen posiciones fijadas diferencialmente y que un 22,3% de las posiciones se encuentran en el estadio II de transición. Un 10,66% de las posiciones son polimorfismos compartidos.

Asumiendo recombinación en el locus autosómico y que las secuencias presentes en los cromosomas Y no recombinaran ni entre sí ni con las secuencias presentes en autosomas, deberíamos esperar una variabilidad baja en autosomas y alta en las secuencias de cromosomas Y. Además, esperaríamos observar de la comparación entre secuencias de ambos loci, la ausencia de polimorfismos compartidos, la presencia significativa de estadios de transición avanzados (IV a VI), así como un alto grado de divergencia entre las secuencias. Sin embargo, muchas de estas condiciones no se cumplen, por lo que descartamos esta hipótesis. La segunda hipótesis que podemos proponer hace las mismas asunciones que la primera, con la salvedad de que en este caso estaría permitida la recombinación entre autosomas y sexuales. Esta nueva consideración, implicaría igualmente una variabilidad intraespecífica baja en autosomas y alta en los cromosomas Y, aunque al ser la divergencia semejante a la variabilidad, esperaríamos observar un alto número de polimorfismos compartidos entre las secuencias de ambos loci, cosa que no observamos. Una tercera y última posibilidad para explicar los datos obtenidos asume que no existe recombinación ni en el locus autosómico, ni entre los cromosomas y, ni entre autosomas y los cromosomas Y. Esta hipótesis explica más satisfactoriamente los datos que hemos obtenido, ya que asumiría alto grado de variabilidad en ambos loci, como así observamos. Asimismo, en la comparación entre ambos, no esperaríamos la presencia de polimorfismos compartidos ni de estados de transición IV-VI, asimismo la divergencia sería alta. Igualmente, los resultados de la comparación entre especies, tanto para las secuencias provenientes de los cromosomas Y como para las procedentes de los autosomas, arrojarían un escaso grado de diferenciación y un elevado número de polimorfismos compartidos y la ausencia de estados de transición avanzados. Eso es exactamente lo que encontramos en las secuencias analizadas. En conclusión, pues, nuestros datos apoyan la ausencia de evolución concertada para el locus autosómico de RAE180, lo que vendría a apoyar una ausencia de intercambio genético por recombinación entre las copias homólogas de este locus. Además, nuestros datos apoyan la ausencia de recombinación entre este locus autosómico y las secuencias RAE180 de los cromosomas Y. Mientras esto segundo era esperable, no lo es tanto la primera

de las conclusiones. Dado que otra familia de ADN satélite presente en el complejo autosómico de estas especies, como es RAE730, evoluciona concertadamente, cabe atribuir la ausencia de evolución concertada en el locus autosómico de RAE180 a que se trata de un locus muy reducido. Según Ugarkovic y Plohl (2002), varias familias de ADN satélite pueden estar coexistiendo en un mismo genoma, constituyendo *librerías*. Cada ADN satélite constituiría una unidad independiente, y su evolución podría ser explicada atendiendo al número de copias y a la secuencia nucleotídica, de manera diferente en las especies que los portan. Así, dentro del conjunto de ADNs satélite compartidos por un grupo de especies sería posible encontrar secuencias más proclives a la amplificación (Fry y Salser, 1977; Ugarkovic y Plohl, 2002), como habría sucedido con el ADN satélite RAE180, en *R. suffruticosus* (amplificado en autosomas) y en *R. acetosa* y especies emparentadas (amplificado en cromosomas Y). El hecho de que este ADN satélite se haya mantenido en un reducido locus autosómico en *R. acetosa* y especies emparentadas, indicaría que los mecanismos de amplificación no están funcionando para esa localización y que, por lo tanto, tampoco existiría homogenización. Por último, es importante destacar que la ausencia de intercambio entre las secuencias RAE180 de los autosomas y las de los cromosomas Ys, así como su diferenciación inicial (ralentizada por la propia ausencia de recombinación intracromosómica), representan una prueba adicional de que las secuencias aisladas a partir de machos pueden ser consideradas provenientes de los cromosomas Y.

5.4.2. Análisis del origen y la evolución de la variabilidad de la familia da ADN satélite RAYSI en *Rumex acetosa* y especies emparentadas.-

En esta Memoria hemos demostrado que RAYSI es una familia de ADN satélite que se encuentra altamente repetida en tándem, de manera exclusiva en los cromosomas Y del sistema complejo XX/ XY_1Y_2 , característico de la especie *R. acetosa* y especies estrechamente emparentadas. Dado que no hemos detectado su presencia en especies con sistemas simples XX/XY, asumimos que la degeneración de los cromosomas Y de las especies con sistemas complejos se habría acelerado por la acumulación y expansión de esta familia de secuencias. Este proceso habría sido favorecido por una serie de reordenaciones que habrían dado lugar a la aparición de los sistemas múltiples. De hecho, la teoría general de la evolución de los cromosomas sexuales, predice que la supresión gradual de la recombinación entre los cromosomas X e Y da lugar a la progresiva degeneración de los cromosomas Y y la consiguiente pérdida de función de la mayoría de los genes (Filatov et al., 2000), así como la amplificación de secuencias repetitivas de distinta índole (Charlesworth, 1996; Jobling y Talyer-Smith, 2003). Para llevar a cabo un estudio de la dinámica evolutiva que las secuencias RAYSI hayan podido tener, y las implicaciones que en la evolución de los cromosomas sexuales esto haya podido tener, hemos seleccionado dos especies estrechamente emparentadas como son *R. acetosa* y *R. papillaris*, y una especie emparentada con ellas, *R. intermedius*, como especie de referencia externa.

Las secuencias RAYSI han sido originadas a través de ciclos recurrentes de duplicación, entrecruzamiento desigual y diferenciación a partir de una secuencia repetitiva ancestral de 120 pb, como se ha discutido anteriormente. De hecho es posible detectar en la secuencia monomérica actual de RAYSI, la presencia de estas subrepeticiones de 120 pb. El tamaño medio de las secuencias analizadas en esta Memoria, se corresponde con 943 pb, lo que supone aproximadamente ocho repeticiones de estas unidades de 120 pb. Sin embargo, nosotros hemos detectado la presencia de dos tipos de secuencias RAYSI, la subfamilia RAYSI-S y la subfamilia RAYSI-J. Las diferencias entre estas dos subfamilias radican en la presencia de 83 sitios que están fijados en los monómeros de una de las dos subfamilias y que son diferentes en cuanto al nucleótido que presentan en ese sitio los monómeros de la otra, así como de varias deleciones diagnósticas que dan lugar al acortamiento en 31 pb (subfamilia RAYSI-S) y 16 pb (subfamilia RAYSI-J) con respecto al tamaño medio calculado. Ambos tipos de secuencias han sido detectados en *R. acetosa*, aunque sólo la subfamilia RAYSI-J se encuentra presente en *R. papillaris*. Adicionalmente, hemos encontrado otras dos subfamilias (INT-A e INT-B) en la especie *R. intermedius*. Estas dos subfamilias se diferencian en unas 30 posiciones diagnósticas, pero no por deleciones características con respecto a las otras dos subfamilias. Tanto en el caso de las subfamilias de *R. acetosa*, como en el caso de las de *R. intermedius*, el árbol filogenético resultante de su estudio muestra un sesgo típico que separa ambos tipos de secuencias en sendos clados de secuencias parálogas (**Figuras 19 y 38**). Encontramos asimismo que considerando el total de las secuencias analizadas de las tres especies, INT-A e INT-B estarían más emparentadas con las secuencias RAYSI-S que con las RAYSI-S, que con las secuencias RAYSI-J de *R. papillaris* (**Figura 41**).

De acuerdo con las relaciones filogenéticas entre estas tres especies, existen diferentes posibilidades para explicar la evolución de RAYSI en este grupo de especies, pero solamente dos de ellas son congruentes con el árbol filogenético mostrado en la **Figura 56**. Una posibilidad es que las familias RAYSI-S y RAYSI-J estuvieran representadas en el genoma del ancestral común de estas tres especies, habiendo desaparecido la primera de *R. papillaris*, y la segunda de *R. intermedius*. *R. acetosa* habría conservado los dos tipos de secuencia. Otra segunda hipótesis, sería la de que la subfamilia RAYSI-J habría aparecido en el ancestral común de *R. acetosa* y *R. papillaris*. Este tipo de secuencia habría reemplazado completamente a RAYSI-S en *R. papillaris* y casi por completo en *R. acetosa*, donde permanecería de manera relíctica. La diferencia fundamental entre los dos escenarios evolutivos propuestos es que la segunda hipótesis asume que la subfamilia RAYSI-S es ancestral y que las diferencias entre las secuencias de *R. intermedius* y las RAYSI-S de *R. acetosa* marcarían la divergencia entre las secuencias RAYSI-S actuales y las secuencias RAYSI ancestrales. Un evento secundario de subdivisión ha debido ocurrir en *R. intermedius* dando lugar a dos subfamilias de RAYSI, que están más próximas entre sí que con el resto de secuencias de la familia. Esta segunda hipótesis parece más probable dado que es más parsimoniosa y está apoyada por las deleciones diagnósticas encontradas en RAYSI-S y RAYSI-J, ausentes de las secuencias RAYSI de *R. intermedius* (INT-A y INT-B), algo que demostraría que estas deleciones son caracteres

derivados con respecto a la longitud original de las secuencias RAYSI, longitud que estaría representada por las secuencias RAYSI actuales de *R. intermedius*. Además, si asumimos la tasa evolutiva (11.74×10^{-9} por sitio y año) de las secuencias RAYSI-J (apartado 5.4.1) como válida para estimar la divergencia entre ambas subfamilias RAYSI-S y RAYSI-J, podríamos determinar que la aparición de ambas subfamilias ocurrió aproximadamente hace 7.5 millones de años. Así, aunque los tiempos de divergencia calculados para las especies de *Rumex* deben ser tomados con precaución, a consecuencia de que no en todas las ramas existe una tasa de cambio constante (apartado 5.1), la separación entre las subfamilias de RAYSI habría ocurrido después de la separación de los linajes que dieron lugar a *R. acetosa* y *R. papillaris* por un lado, y a *R. intermedius* por otro (10 millones de años según nuestros cálculos a partir de los datos de ITS). Por lo tanto, esto habría sucedido también después de la separación de las especies portadoras de secuencias RAYSI (aquellas especies dioicas con sistemas XX/X_1Y_2) y las especies que no las portan (aquellas con sistemas XX/X_1Y_1) (12-13 millones de años).

Las secuencias de ADN satélite se expanden dentro de los genomas por medio de fenómenos de transposición, amplificación mediada por el modelo del círculo rodante más reinserción, entrecruzamiento desigual y conversión génica, aunque la contribución de cada uno de estos factores al proceso no está clara (Charlesworth et al., 1994). Normalmente, estos mecanismos dan lugar a una homogenización intraespecífica, así como una divergencia interespecífica en el tándem, al mismo tiempo que originan la expansión o contracción de los mismos. La ocurrencia de la homogenización intraespecífica y el tiempo para que se lleve a cabo depende de factores como el tamaño de población, el número de copias de la unidad repetitiva, así como las tasas y los sesgos de intercambios no recíprocos (Dover, 1982; Ohta y Dover, 1984). Sin embargo, en la familia de ADN satélite RAYSI no observamos esta homogenización intraespecífica ya que detectamos la presencia de distintas subfamilias de secuencias en las especies *R. acetosa* y *R. intermedius*. Del mismo modo, en las secuencias centroméricas AtCEN de *Arabidopsis thaliana* se diferencian distintos tipos de secuencias o subfamilias que se asocian exclusivamente a determinados cromosomas (Heslop-Harrison et al., 1995) de manera muy similar a lo descrito para el ADN satélite centromérico de mamíferos (Willard y Wayne, 1987a; Alexandrov et al., 1988). Estas subfamilias parecen ser el resultado de la ausencia de intercambios cromosómicos entre cromosomas no homólogos. Esta falta de transferencia de material genético daría lugar a subfamilias específicas de determinados cromosomas en el satélite centromérico alpha de mamíferos (Willard y Wayne, 1987a, b; Alexandrov et al., 1988). Un caso extremo de falta de intercambio de material estaría sucediendo en los cromosomas Y de *R. acetosa* y especies próximas. Según esto, la falta de recombinación daría lugar a tasas de evolución reducidas (como hemos visto anteriormente) y a la aparición de subfamilias (Pons y Gillespie, 2003). Nosotros postulamos que esto es lo que podría estar sucediendo en las secuencias RAYSI presentes en los cromosomas Y del sistema complejo XX/X_1Y_2 de *R. acetosa* y *R. intermedius*. La localización diferencial de RAYSI-S y RAYSI-J en *R. acetosa* (única especie en la que aún coexisten ambas subfamilias) supone una característica adicional que podría

ser explicada por la ausencia de recombinación entre ambos cromosomas Y (Figura 21).

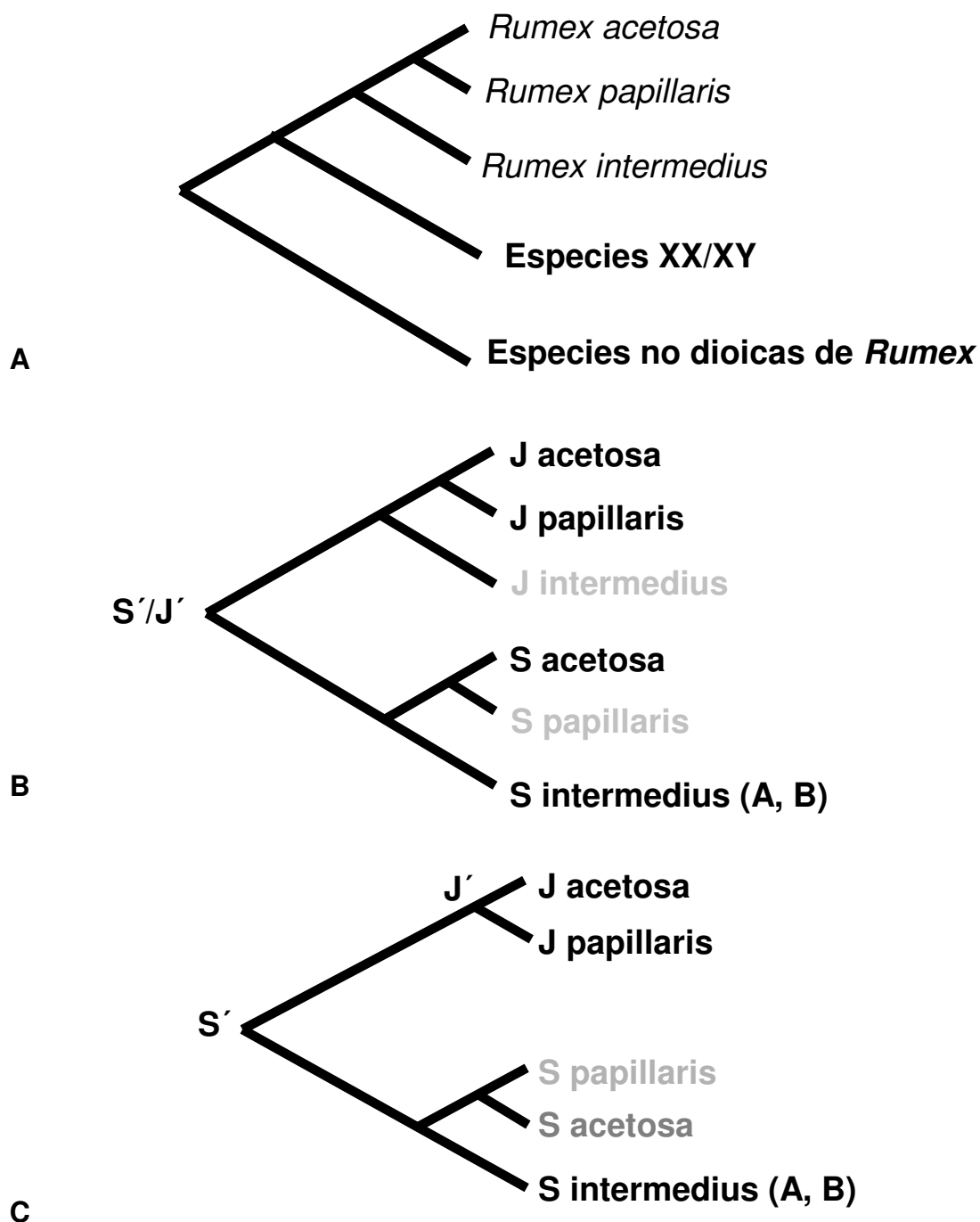


Figura 56: Esquema de la evolución de las secuencias RAYSI. **(A)** Árbol filogenético propuesto para las especies estudiadas. **(B-C)** Dos hipótesis alternativas para explicar la evolución de las subfamilias de RAYSI, (**S'** y **J'**) secuencias RAYSI ancestrales, (**S** y **J**) Secuencias RAYSI actuales, (**sombreado**) secuencias casi o completamente extintas (ver texto para más detalles)

Finalmente, es importante hacer aquí dos consideraciones adicionales. En primer lugar hay que destacar que la variabilidad intraespecífica observada entre las distintas subfamilias de RAYSI reproduce de alguna manera el proceso de la evolución concertada. Así, como hemos destacado, las familias RAYSI-S y RAYSI-J se diferencian en *R. acetosa* por la presencia de 83 posiciones diagnósticas, de la misma manera que lo hacen INT-A e INT-B por medio de 27 de estas posiciones. El estudio de estas secuencias revela que estas posiciones son mutaciones que comparten las repeticiones de la misma variante para cada uno de los sitios considerados. Teniendo en consideración la baja tasa evolutiva de estas secuencias y su diferenciación, cualquiera de las hipótesis propuestas para explicar la evolución de las secuencias RAYSI estaría de acuerdo con un patrón de evolución gradual entre las secuencias INT-A e INT-B y RAYSI-S y RAYSI-J. Ahora bien, asumiendo de los resultados que aquí hemos obtenido, que los cromosomas Y de *R. acetosa* y *R. intermedius* no recombinan entre sí, es necesario recurrir a procesos de recombinación intracromátida, para explicar los fenómenos de homogenización intrasubfamiliar que observamos y que daría lugar a fenómenos de evolución concertada. Esto ha sido anteriormente descrito por Skaletsky et al. (2003) para el caso del cromosoma Y de humanos. Alternativamente, cierta parte de los eventos de homogenización pueden deberse a fenómenos de amplificación mediados por replicación por círculo rodante de formas extracromosómicas circulares y posterior reintegración (Feliciello et al., 2005) u otros mecanismos relacionados.

Esta primera consideración, está conectada con una segunda, que se refiere a la expansión de la subfamilia RAYSI-J y la tendencia a desaparecer que muestra la subfamilia alternativa, RAYSI-S, en *R. acetosa* y *R. papillaris*. De hecho, la subfamilia RAYSI-S ha desaparecido por completo en el genoma de *R. papillaris* y está en proceso de hacerlo en el caso de *R. acetosa*. Este hecho puede explicarse por la intervención del entrecruzamiento desigual en la dinámica evolutiva de los ADNs satélite (Charlesworth et al., 1994). Por el contrario, la subfamilia RAYSI-J ha colonizado diferentes loci de los dos cromosomas Y de *R. acetosa* y *R. papillaris*, lo que apoya la idea de la intervención de fenómenos de replicación por círculo rodante y reintegración (Rossi et al., 1990; Feliciello et al., 2005).

Estos datos, en conjunto con otros expuestos en esta Memoria, nos aportan información muy interesante de la naturaleza de los cromosomas Y no recombinantes de *R. acetosa* y especies emparentadas. Por un lado, la supresión de la recombinación entre ambos cromosomas Y da lugar a la aparición de subfamilias. La aparición y desaparición de estas subfamilias se puede atribuir a mecanismos explosivos de amplificación o eliminación. Por el contrario, las secuencias dentro de cada subfamilia parecen estar evolucionando de manera gradual y cohesiva. Por otro lado, esta falta de recombinación da lugar a tasas evolutivas y de evolución concertada entre especies bajas.

5.4.3. Análisis del origen y la evolución de la familia de ADN satélite RAE180 en las especies dioicas del género *Rumex*.-

En la presente Memoria hemos analizado en profundidad la dinámica evolutiva de la familia de ADN satélite RAE180. Esta familia ha sido detectada como venimos reiterando en todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas de *Rumex* analizadas. Es por ello, que este satélite supone fundamentalmente un marcador cladístico ideal que marca la aparición de la dioecia en este género. Por otro lado, la especie africana *R. sagittatus* representa un linaje en el que la dioecia es un sistema reproductivo aún incipiente, si bien, esta especie no presenta un sistema de cromosomas sexuales maduro (Degraeve, 1976). Es por ello, que podríamos relacionar en cierta medida la acumulación y expansión de las secuencias RAE180, no sólo con la aparición de la dioecia, sino también con el origen de los cromosomas sexuales. Sin embargo, la amplificación en este ADN satélite sólo ha tenido lugar producto de la aparición de los sistemas XX/X_1Y_2 , mientras que en los sistemas XX/X_1Y_2 se encuentra acumulado únicamente en autosomas, por lo menos en *R. suffruticosus*.

Tal y como hemos visto en el apartado 4.1, nosotros hemos estudiado comparativamente las secuencias RAE180 procedentes de las especies *R. acetosa* y *R. papillaris*. Hemos demostrado para este satélite unas tasas de homogenización y de evolución concertada bajas. Para completar el estudio, hemos incluido en esta Memoria el análisis de secuencias de RAE180 aisladas a partir de la especie emparentada *R. intermedius*. El escenario que observamos al introducir estas secuencias en un estudio conjunto con las de las otras dos especies, no varía de lo anteriormente descrito. Esto es, a pesar que la separación de las tres especies tuvo lugar hace unos 10 millones de años según nuestros cálculos, las secuencias de este ADN satélite aparecen entremezcladas en los análisis filogenéticos efectuados. Esta observación se cumple tanto para las secuencias aisladas a partir de cromosomas Y, como para las aisladas a partir del locus autosómico. Todo esto indica que los procesos de homogenización y evolución concertada están impedidos en cierta medida. Ya hemos visto que tales circunstancias pueden estar provocadas por un tiempo corto de divergencia, tasas de evolución reducidas o la falta de homogenización, entre otros factores. De acuerdo con el análisis discutido en el apartado 4.1, el tiempo de vida de este satélite (10 millones de años) sería suficiente como para que la evolución concertada hubiera actuado, como hemos visto es el caso de la familia de ADN satélite autosómica RAE730. Además, hemos demostrado que los cromosomas Y de los sistemas múltiples, de cuya heterocromatina las secuencias RAE180 son principales constituyentes, no recombinan. Nosotros demostramos aquí que esta ausencia de recombinación es causante de una tasa evolutiva reducida en secuencias repetidas ligadas a los cromosomas Y con respecto a las presentes en autosomas, tal y como hemos visto estudiando el patrón evolutivo de las familias RAYSI (ligada a los Y) y RAE730 (de distribución autosómica), que comparten un origen común y que, sin embargo, presentan tasas evolutivas distintas. Las secuencias RAE180 se encuentran asimismo distribuidas en un

reducido locus autosómico. Mediante el estudio de secuencias aisladas a partir de ADN de hembras de las distintas especies, y por tanto procedentes de este locus, hemos detectado también ausencia de evolución concertada y una tasa de homogenización reducida. Dado que otra familia de ADN satélite presente en el complejo autosómico de estas especies, como es RAE730, evoluciona concertadamente, cabe atribuir la ausencia de evolución concertada en el locus autosómico de RAE180 a que se trata de un locus muy reducido, y que de acuerdo con la teoría de las *librerías* de ADN que anteriormente hemos mencionado (Fry y Salser, 1977; Ugarkovic y Plohl, 2002) su amplificación en ese locus autosómico estaría, por ahora al menos, limitada, al igual que su homogenización.

El hecho de que una familia de ADN satélite esté presente en autosomas y en los cromosomas Y simultáneamente, como ocurre con la familia RAE180, ha sido reseñado por algunos autores como una característica interesante, éste es el caso de algunas secuencias repetidas en humanos (Cooper et al., 1992) o del ADN satélite FA-SAT del gato doméstico, *Felis catus* (Santos et al., 2004). Estudios de mapeo comparativo han demostrado que la diferenciación de autosomas y cromosomas sexuales ha ocurrido de forma independiente (Graves y Shetty, 2000), por lo que la existencia de una secuencia en ambos loci podría ser considerada como una condición muy primitiva (Gallagher et al., 1999). Esto junto con la amplia distribución de esta familia de ADN satélite, como muestran los experimentos de hibridación tipo *Southern-blot* y *dot-blot* realizados a lo largo de esta Memoria, podría indicar la significativa antigüedad de este satélite, y su presencia en los cromosomas sexuales antes incluso de que el proceso de degeneración se iniciase, datándose según nuestra filogenia en unos 15-16 millones de años.

Por otro lado, hemos analizado secuencias RAE180 aisladas de las especies *R. acetosella* y *R. suffruticosus*, ambas caracterizadas por un sistema de cromosomas sexuales XX/XY. En estas especies hemos observado una alta identidad intraespecífica (1,5% y 5% respectivamente) que indicaría un éxito notable, sobre todo en comparación a lo que ocurre en *R. acetosa* y las otras especies comparadas, de los mecanismos de homogenización, tanto en secuencias aisladas a partir del ADN de machos como de hembras, no existiendo diferenciación alguna entre los dos sexos, dado que ambos comparten el mismo locus RAE180 autosómico. Este hecho contrasta fuertemente con lo que ocurre en las especies con sistemas XX/XY₁Y₂ analizadas. Además, para la especie *R. acetosella* hemos detectado que la familia de ADN satélite RAE180 presenta una organización superior consistente en, al menos, cinco unidades monoméricas, alcanzando un tamaño de repetición de unos 800 pb. En contraposición a lo que sucede en las especies con sistemas múltiples de cromosomas sexuales, al analizar la distribución de esta familia de ADN satélite en las especies con sistemas cromosómicos simples, detectamos que se encuentra presente exclusivamente en autosomas, en forma de un bloque prominente de heterocromatina, estando completamente ausente de los cromosomas sexuales. Al menos así se deduce de los resultados de hibridación *in situ* en *R. suffruticosus*, aunque quedaría por confirmar lo que ocurre en *R. acetosella*. Tal y como sucedía con la familia de ADN satélite RAE730, presente en autosomas de especies con sistemas

complejos, las secuencias de RAE180 en *R. acetosella* y *R. suffruticosus*, evolucionan concertadamente. Asumimos que la disposición de estos satélites en forma de grandes bloques de heterocromatina favorece el intercambio cromosómico durante la meiosis y por tanto la homogenización de sus secuencias (Dover, 1982). De hecho, los propios mecanismos implicados en la amplificación de esta región serían los responsables de su homogenización (Dover, 1982).

5.4.4. Equilocalidad y evolución concertada: la familia de ADN satélite RUSI.-

En la presente Memoria hemos aislado por primera vez una familia de ADN satélite caracterizada por repeticiones de unos 170 pb y presente en las especies *R. induratus* y *R. scutatus*, a la que hemos llamado RUSI (ver apartado 4.7 del capítulo de Resultados). Nosotros hemos llevado a cabo un estudio de la secuencia de este nuevo ADN satélite, así como de su localización cromosómica.

El dato más significativo, es que hemos encontrado secuencias de RUSI distribuidas en las regiones subteloómicas en ambos brazos de la mayoría de los cromosomas (**Figura 47**). Significativamente algunos cromosomas presentan señales de hibridación en la región pericentromérica. Hasta ahora, varios habían sido los casos descritos en la bibliografía de ADNs satélite presentes en zonas subteloómicas (la familia *Sac I* de *Silene* –Garrido-Ramos et al., 1999; la familia *Dra I* de la familia *Sparidae*– Garrido-Ramos et al., 1998; de la Herrán et al., 2001 y la familia *EcoRV* de *Zamia*– Cafasso et al., 2003) y centroméricas (*D. melanogaster*– Lohe y Roberts, 1988; satélite α humano– Willard, 1990 y Tyler-Smith y Willard, 1993; satélite centromérico menor de ratones– Wong y Rattner, 1988). Pero hasta la fecha, el caso del satélite SatCH5 del hamster chino (Faravelli et al., 1998), distribuido en la zona pericentromérica y en la subteloómica del brazo corto del cromosoma cinco, y el caso que aquí presentamos de la familia RUSI, son los únicos casos descritos en los que un ADN repetitivo se localiza en dos regiones tan características del genoma, como son las regiones subteloómicas y las centroméricas. De hecho, la idea tradicional que se ha mantenido hasta la actualidad es que la composición de la heterocromatina centromérica es distinta a la de la cromatina terminal subteloómica, como ha sido demostrado en cetáceos (Arnason et al., 1978) o en la especie *Atractomorpha similis* (John et al., 1986). La co-localización de este ADN satélite en las dos regiones mencionadas representa una excepción al principio de equilocalidad de la heterocromatina, fundamentalmente desarrollado por Schweizer y Loidl (1987) para explicar los mecanismos capaces de generar repeticiones en tándem en sitios equivalentes en cromosomas no homólogos. Excepción que sólo se había descrito para satélites amplificados en ciertos cromosomas que, por sus características particulares, eran objeto de este tipo de amplificaciones. Así, por ejemplo, las mayores excepciones al principio de equilocalidad se han observado en cromosomas supernumerarios o cromosomas B (Camacho et al., 2000), en segmentos supernumerarios (Houben et al., 2000; Shibata et al., 2000b) o en cromosomas sexuales (Charlesworth et al., 1994), cuyo mayor

exponente en el caso de plantas es, precisamente, el estudiado en esta Memoria (Ruiz Rejón et al., 1994; Shibata et al., 1999). Sin embargo, existen casos más notables como el de la familia de ADN satélite MCSAT amplificada en el cromosoma 1 de *Muscari comosum*, responsable de la asimetría característica que ha acontecido en la evolución cariotípica de las especies del género *Muscari* (De la Herrán et al., 2001). Es curioso, sin embargo, por inusual, la co-localización pericentromérica y subtelomérica en varios cromosomas de la familia de ADN satélite RUSI que supondría la primera excepción conocida para esta regla hasta la fecha.

Encontramos un caso en la bibliografía que podría explicar en cierta medida la particular distribución de RUSI. Así, la evolución cromosómica del genoma del ciervo (género *Muntiacus*) parece haber sufrido un proceso de reducción a través de ciertos eventos de fusión cromosómica. Concretamente, es posible encontrar secuencias repetitivas propias de las zonas centroméricas distribuidas de manera intercalar a lo largo de algunos de sus cromosomas fruto de estos procesos de fusión (Yang et al., 1997). En el caso que aquí nos ocupa, inversiones, translocaciones, así como otros eventos de reordenación cromosómica podrían estar involucrados. Si bien, los datos obtenidos en esta Memoria son aún insuficientes para extraer alguna conclusión sólida y sin duda la cuestión de la evolución cromosómica de las especies *R. induratus* y *R. scutatus*, centrará parte de nuestras futuras investigaciones.

Por otro lado, hemos comparado secuencias monoméricas procedentes de ambas especies entre sí. A pesar de que se observa cierta tendencia a la agrupación entre las secuencias de una misma especie, los valores de bootstrap que apoyan estas separaciones no son significativos. Además, existe un mayor número de estadios de transición incipientes que avanzados (124 sitios I-III frente a 5 sitios IV-VI). Hemos visto a lo largo de esta Memoria, que varios pueden ser los motivos por los que el mecanismo de evolución concertada no funcione. Entre estos motivos, estarían el escaso tiempo de divergencia entre dos especies, el número de repeticiones, la distribución de éstas en uno, unos pocos o muchos loci, etc.. (Dover, 1982). Es evidente que en el caso del satélite RUSI, existen muchos loci en los que está distribuido, principalmente a nivel subtelomérico. Sin embargo, existen numerosas evidencias que demuestran que los ADN satélites dispuestos equilocalmente suelen evolucionar concertadamente como en el caso de los ADN satélite centroméricos (Garrido-Ramos et al., 1999). En el caso de los ADN subteloméricos la configuración bouquet (Harper et al., 2004) de los cromosomas durante la meiosis favorece la asociación entre cromosomas no homólogos y el intercambio terminal entre ellos. Además, es significativo destacar que la recombinación entre cromosomas no homólogos a nivel subtelomérico no provocaría las alteraciones estructurales cromosómicas que provocarían entrecruzamientos en otras regiones. Con respecto al tiempo de divergencia, nosotros hemos estimado que la separación de *R. induratus* y *R. scutatus* ocurrió hace 2,5 millones de años, tiempo equiparable a la separación entre *R. acetosa* y *R. papillaris*, especies en las que hemos comprobado que este tiempo es suficiente para que la evolución concertada actúe, al menos cuando no existen limitaciones a la recombinación. Es cierto, sin embargo, que se requiere el estudio de mayor número de secuencias (fundamentalmente de

R. scutatus), pero esta baja tasa de evolución concertada podría ser entonces atribuible a la existencia de algún tipo de restricción debido a la localización de esta familia de ADN satélite. De hecho, esta familia está representada en múltiples loci no equilocales distribuidos por todo el complemento autosómico. Es factible pensar que estos loci no intercambiarán material libremente y que por lo tanto los procesos de evolución concertada se verían limitados.

5.5.- Evolución de los sistemas de cromosomas sexuales en el género *Rumex*.-

Se acepta que los cromosomas sexuales han evolucionado a partir de una pareja de autosomas varias veces a lo largo de la evolución tanto en animales como en plantas (Muller, 1918). La convergencia evolutiva que supone este fenómeno sugiere la intervención de fuerzas evolutivas relativamente simples (Hodgkin, 1992). De hecho, es posible distinguir una serie de pasos evolutivos en el proceso de aparición y evolución de los sistemas de cromosomas sexuales (Charlesworth et al., 2002) (ver **Figura 57**). Así, un primer evento incluye la aparición de los genes determinantes del sexo y su ligamiento en loci muy reducidos. Este estrecho ligamiento impide en gran medida la aparición de fenotipos no adaptativos, fundamentalmente intersexos e individuos estériles. El siguiente paso evolutivo es el cese de la recombinación de manera progresiva en las regiones circundantes a los loci portadores de los genes responsables del sexo (Nicolas et al., 2005), de tal manera que se establece una región apareante o pseudoautosómica y una región no homóloga. De esta manera se favorece el mantenimiento y establecimiento definitivo del sistema de cromosomas sexuales. Un tercer evento evolutivo, consecuencia del anterior, es la acumulación por parte del cromosoma Y de secuencias repetitivas de distinta índole (ADNs satélite y secuencias retrotransponibles fundamentalmente) (cf. Ruiz Rejón, 2004), así como la aparición de distintas reordenaciones cromosómicas. El resultado es la degeneración de la mayoría de los genes portados por este cromosoma (Filatov et al., 2000). Estos sistemas de cromosomas sexuales marcadamente heteromórficos pueden dar lugar a su vez a sistemas de cromosomas sexuales múltiples por medio de diversos mecanismos. Un cuarto paso evolutivo está relacionado con la compensación de dosis génica, fundamentalmente por la inactivación de uno de los cromosomas X de hembras (ver **Figura 57**).

Esta teoría de la evolución de los cromosomas sexuales, ha sido fundamentalmente desarrollada a partir de los sistemas de cromosomas sexuales de mamíferos, principalmente de humanos (Ali y Hasnain, 2003; Skaletsky et al., 2003; Ross et al., 2005). Sin embargo, estos sistemas presentan el principal inconveniente de que son sistemas muy antiguos (se estima que la separación que posteriormente dio lugar al actual cromosoma Y humano ocurrió hace unos 200-300 millones de años) y por lo tanto llevados a término. Esto hace muy difícil acceder a las primeras etapas o a estadios intermedios de su evolución. Es por ello que en los últimos años los estudios sobre cromosomas sexuales se están centrando en nuevos modelos. Por un lado, se trata de modelos que son capaces de reproducir las etapas de la formación de los sistemas sexuales, como el caso de los cromosomas sexuales

de neoformación de *Drosophila* (Bachtrog y Charlesworth, 2002). Por otro, son modelos que portan sistemas de cromosomas sexuales jóvenes y por tanto, en etapas incipientes de su formación, como ocurre con los cromosomas sexuales de peces (Phillips et al., 2005) y particularmente con los de plantas (cf. Ruiz Rejón, 2004).

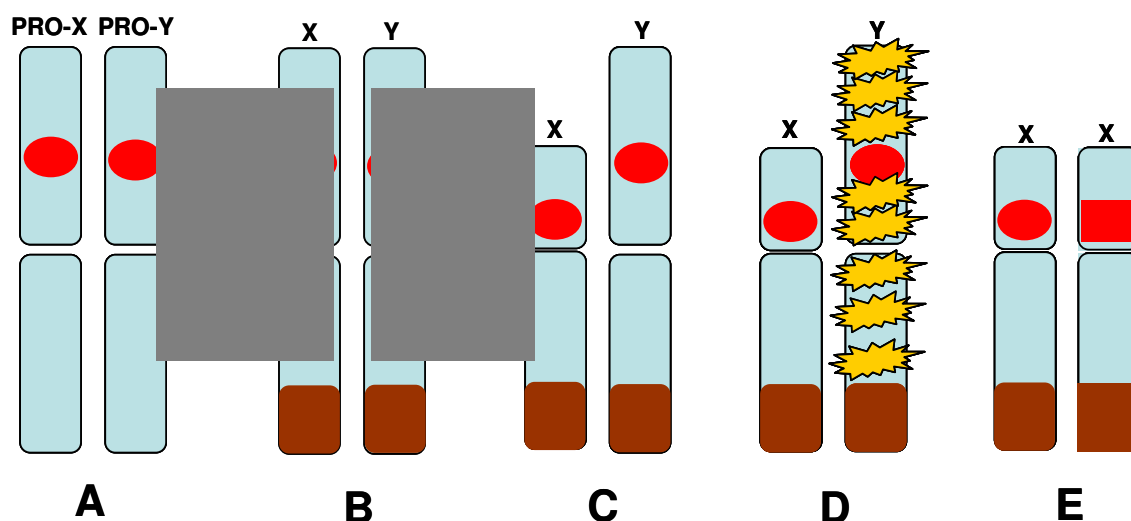


Figura 57: Esquema representativo de los distintos pasos evolutivos que describe la teoría de la evolución de los cromosomas sexuales. **(A)** Aparición de los genes determinantes del sexo y ligamiento. **(B)** Cese de la recombinación entorno a la región que contiene a esos genes. **(C)** Aparición de cromosomas sexuales heteromórficos. **(D)** Acumulación de secuencias repetitivas de distinta índole en el cromosoma Y, acompañada de distintas reordenaciones cromosómicas. **(E)** Compensación de dosis, generalmente por inactivación de uno de los cromosomas X de hembras

Nosotros en esta Memoria hemos estudiado el caso del género *Rumex* (*Polygonaceae*). Este género es interesante desde el punto de la evolución de los sistemas sexuales ya que, por un lado, incluye especies emparentadas con sistemas reproductivos diversos (monoecia, dioecia, hermafroditismo, poligamia, ginodioecia) y por otro presenta especies dioicas con sistemas de cromosomas sexuales en distintos estadios de evolución. De hecho, este género ha centrado diversos trabajos sobre determinación sexual en plantas en los últimos años (Lengerova y Vyskot, 2001; Stehlik y Blattner, 2004; Ainsworth et al., 2005).

Con respecto a los sistemas de cromosomas sexuales en el género *Rumex*, nosotros hemos estudiado una serie de especies representativas. Así, hemos analizado especies con sistemas cromosómicos simples XX/XY, portadoras de sistemas de control genético del sexo del tipo X/Y, como son las especies *R. acetosella* y *R. suffruticosus*. Asimismo, hemos analizado la especie *R. acetosa* y especies emparentadas, todas ellas caracterizadas por un sistema múltiple XX/XY₁Y₂ y un control genético del sexo del tipo X/A.

Los datos recogidos en este trabajo indican que los cromosomas Y de sistemas múltiples habrían comenzado a degenerar molecularmente por la

masiva acumulación de secuencias de ADN satélite (concretamente la familia RAE180 y RAYSI). La región pseudoautosómica en estos casos habría quedado reducida a una pequeña porción en ambos extremos del cromosoma X, por donde ambos Y aparean. Por su parte, los cromosomas sexuales de los sistemas simples XX/XY están en un estadio evolutivo intermedio. En este sentido, se trata de cromosomas sexuales heteromórficos en los que una amplia zona de desapareamiento se ha originado ya. Es significativo destacar la presencia de un bivalente sexual heteromórfico en la especie *R. acetosella*, cuyo nivel tetraploide hemos analizado en esta Memoria (**Figura 52**). Estos datos, junto con la dificultad manifiesta para encontrar poblaciones diploides de esta especie, apuntan a una posible diploidización de su cariotipo, algo que incluiría a los cromosomas sexuales, tal como propuso en su día Smith (1969) y estaría de acuerdo con lo observado para esta especie por Degraeve (1980). Sin embargo, sería necesario analizar más poblaciones para comprobar el estatus real de representación del nivel diploide, así como estudiar otros niveles de ploidía. Por otro lado, es importante reseñar también que en esta Memoria se ha analizado cromosómicamente por primera vez el endemismo ibérico *R. suffruticosus*. Hemos demostrado para esta especie la presencia de un bivalente sexual marcadamente heteromórfico, en el que existe una amplia zona de desapareamiento durante la meiosis, y cuyos elementos axiales se muestran altamente heteromórficos en cuanto a tamaño se refiere (**Figura 55**). La configuración de este par sexual en estas dos especies (*R. acetosella* y *R. suffruticosus*) recuerda mucho a la presentada por algunas especies dioicas del género *Silene* (Grabowska-Joachimik y Joachimik, 2002; Ruiz Rejón, 2004) en cuanto a morfología y en cuanto a grado de diferenciación evolutiva entre el cromosoma X y el Y. Además, al igual que ocurre en las especies dioicas de *Silene* (Buzek et al., 1997; Scutt et al., 1997; Garrido-Ramos et al., 1999), ninguna de las dos especies presentan signos evidentes de degeneración de sus cromosomas Y. Al menos no se puede deducir nada en este aspecto en cuanto a las familias de ADN satélite aquí estudiadas. Sin embargo, parece destacable aquí mencionar la naturaleza particular de estos cromosomas Y dado que no muestran bandas C patentes y presentan unas bandas DAPI + difusas, en cierta medida semejante al comportamiento ambiguo que muestra la heterocromatina de los cromosomas Y de *R. acetosa* (Ruiz Rejón et al., 1994; Mosiolek et al., 2005). Hemos encontrado, que estas especies de sistemas cromosómicos simples comparten la familia de ADN satélite RAE180 con las especies de sistemas complejos. Si bien, en las primeras, este ADN satélite se encuentra acumulado exclusivamente en autosomas, no existiendo evidencias de su presencia en cromosomas sexuales.

Por último, de acuerdo con todo lo visto en el apartado 4.1 de esta Memoria, demostramos que el ancestral común de todas las especies dioicas debió presentar un sistema XX/XY, con un número cromosómico básico $x=8$ (**Figura 58**). Este ancestral común dio lugar a la aparición de los dos subclados en los que pueden dividirse las especies dioicas según la filogenia molecular que aquí presentamos.

Por un lado, en el clado constituido por las especies con sistemas simples, ha tenido lugar una reducción cromosómica desde $x=8$ hasta $x=7$, como ocurre en el clado constituido por *R. acetosella* y *R. graminifolius* (ambas

$x=7$) o en el formado por *R. suffruticosus* ($x=8$) y *R. paucifolius* ($x=7$) (ver **Figura 58**). Asimismo, distintos eventos de reducción cromosómica habrían dado lugar a los niveles $x=5$ y $x=4$ de las razas de Texas y North Carolina de *R. hastatulus*. La reducción desde $x=5$ hasta $x=4$, con la aparición de un sistema complejo XX/XY_1Y_2 , a partir de uno simple, XX/XY , tuvo lugar a través de un proceso de translocación desigual, como lo demuestra la existencia de la raza intermedia de Illinois (Smith, 1972).

Con respecto al origen del subclado constituido por *R. acetosa* y especies emparentadas y a la aparición de este sistema de cromosomas sexuales complejo XX/XY_1Y_2 , dos hipótesis han sido propuestas. Así, asumiendo que el ancestral común de este grupo es una especie con un sistema cromosómico XX/XY y con $x=7$, la aparición del sistema cromosómico complejo habría tenido lugar mediante un proceso de misdivisión, como propuso Wilby (1987) para este género. La misdivisión ha sido también propuesta para explicar la aparición de isocromosomas en otros sistemas (James et al., 1997). Por otra parte, si se asume que el ancestral común es una especie XX/XY , pero con $x=8$, la aparición de los sistemas de cromosomas complejos de *R. acetosa* y especies emparentadas debería ser explicada por la mediación de un proceso de translocación desigual entre una pareja de autosomas y la antigua pareja de cromosomas sexuales XY , tal y como proponíamos para las distintas razas de *R. hastatulus*. Este proceso ha sido descrito, por ejemplo, en la formación de los sistemas de cromosomas sexuales múltiples de *D. miranda* (Steinemann, 1982) y del pez *Hoplias malabaricus* (Luiz et al., 1997). A pesar de lo expuesto, es necesario matizar la naturaleza marcadamente diferente de los cromosomas sexuales de sistemas múltiples del linaje de *R. hastatulus*, con respecto a los del linaje de *R. acetosa*. Como se ha demostrado en esta Memoria, los eventos que dieron lugar a ambos sistemas ocurrieron en momentos distintos de la evolución. Además, los cromosomas Y de *R. acetosa* están fuertemente degenerados por la acumulación de distintas familias de ADN satélite y por tanto, heterocromáticos, cosa que parece no ocurrir en los cromosomas Y de la raza de North Carolina de *R. hastatulus* (observaciones propias).

Como última consideración, hay que mencionar la caracterización de los loci ribosómicos que se ha hecho en esta Memoria para las especies *R. acetosa*, *R. acetosella* y *R. suffruticosus* (por primera vez aquí para estas dos últimas especies). Los datos recogidos de esta caracterización nos indican que los fenómenos de reducción cromosómica observados en el grupo han debido de ir acompañados por otros fenómenos de reordenación cromosómica de distinta índole. Así, la unidad ribosómica 45S estaría en el nivel $x=7$ representada en dos (una de ellas inactiva- *R. acetosa*) o en cuatro parejas de autosomas (nivel $4n$ de *R. acetosella*), estando presente solamente en una pareja autosómica en el nivel $x=8$ (*R. suffruticosus*) (**Figuras 50, 52 y 54**). De manera análoga, la unidad 5S, estaría representada en dos parejas en el nivel $x=7$ (*R. acetosella*, $4n$), mientras que sólo existe en una en el nivel $x=8$ (*R. suffruticosus*). Estos resultados cobran especial importancia cuando consideramos niveles poliploides. En la especie *R. acetosella*, cuyo nivel tetraploide hemos analizado en esta Memoria, nosotros hemos propuesto una posible diploidización de su cariotipo, habiendo descrito la presencia de un par

sexual heteromórfico. Sin embargo, el número de la unidad ribosómica 45S parece corresponder (en función de lo obtenido en *R. acetosa*) a una mera duplicación de origen poliploide. Se abre aquí la incógnita de si los cromosomas sexuales en *R. acetosella* aparecieron antes del evento de poliploidización. En este caso, los cromosomas sexuales se habrían diploidizado, mientras que el número de copias de la unidad 45S se habría mantenido constante. En este supuesto, sería necesario hacer algún estudio de expresión para ver cuántas de esas copias se mantienen activas. La otra posibilidad es que los cromosomas sexuales hayan aparecido en *R. acetosella* *a posteriori* con respecto a la poliploidización, en cuyo caso, la mayoría de las copias de los distintos genes no estarían diploidizadas.

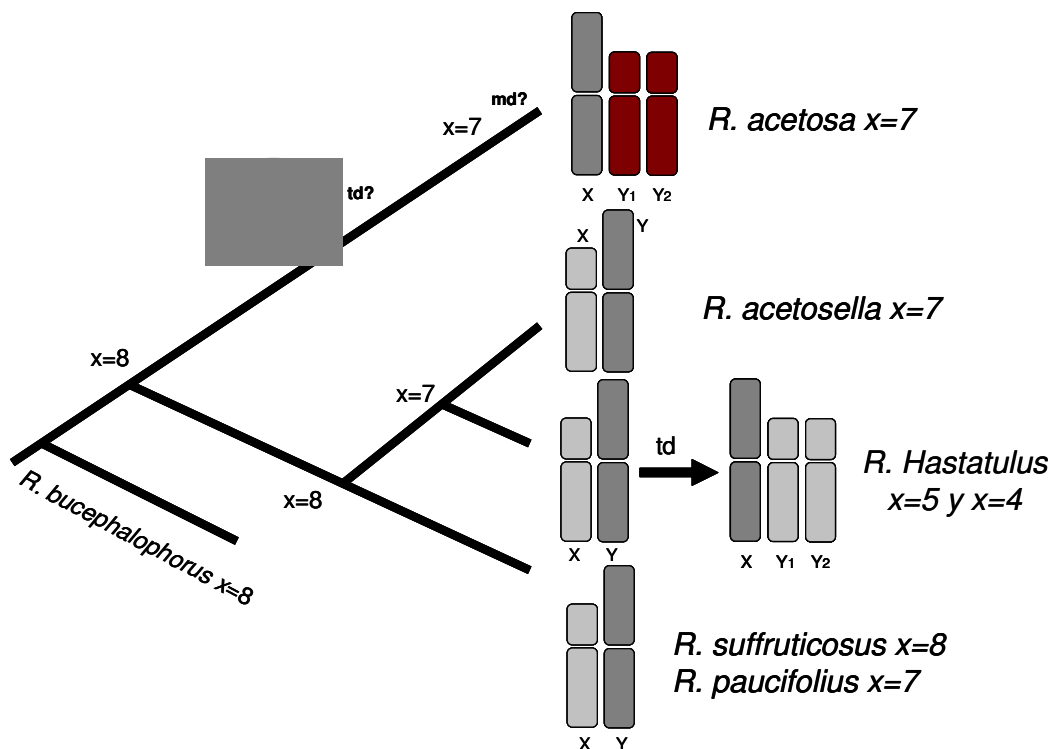


Figura 58: Representación esquemática de la evolución de los cromosomas sexuales en el género *Rumex* (ver texto para más detalles). **(td)** Translocación desigual XY-autosomas. **(md)** Misdivisión del cromosoma Y. **Nota:** los cromosomas Y de *R. acetosa* se muestran en otro color para indicar su grado de degeneración molecular

6.- CONCLUSIONES

PRIMERA.- Hemos realizado en esta Memoria una revisión de la filogenia del género *Rumex*, basándonos en distintos marcadores moleculares citoplasmáticos y nucleares. Fruto de este trabajo, proponemos una revisión de la clasificación actual. Concretamente, hemos detectado un origen común para todas las especies dioicas de distribución euroasiática y americana de los subgéneros *Acetosa* y *Acetosella*, que junto con la especie *R. bucephalophorus*, del subgénero *Platypodium*, constituyen un clado consistentemente apoyado. Por ello proponemos la desaparición de los subgéneros *Acetosella* y *Platypodium*, y la inclusión de ambos en otro subgénero más amplio, formado por las especies dioicas mencionadas y *R. bucephalophorus*. Un segundo grupo lo constituirían las especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas del subgénero *Acetosa*. Asimismo, en este grupo encontramos a la especie dioica africana *R. sagittatus*, que no presenta cromosomas sexuales, y cuyo linaje estaría evolucionando secundariamente hacia la dioecia a través de un estadio que incluye la ginodioecia como sistema reproductivo intermediario. Finalmente, nuestra nueva clasificación encuentra coherente mantener el subgénero *Rumex*, dado que encontramos una fuerte agrupación de todas las especies del mismo en un único clado.

SEGUNDA.- De acuerdo con lo obtenido en nuestra clasificación, el sistema de control genético del sexo basado en la relación entre el juego de autosomas y el número de cromosomas X, habría evolucionado a partir de uno más antiguo basado en la presencia de un cromosoma Y activo, tal y como parece haber ocurrido en la evolución de las dos razas (North Carolina y Texas) de *R. hastatulus*.

TERCERA.- Los sistemas de cromosomas sexuales múltiples XX/XY_1Y_2 , han aparecido dos veces a lo largo de la evolución del género *Rumex* a partir de sistemas cromosómicos simples XX/XY . Una vez, en el linaje que dio lugar a *R. acetosa* y especies emparentadas, y otra en el que originó la variante cromosómica de North Carolina de la especie *R. hastatulus*.

CUARTA.- La nueva sistemática que aquí proponemos para el género *Rumex* es consistente con la evolución de los sistemas reproductivos y con la evolución cariotípica del grupo. Así, habría tenido lugar una reducción cromosómica desde el nivel $x=10$ de las especies hermafroditas, hasta el nivel $x=8$ y $x=7$, característico de especies dioicas, con una serie de estadios intermedios $x=9$ de especies hermafroditas, polígamas y ginodioicas. Una reducción adicional hasta $x=5$ y $x=4$ habría tenido lugar en el clado constituido por las dos razas cromosómicas de la especie dioica *R. hastatulus*.

QUINTA.- Hemos analizado tres familias de ADN satélite en esta Memoria relacionadas con *R. acetosa* y especies emparentadas. Concretamente, hemos aislado y caracterizado: 1) la familia RAE180, constituyente mayoritario de la heterocromatina de los cromosomas Y y presente en un reducido locus autosómico; 2) la familia RAYSI, específica de cromosomas Y; y 3) la familia RAE730, presente en segmentos heterocromáticos de una pareja cromosómica autosómica. Asimismo, hemos caracterizado por primera vez la familia de ADN satélite RUSI, a partir de las especies *R. scutatus* y *R. induratus*. Esta familia se localiza en regiones subteloméricas y pericentroméricas de varios cromosomas del cariotipo de *R. induratus*. Esta localización podría suponer una excepción al principio de equilocalidad de la heterocromatina y podría afectar a la dinámica evolutiva de dicho

satélite. Así, un estudio de las secuencias pertenecientes a la familia RUSI aisladas a partir de las dos especies analizadas, revela tasas de homogenización y evolución concertada moderadas.

SEXTA.- El análisis de la distribución de estas familias de ADN satélite en las distintas especies del género *Rumex*, ha demostrado que se trata de secuencias restringidas a grupos muy emparentados de especies. Además, hemos probado en este trabajo su eficacia como marcadores cladísticos para este género. Así, hemos detectado que las familias RAYSI y RAE730 se han acumulado específicamente en especies dioicas emparentadas con *R. acetosa*, portadoras de sistemas XX/XY_1Y_2 . Asimismo, hemos probado que la familia RAE180 se encuentra presente en todas las especies dioicas de distribución euroasiática y americana del grupo, marcando el origen de la dioecia. Esta última familia, se habría acumulado y expandido específicamente en los cromosomas Y de sistemas complejos, interviniendo activamente en su degeneración. Por el contrario, no hemos detectado su implicación en la degeneración de los sistemas de cromosomas sexuales XX/XY , ya que en estas especies se encuentra presente únicamente en una pareja de autosomas. Por su parte, la familia RUSI, se encuentra restringida a las dos especies de las que fue aislado, *R. scutatus* y *R. induratus*. Estas dos especies se encuentran estrechamente emparentadas.

SÉPTIMA.- Nuestros análisis apuntan a que las familias RAE730 y RAYSI (presentes en los segmentos cromosómicos autosómicos heterocromáticos y en los cromosomas Y, respectivamente) están formadas por secuencias con un origen común, a partir de duplicaciones de una secuencia inicial de 120 pb. Esta secuencia se habría amplificado 6 veces hasta dar lugar a un satélite de 730

pb (RAE730), mientras que el satélite RAYSI estaría formado por 8 de estas repeticiones. El patrón evolutivo seguido por estas secuencias supone tres etapas. En una primera etapa, se originó por duplicación, a partir de la unidad de 120 pb, un satélite de 360 pb. Una segunda duplicación originó un satélite de 730 pb que se habría acumulado específicamente en los cromosomas Y, a partir del de 360 pb y con el que habría coexistido. Posteriormente, mecanismos de entrecruzamiento desigual habrían dado lugar a la familia RAYSI, a partir del satélite de 730 pb. Finalmente, una nueva duplicación del satélite de 360 pb, habría dado lugar al satélite de 730 pb que se acumuló específicamente en los segmentos cromosómicos autosómicos (RAE730).

OCTAVA.- El análisis comparativo de las secuencias de ADN satélite de dos especies emparentadas como son *R. acetosa* y *R. papillaris*, indican que los satélites ligados a los cromosomas Y (RAE180 y RAYSI), presentan tasas de cambio y de evolución concertada cuyos valores representan aproximadamente la mitad de los de las secuencias presentes en autosomas (RAE730). Estos datos apoyan fuertemente la idea de que los cromosomas Y no recombinan entre sí, y que esto afecta considerablemente al patrón evolutivo de las secuencias que portan. Esto se observa especialmente con claridad en los patrones de las secuencias RAE730 y RAYSI, que a pesar de compartir un origen común, evolucionan de forma distinta en función de su localización.

NOVENA.- Hemos analizado comparativamente el patrón evolutivo de la familia de ADN satélite RAE180 en todas las especies dioicas del grupo. Así, en las especies con sistemas complejos XX/XY₁Y₂, comprobamos que sus tasas de evolución concertada y homogenización son muy reducidas, tanto en autosomas como en cromosomas Y. Sin embargo, en especies con sistemas simples

XX/XY, donde la localización es exclusivamente autosómica, observamos tasas de homogenización y evolución concertada muy elevadas, sugiriendo de esta manera, un patrón evolutivo diferente en función de la localización y el grupo de especies considerado.

DÉCIMA.- Hemos detectado la aparición de diferentes subfamilias de la familia de ADN satélite RAYSI, fruto de la particular naturaleza no recombinante de los cromosomas Y de las especies *R. acetosa*, *R. papillaris* y *R. intermedius*. Concretamente, *R. acetosa* y *R. intermedius* presentan dos subfamilias en sus genomas (RAYSI-S y RAYSI-J e INT-A e INT-B, respectivamente), mientras que *R. papillaris* sólo tiene una, la subfamilia RAYSI-J. Comparaciones entre las subfamilias RAYSI-S y RAYSI-J o entre INT-A e INT-B, revelan que se encuentran diferenciadas por la presencia de una serie de posiciones diagnósticas. Con respecto a la evolución de este ADN satélite, nuestros análisis sugieren que la subfamilia RAYSI-J ha aparecido en el ancestral común de *R. acetosa* y *R. papillaris*, habiendo sido reemplazada completamente la subfamilia RAYSI-J (caso de *Rumex papillaris*) o casi reemplazada (caso de *Rumex acetosa*). Este escenario asume que la subfamilia RAYSI-S debería ser considerada ancestral y que un evento secundario de subdivisión habría ocurrido en *R. intermedius*, con sus subfamilias RAYSI más estrechamente ligadas entre sí que con cualquiera de las otras dos. Nuestros análisis, sugieren además que las distintas subfamilias han divergido de manera gradual y cohesiva, probablemente a través de procesos de intercambio intracromátida, mientras que su expansión o contracción en número, podría ser explicada por ciclos alternantes de amplificación y desaparición explosivas.

UNDÉCIMA.- Hemos analizado citogenéticamente distintos sistemas de cromosomas sexuales en el género *Rumex*. Por un lado, hemos analizado especies con sistemas múltiples XX/XY_1Y_2 , como *Rumex acetosa* y *Rumex papillaris*. Hemos demostrado que estos cromosomas forman un trivalente sexual en la meiosis masculina, en el que los extremos del cromosoma X aparecen asociados a cada uno de los Y por una pequeña región homóloga, existiendo una amplia región con ausencia de complejo sinaptonémico que incluye la región intersticial del cromosoma X así como el resto de los cromosomas Y. Estas especies parecen estar en un estadio evolutivo muy avanzado considerando la teoría actual de los cromosomas sexuales. Así, hemos demostrado que los cromosomas Y de estos sistemas se encuentran altamente degenerados por la acumulación de al menos dos familias de ADN satélite, las familias RAE180 y RAYSI. Por otro lado, hemos analizado especies con sistemas de cromosomas sexuales simples, XX/XY , como *Rumex acetosella* y *Rumex suffruticosus*. Estas especies se encuentran en un estadio intermedio en cuanto a la evolución de sus cromosomas sexuales se refiere. Concretamente, hemos observado la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos, que presentan una marcada zona no homóloga de asinapsis. Podemos, por tanto, asumir que existen mecanismos que impiden la recombinación de este par cromosómico generando una región diferencial entre ambos cromosomas sexuales. Sin embargo, por los datos obtenidos en esta Memoria a partir del análisis de las distintas familias de ADN satélite, no nos es posible evaluar el grado de degeneración de los cromosomas Y de estos sistemas, ya que no hemos detectado la acumulación de ninguna de las secuencias aquí estudiadas. Sin embargo, por lo menos en *R. suffruticosus*, estos cromosomas Y son DAPI negativos aunque no muestran bandas C patentes.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Adegoke, J. A., Arnason, U. & Widegren, B. (1993). Sequence organization and evolution, in all extant whalebone whales, of a satellite DNA with terminal chromosome localization. *Chromosoma* 102:382-388.

Ainsworth, C. C., Lu, J., Winfield, M. & Parker, J. S. (1999). Sex determination by X:autosome dosage: *Rumex acetosa* (sorrel). In: Ainsworth, C. C. Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited.
Ainsworth, C. C., Lu, J., Winfield, M., Parker, J. S. 1999. Sex determination by X:autosome dosage: *Rumex acetosa* (sorrel). In: Ainsworth, C.C.(Ed) Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited, pp 124-136.

Ainsworth, Ch., Parker, J. & Buchanan-Wollaston, V. (1998) Sex Determination in Plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:167-223.

Alexandrov, I. A., Mitkevich, S. P. & Yurov, Y. B. (1988). The phylogeny of human chromosome specific alpha satellites. *Chromosoma* 96:443-453.

Alexandrov I, Kazakov A, Tumeneva I, Shepelev V, & Yurov Y. (2001). Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma* 110(4):253-66.

Ali, S. & Hasnain, S.E. (2002). Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene* 283(1-2):1-10.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-2402.

Amos, A. & Dover, G. (1981). The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* 81:673-690.

Ananiev, E. V., Phillips, R. L. & Rines, H. W. (1998). Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9: retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* 149:2025-2037.

Arnason, U., Purdom, I. F. & Jones, K. W. (1978). Conservation and chromosomal localization of DNA satellites in baleenopteroïd whales. *Chromosoma* 66:141-159.

Arnason, U., Höglund, M. & Widegren, B. (1984). Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans. *Chromosoma* 89:238-242.

Arnheim, N. (1983). Concerted evolution of multigene families. In: Evolution of genes and proteins. Koehn, R. & Nei, S. (eds.). Sinauer, Boston, 38-61.

Bachmann L, Sperlich D (1993) Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. *Mol Biol Evol* 10:647–659

Bachtrog D (2003a) Adaptation shapes patterns of genome evolution on sexual and asexual chromosomes in *Drosophila*. *Nat Genet* 34:215–219

Bachtrog, D. (2003a). Adaptation shapes patterns of genome evolution on sexual and asexual chromosomes in *Drosophila*. *Nat. Genet.* 34,215-219.

Bachtrog D. (2003b) Accumulation of Spock and Worf, two novel non-LTR retrotransposons, on the neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Mol Biol Evol* 20:173–181

Bennet M. D., Bhandol, P. & Leitch, I. J. (2000). Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses 807 new estimates. *Annals of Botany* 86: 859-909.

Bennett, M. D. & Smith, J.B. (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274: 227-274.

Bennett, M. D. & Smith, J.B. (1991). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 334: 309-345

Blackburn, H. & Greider, C. W. (1995). *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bogenberger, J. M., Neitzel, H. & Fittler, F. (1987). A highly repetitive DNA component common to all *Cervidae*: its organization and chromosomal distribution during evolution. *Chromosoma* 95:d154-161.

Bonnier, G. & Layens, G. (1968). *Flore complète portative de la France de la Suisse et de la Belgique*. Imp. Créte Paris.

Bouchard, R. A. (1976). DNA amount and organisation in some lower vascular plants. Ph.D. Thesis. University of Chicago.

Britten, R. J. & Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-540.

Brutlag, D. L. (1980). Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annu. Rev. Genet.* 14:121-144.

Brutlag, D. L., Appels, R. Dennis, E. S. & Peacock, W. J. (1977). Highly repeated DNA in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology* 112:31-47.

Buzek J, Koutníková H, Houben A, Ríha K, Janousek B, Siroky J, Grant S, Vyskot B (1997) Isolation and characterization of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chromosome Res* 5:57–65

Caballero, A. (1995). On the effective size of populations with separate sexes, with particular reference to sex-linked genes. *Genetics* 139:1007-1011.

Cabrero, J., López-León, M. D., Bakkali, M. & Camacho, J. P. M. (1999). *Heredity* 83:435-439.

Camacho, J. P., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355:163-178.

Charlesworth, B. & Charlesworth, D. (1978). A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am. Nat.* 112:975-977.

Charlesworth, B. (1985). Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. In: Greenwood PJ, Slatkin M (eds) *Evolution-eassy in honour of Maynard Smith*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 237-268.

Charlesworth, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science* 251:1030-1033.

Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.*6:149–162.

Charlesworth, B., Sniegowski, P. & Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.

Charlesworth, D. (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88:94-101.

Charlesworth, D. (2004). Plant Evolution: Modern Sex Chromosomes. *Current Biology* 14,R271-R273.

Choo, K. H. A. (1997). *The Centromere*. Oxford University Press.

Clark, M. S., Parker, J. & Ainsworth, C. C. (1992). Repeated DNA and heterochromatin structure in *Rumex acetosa*. *Heredity* 70:527-536.

Cohen, S. N. & Kopecko, D. J. (1976). Structural evolution of bacterial plasmids: role of translocating genetic elements and DNA sequence insertions. *Fed. Proc.* 35:2031-2036.

Csink A. K. & Henikoff, S. (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics* 14:200-204.

De la Herrán R, Robles F, Cuñado N, Santos JL, Ruiz Rejón M, Garrido-Ramos MA, Ruiz Rejón C (2001) A heterochromatic satellite DNA is highly amplified in a single chromosome of *Muscari* (*Hyacinthaceae*). *Chromosoma* 110:197–202

De la Herrán, R., Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Rossi, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M. & Garrido-Ramos, M. A. (2001b). Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Molecular Biology and Evolution* 18(1):432-436.

De la Herrán, R., Robles, F., Cuñado, N., Santos, J. L., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M. A. & Ruiz Rejón, C. (2001a). A heterochromatic satellite DNA is highly amplified in a single chromosome of *Muscari* (*Hyacinthaceae*). *Chromosoma* 110:197-202.

Degraeve, N. (1975a) Contribution à l'étude cytotaxonomique des *Rumex*. I. Le genre *Rumex* L. *Sensu stricto*. *Caryologia* 28:187-201.

Degraeve, N. (1975b) Contribution à l'étude cytotaxonomique des *Rumex*. II. Le genre *Bucephalophora* Pau. *Caryologia* 28(2):203-206.

Degraeve, N. (1976). Contribution à l'étude cytotaxonomique des *Rumex*. IV Le genre *Acetosa* Mill. *La Cellule* 231-240.

- Desfeux, C., & B. Lejeune.** (1996). Systematics of Euromediterranean silene (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences. *C. R. Acad. Sci. III* 319:351–358.
- Desfeux, C., S. Maurice, J. P. Henry, B. Lejeune, and P. H. Gouyon.** (1996). Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc. R Soc. Lond. B* 263:409–414.
- Devilee, P., Slagboom, P., Cornelisse, C.J., and Pearson, P.L.** (1986). Sequence heterogeneity within the human alphoid repetitive DNA family. *Nucleic Acids Res.* 14: 2059-2073
- Donehower, L. & Gillespie, D.** (1979). Restriction site periodicities in highly repetitive DNA of primates. *Journal of Molecular Biology* 134:805-834.
- Donnison, I. S. & Grant, S. G.** (1999). Male sex-specific DNA in *Silene latifolia* and other dioecious plant species. In: Ainsworth, C. C. Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Doolittle, W. F. & Sapienza, C.** (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603.
- Doré, C.** (1990). Asparagus anther culture and field trials of dihaploids and F1 hybrids. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.12 Haploid in Crop Improvement I* (ed.) Bajaj, Y. P. S. Springer-Verlag, Berlin, 322-345.
- Dover G (1982) Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111–117
- Dover G (1986) Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 2:159–165
- Dover, G.** (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111-117.
- Dover, G.** (1986). Molecular drive in families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetics* 2:159-165.
- Dover, G.** (1993). Evolution of genetic redundancy for advanced players. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:902-910.
- Dover, G.** (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299,111-117.
- Doyle, J.J., & J.L. Doyle.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11–15.

Drouin, G. & Dover, G. (1990). Independent gene evolution in the potato actin gene family demonstrated by phylogenetic procedures for resolving gene conversions and the phylogeny of angiosperm actin genes. *Journal of Molecular Evolution* 31:132-150.

Duke, J. A. (1983). *Medicinal Plants of the Bible*. Trado-Medic Books, Owerri, NY.

Duke, J. A. (1992). *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. Boca Raton, FL. CRC Press.

Edelman, G. M. & Gally, J. A. (1970). Arrangement and evolution of eularyotic genes. In: F. O. Schmitt (ed.), *The neurosciences: second study program*. Rockefeller University Press, New York, 962-972.

Eickbush, T. H. (1997). Telomerases and retro-transposons: which came first?. *Science* 277:911-912.

Elder, J. R. & Turner, B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quaterly Review of Biology* 70:297-320.

Falavigna, A., Tacconi, M. G. & Soressi, G. P. (1983). Progress in the síntesis of F1 hybrids asparagus following in vitro androgenesis. *Genet. Agr.* 37:164-165.

Farris, J. S., M. Ka'llersjo", A. G. Kluge, and C. Bult. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319.

Feliciello, I., Picariello O., Chinali, G. (2005). The first characterisation of the overall variability of repetitive units in a species reveals unexpected features of satellite DNA. *Gene* 349,153-64.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:738-791.

Fesenko I. A., Khrustaleva, L.I. & Karlov, G. I. (2002). Organization of the 378 bp satellite repeat in terminal heterochromatin of *Allium fistulosum*. *Genetika* 38(7):894-903.

Filatov DA, Moneger F, Negrutiu I, Charlesworth D (2000) Low variability in a Y-linked plant gene and its implications for Y-chromosome evolution. *Nature* 404:388–390

Filatov, D. A. & Charlesworth, D. (2002). Substitution rates in the X-linked genes of the plants, *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Molecular Biology Evolution* 19(6):898-907.

Filatov, D.A., Laporte, V., Vitte, C., Charlesworth, D. (2001). DNA diversity in sex-linked and autosomal genes of the plant species *Silene latifolia* and *Silene dioica*. *Mol. Biol Evol.* 8(8),1442-1454.

Fiori, A. (1969). *Nuova flora analitica d'Italia*. Edagricole vol 1.

Flavell, R.B. (1986). Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil. Trans. Roy. Soc.* 312B: 227-242.

Font Quer, P. (2000). *Diccionario de Botánica*. Ediciones Península s.a.

Fournier, P. (1961). *Les quatre flores de la France*. Editions Paul Lechevalier.

Fry, K. & Salser, W. (1977). Nucleotide sequence of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordi* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* 12:1069-1084.

Gall, J. G. & Antherthon, D. D. (1974). Satellite sequences in *Drosophila virilis*. *Journal of Molecular Biology* 85:633-664.

Garrido-Ramos MA, de la Herrán R , Ruiz Rejón M, Ruiz Rejón C (1999) A subtelomeric satellite DNA family isolated from the genome of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome* 42:442–446

Garrido-Ramos, M. A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C. & Ruiz Rejón, M. (1994). Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenetic and Cell Genetics* 65:233-237.

Gaut BS (1996) Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Evol Biol* 30:93–120

Gaut, B.S. (1998). Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Evolutionary Biology* 30:93-120.

Gilson, E., Perrin, D., Clement, J. M., Szmelcman, S., Dassa, E. & Hofnung, M. (1986). Palindromic units from *E. coli* as binding sites for a chromoid-associated protein. *FEBS Lett.* 206:323-328.

Graur, D. & Li, W. H. (1999). Fundamentals of molecular evolution. 2nd edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Gregory, T. R. & Hebert, P. D. (1999). The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Research* 9:317-324.

Grellet, F., Delcasso, D., Panabieres, F. & Delseny, M. (1986). Organization and evolution of a higher plant alphoid-like satellite DNA sequence. *Journal of Molecular Evolution* 187:495-507.

Gretarsdottir, G. & Arnason, U. (1992). Evolution of the common cetacean highly repetitive DNA component and the systematic position of *Orcaella brevirostris*. *Journal of Molecular Evolution* 34:201-208.

Guttman, D. S. & Charlesworth, D. (1998). An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature* 393:1009-1014.
Guttman, D. S., and D. Charlesworth. 1998. An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature* 393:1009–1014.

Hall, S. E., Kettler, G. & Preuss, D. (2003). Centromere satellites from Arabidopsis populations: maintenance of conserved and variable domains. *Genome Research* 13(2):195-205.

Harrison, G.E., Heslop-Harrison, J.S. (1995). Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*. *Theor Appl Genet* 90,157-165.

Heitz, E. (1933). Die somatische heteropknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genitische bedeutung. *Z. Zellforsch* 20:237-287.

Heitz, E. (1934). Über alpha and beta heterochromatinization sowie konstanz und bau der chromomeren bei *Drosophila*. *Biol. Zentrallbl.* 54:588-609.

Henthorn, P. S., Mager, D. L., Huisman, T. H. J. & Smithies, O. (1986). A gene deletion ending within a complex array of repeated sequences 3' to the human beta-globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5194-5198.

Hewitt, G. M. (1979). Grasshoppers and crickets. In: John, B.(ed.) *Animal Cytogenetics*, vol. 3, Insecta 1, Orthoptera.

Higgins D., Thompson, J., Gibson T. Thompson, J. D., Higgins D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting position-

specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Higgins, C. F., McLaren, R. S. & Newbury, S. F. (1988). Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion?. *Gene* 72:3-14.

Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.

Hodgkin, J. (1992). Genetic sex determination mechanisms and evolution. *BioEssays* 14:253:261.

Holder, M. & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Genetics* 4:275-284.

Horz, W. & Altenburger, W. (1981). Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucleic Acids Research* 9:683-696.

Houben, A., Wanner, G., Hanson, L., Verlin, D., Leach, C. R. & Timmis, J. N. (2000). Cloning and characterization of polymorphic heterochromatic segments of *Brachyome dichrosomatica*. *Chromosoma* 109:206-213.

Hyrien, O., Debatisse, M., Buttin, G. & De Saint Vincent, B. R. (1987). A hotspot for normal amplification joints in a mosaic of Alu-like repeats and palindromic A+T-rich DNA. *EMBO J* 6:2401-2408.

Israelewski, N. (1983). Structure and function of an AT-rich, interspersed repetitive sequence from *Chironomus thummi* solenoid DNA 142 bp palindrome-frame and homologies with the sequence for site-specific recombination of bacterial transposons. *Nucleic Acids Research* 11:6985-6996.

Jacobsen, S. E. & Meyerowitz, E. M. (1997). Hypermethylated *SUPERMAN* Epigenetic Alleles in *Arabidopsis* *Science* 277:1100-1103.

Jamilena, M., Ruiz Rejón, C. & Ruiz Rejón, M. (1993). Repetitive DNA sequence families in *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 102:272-278.

Jamilena, M., Ruiz Rejón, C. & Ruiz Rejón, M. (1994). A molecular análisis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *Journal of Cell Science* 107:703-708.

Jantsch, M., Hamilton, B., Mayr, B., & Schweizer, D. (1990). Meiotic chromosome behaviour reflects levels of sequence divergence in *Sus scrofa domestica* satellite DNA. *Chromosoma* 99: 330-335.

Jobling MA, Tyler-Smith C (2003) The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4:598–612

John, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: Heterochromatin. Molecular and structural aspects. R. S. Verma (ed). Cambridge University Press 1-147.

Jones , R. N. & Rees , H. (1982). B Chromosomes. Academic

Joyner, K. L., Wang, X. R., Johnston, J. S., Price, H.J. & Williams, C. G. (2001). DNA content for Asian pines parallels New World relatives. *Canadian Journal of Botany* 79: 192-196.

Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. 21-132 in: Munro, H. D. (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic press, New York.

Kazama, Y., Sugiyama, R., Matsunaga, S., Shibata, F., Uchida, W., Hizume, M., Kawano, S. (2003). Organization of the KpnI family of chromosomal distal-end satellite DNAs in *Silene latifolia*. *J Plant Res.* 116(4),317-326.

Kelley, R. L. & Kuroda, M. I. (1995). Equality for X-chromosomes. *Science* 270:1607-1610.

Kihara, H. & Ono, T. (1925). The sex-chromosomes of *Rumex acetosa*. *Z. Indukt. Abst. U. Vererb.* 39:1-7.

Kipling, D. (1995). The Telomere. Oxford University Press Inc., New York.

Korpelainen, H. (2002). A genetic method to resolve gender complements investigations on sex ratios in *Rumex acetosa*. *Molecular Ecology* 11:2151-2156.

Krawinkel, V., Zobelein, G. & Bothwell, A. L. M. (1986). Palindromic sequences are associated with sites of DNA breakage during gene conversion. *Nucleic Acids Research* 14:3871-3882.

Kubis, S., Schmidt, T. & Heslop-Harrison J. S. (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany* 82:42-45.

Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B. & Nei, M. (2001). MEGA 2: molecular evolutionary genetics análisis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Lardon, A., Aghmir, S., Georgiev, F., Monéger, F. & Negrutiu, I. (1999). The Y chromosome of white champion: sexual dimorphism and beyond. In: Ainsworth, C. C. Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited.

Lee, M. S.Y. (2001). Uninformative characters and apparent conflict between molecules and morphology. *Mol. Biol. Evol.* 18:676–680.

Lengerova, M. & Vyskot, B. (2001). Sex chromatin and nucleolar analyses in *Rumex acetosa* L. *Protoplasma* 217:147-153.

Lengerova, M., Moore, R.C., Grant, S.R., Vyskot, B. (2003). The sex chromosomes of *Silene latifolia* Revisited and Revised. *Genetics* 165,935-938.

Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York.

Lewin, B. (1997). *Genes VI*. Oxford University Press Inc., New York.

Lewis, D. (1942). The evolution of sex in flowering plants. *Biol. Rev.* 17: 46-67.

Li, W. (1997). *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Liu, Z., Moore, P.H., Ma, H., Ackerman, C.M., Ragiba, M., Pearl, H.M., Kim, M.S., Charlton, J.W., Yu, Q., Stiles, J.I., Zee, F.T., Paterson, A.H., Ming, R. (2004). A primitive Y chromosome in Papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427,348-352.

López González, G. (1990). In: Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F. Paiva, J. & Villar, L. *Flora Iberica* vol. II. CSIC, Real Jardín Botánico de Madrid, Madrid, Spain.

López-León, M. D., Neves, N., Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, T. S., Hewitt, G. M. & Camacho, J. P. M. (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2:87-92.

López-León, M. D., Vázquez, P., Hewitt, G. M. & Camacho, J. P. (1995). Cloning and sequence análisis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75(4):370-375.

Löve A (1944) Cytogenetic studies on *Rumex* subgenus acetosella. *Hereditas* 30:1–136

Löve A (1967) IOPB chromosome number reports XIII. *Taxon* 16:448–454

Löve, A. & B. Kapoor. (1967). A chromosome atlas of the collective genus *Rumex*. *Cytologia* 32:320–342.

Löve, A. (1957). Sex determination in *Rumex*. *Proc. Genet. Soc. Can.* 2:31–36.

Macas, J., Meszaros, T., Nouzova, M. (2002). PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics* 18(1):28-35.

Manuelidis, L. (1982). Repeated DNA sequences and nuclear structure. In: Dover, G. & Flavell, R. B. (ed.). Academic Press, New York 263-285.

Maresca, A. & Singer, M. F. (1983). Deca-satellite: a highly polymorphic satellite that joins α -satellite in the african green monkey genome. *Journal of Molecular Biology* 164:493-511.

Mariotti, B., Navajas-Pérez, R.,

Martínez, J. L., Edström, J. E., Morcillo, G. & Díez, J L. (2001). Telomeres of *Chironomus thummi* are characterized by different subfamilies of complex DNA repeats. *Chromosoma* 110:221-227.

Marziani, G., Caporali, E. & Spada, A. (1999). Search for genes involved in asparagus sex determination. In: Ainsworth, C. C. Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited.

McCarthy, C. (1996-1998). School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus. Southport, Queensland, Australia.

McGregor, H. C. & Sessions, S. K. (1986). The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: an evolutionary perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lonf. B*, 312:243-259.

Mosyakin, SL & Wagner WL. (1998). Notes to two alien taxa of *Rumex* L. (*Polygonaceae*) naturalized in the Hawaiian Islands. Bishop Museum Occasional Papers, 55:39-44.

Mravinac, B., Plohl, M., Mestrovic, N. & Ugarkovic, D. (2002). Sequence of PRAT satellite DNA “frozen” in some coleopteran species. Journal of Molecular Evolution 54:774-783.

Muller, H. J. (1918) Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. Genetics 3:422-499.

Muller, H. J. (1925). Why polyploidy is rarer in animals than in plants. Am. Nat. 59:346-353.

Murray, M. G., Peters, D. L. & Thompson, W. F. (1981). Ancient repeated sequences in the pea and mung bean genomes and implications for genome evolution. Journal of Molecular Evolution 17:31-42.

Nakao, S., Matsunaga, S., Sakai, A., Kuroiwa, T & Kawano, S. (2002). RAPD isolation of a Y chromosome specific ORF in a dioecious plant, *Silene latifolia*. Genome 45:413-420.

Navajas-Pérez, R., de la Herrán, R., González López, G., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M.A. (2005a). The Evolution of Reproductive Systems and Sex-Determining Mechanisms Within *Rumex* (*Polygonaceae*) Inferred from Nuclear and Chloroplastial Sequence Data. Mol Biol Evol 22,1929-1939.

Navajas-Pérez, R., de la Herrán, R., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M.A. (2005b). Reduced rates of sequence evolution of Y-linked satellite DNA in *Rumex* (*Polygonaceae*). J. Mol. Evol 60(3), 391-399.

Navajas-Pérez, R., Schwarzacher, T, de la Herrán, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M & Garrido-Ramos, MA. (200x). The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives. Gene, *in press*.

Negrutiu, I., Vyskot, B., Barbacar, N., Georgiev, S. & Moneger, F. (2001). Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. Plant Physiology 127:1418-1424.

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia Press, New York.

Obermayer, R., Leitch, I. J., Hanson, L. & Bennett, M. D. (2002). Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes. *Annals of Botany* 90: 209-217.

Ohno, S. (1972). So much "junk" in our genomes. *Brookhaven Symp. Biol.* 23:366-370.

Ohri, D. & Khoshoo, T. N. (1986). Genome size in gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution* 153: 119-132.

Ohsima, A., Inouye, S. & Inouye, M. (1992). In vivo duplication of genetic elements by the formation of stem-loop DNA without an RNA intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1016-1020.

Ohta T, Dover G (1984) The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108:501–521

Ohta, T. (1990). How gene families evolve. *Theor. Pop. Biol.* 37:213-219.

Okada, S. et al. (2001). The Y chromosome in the liveworth *Marchantia polymorpha* has accumulated unique repeat sequences harboring a male-specific gene. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 98(16),9454-9459.

Ono, T. (1935). Chromosomen und sexualität von *Rumex acetosa*. *Sci. Rep. Tôhoku Univ., Ser 4*, 10:41-210.

Orgel, L. E. & Crick, F. H. C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607.

Page, R. D.M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12:357–358.

Pardue, M. L. & Henning, W. (1990). Heterochromatin: junk or collectors item?. *Chromosoma* 100:3-7.

Parker, J. S. & Clark, M. S. (1991). Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Science* 80:79-92.

Parker, J.S. 1990. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. *Chromosomes Today* 10,187-198.

Peacock, W. J., Lohe, A. R., Gerlach, W. L., Dunsmuir, P., Dennis, E. S. & Appels, R. (1977). Fine structure and evolution of DNA heterochromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:1121-1135.

Peil, A., Flachowsky, H., Schumann, E., Weber, W.E. (2003). Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor Appl Genet* 107,102-109.

Peña-Chocarro, L. & Zapata Peña, L. (1997). Higos, ciruelas y nueces: aportación de la arqueobotánica al estudio del mundo botánico. *Isturitz* 9:679-690.

Plohl, M. & Cornudella, L. (1996). Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax trunculus*: analysis of sequence variations and divergence. *Gene* 169:157-164.

Plohl, M. & Cornudella, L. (1997). Characterization of interrelated sequence motifs in four satellite DNAs and their distribution in the genome of the mollusc *Donax trunculus*. *Journal of Molecular Evolution* 44:189-198.

Plohl, M. & Ugarkovic, D. (1994a). Analysis of divergence of *Alphitobius diaperinus* satellite DNA- roles of recombination, replication and its relation to other bovine satellite sequences. *Journal of Molecular Biology* 158:293-304.

Plohl, M. & Ugarkovic, D. (1994b). Characterization of two abundant satellite DNAs from the mealworm *Tenebrio obscurus*. *Journal of Molecular Evolution* 39: 489-495

Plohl, M., Lucijanic-Justic, V., Ugarkovic, D., Petitpierre, E. & Juan, C. (1993). Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Trilobium confusum*. *Genome* 36:467-475.

Plohl, M., Mestrovic, N., Bruvo, B. & Ugarkovic, D. (1998). Similarity of structural features and evolution of satellite DNAs from *Palorus subdepressus* (Coleoptera) and related species. *Journal of Molecular Evolution* 46:234-239.

Plucienniczak, A., Skowronski, J. & Jaworski, J. (1982). Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. *Journal of Molecular Biology* 158:293-304.

Pons J, Gillespie RG (2003) Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus Tetragnatha: Evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. *Gene* 313:169–177

Pons J, Petitpierre E, Juan C (2002) Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (*Tenebrionidae*, *Coleoptera*). *Mol Biol Evol* 19:1329–1340

Pons, J., Bruvo, B., Juan, C., Petitpierre, E., Plohl, M. & Ugarkovic, D. (1997). Conservation of satellite DNAs in species of the genus *Pimelia* (*Tenebrionidae*, *Coleoptera*). *Gene* 205:183-190.

Posada, D. & K. A. Crandall. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.

Qiao, Y. & Falavigna, A. (1990). An improved *in vitro* anther culture method for obtaining doubled haploid clones of asparagus. *Acta Hortic.* 271:145-150.

Radic, M. Z., Lundgren, L. & Hamkalo, B. A. (1987). Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell* 50:1101-1108.

Rechinger, K. H. (1964). The genus *Rumex*. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M. & Webb, D. A. *Flora Europaea*. Cambridge University Press vol 1. pp 82–89

Rechinger, K.H. (1937). The North American species of *Rumex*. *Field Mus. Nat. Hist. Bot. Ser.* 17:1–151.

Renner, S. S., and H. Won. (2001). Repeated evolution of dioecy from monoecy in *Siparuna* (*Siparunaceae*, *Laurales*). *Syst. Biol.* 50:700–712.

Renner, S.S., Ricklefs, R.E. (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Am. J. Bot.* 82,596-606.

Rohde, A., Grunau, C. De Beck, L., Van Montagu, M., Rosenthal, A. & Boerjan, W. (1999). Carpel, a new *Arabidopsis* epi-mutant of the *SUPERMAN* gene: phenotypic analysis and DNA methylation status, *Plant Cell Plant Cell Physiology* 40:961-972.

Rossi, M.S., Reig, O.A., Zorzopulos, J. (1990). Evidence for rolling-circle replication in a major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Mol. Biol. Evol.* (4),340-350.

Rozas, J. & Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.

Rudgley, R. (1999). *The Lost Civilizations of the Stone Age*, New York: The Free Press

Ruiz Rejón M (2004) Sex chromosomes in plants. In: Encyclopedia of plant and crop science. Vol IV, Dekker Agropedia. Marcel Dekker, New York, pp 1148–1151

Ruiz Rejón, C., Jamilena, M., Garrido Ramos, M., Parker, J. S. & Ruiz Rejón, M. (1994). Cytogenetic and molecular analysis of the multiple sex chromosome system of *Rumex acetosa*. *Heredity* 72:209-215.

Ruiz-Lara, S., Prats, E., Sainz, J. & Cornudella, L. (1992) Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA from the mollusc *Mytilus edulis*. *Gene* 117:237-242.

Saito N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425

Saito, N. & Nei, M. (1987). The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 4:406-425.

Sakamoto, K., Ohmido, N., Fukui, K., Kamada, H., Satoh, S. (2000). Site-specific accumulation of a LINE-like retrotransposon in a sex chromosome of the dioecious plant *Cannabis sativa*. *Plant Mol. Biol.* 44,723-732.

Sakamoto, K., Shimomura, K., Komeda, Y., Kamada, H. & Satoh, S. (1995) A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Physiol.* 36(8): 1549-1554

Salvo Tierra, E. (1990). Guía de Helechos de la Península Ibérica y Baleares. Ediciones Pirámide s.a.

Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

Schlotterer C, Tautz D (1994) Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Curr Biol* 4:777–783

Schmidt, T. & Heslop-Harrison J. S. (1993). Variability and evolution of highly repeated DNA sequences in the genus *Beta*. *Genome* 36:1074-1079.

Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF (2001) Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294:109–115

Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J.S. (2000). Practical in situ hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.

Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.

Scutt CP, Kamisugi Y, Sakai F, Gilmartin PM (1997) Laser isolation of plant chromosomes: Studies on the DNA composition of the X and the Y sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Genome* 40:705–715

Scutt, C. P., Robertson, S. E., Willis, M. E., Kamisugi, Y., Li, Y., Shenton, M. R., Smith, R. H., Martin, H. & Gilmartin, P. M. (1999). Molecular approaches to the study of sex determination in dioecious *Silene latifolia*. In: Ainsworth, C. C. Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited.

Senters, A. E. & D. E. Soltis. (2003). Phylogenetic relationship in *Ribes* (*Glossulariaceae*) inferred from ITS sequence data. *Taxon* 52:51–66.

Sharbel, T. F., Green, D. M. & Houben, A. (1998). B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41:12-22.

Shibata, F., Hizume, M. & Kuroki, Y. (1999). Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma* 108:266-270.

Shibata, F., Hizume, M. & Kuroki, Y. (2000a). Differentiation and the polymorphic nature of the Y chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa*. *Chromosome research* 8:229-236.

Shibata, F., Hizume, M. & Kuroki, Y. (2000b). Molecular cytogenetic analysis of supernumerary heterochromatic segments in *Rumex acetosa*. *Genome* 43:391-397.

Singer, M. F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 76:67-112.

Singer, M. F. & Berg, P. (1991). Genes and Genomes. University Science Books, California.

Singh, R. B. (1964). Cytogenetic studies in *Rumex acetosella* and its hybrids with *Rumex hastatulus* with special consideration of sex determination. Tesis Doctoral, Universidad North Carolina.

Sivolap, I. M. & Verbitskaia, T. G. (1976). Molecular organization of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Tsitol Genet.* 10(6):511-5.

Skaletsky, H. et al. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 423,825-37.

Smith BW (1969) Evolution of sex-determining mechanisms in *Rumex*. *Chromosomes Today* 2:172–182

Smith, B. W. (1964). The evolving karyotype of *Rumex hastatulus*. *Evolution* 18:93–104.

Smith, B. W. (1968). Cytogeography and cytotaxonomic relationships of *Rumex paucifolius*. *Am. J. Bot.* 55:673–683.

Smith, D. B. & Flavell, R. B. (1977). Nucleotide sequence organisation in the rye genome. *Biochim. Biophys. Acta* 474(1):82-97.

Smith, G. P. (1974). Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:507-513.

Smith, G. P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191:528-535.

Steinemann, M., Steinemann, S. (1997). The enigma of the Y chromosome degeneration: TRAM, a novel retrotransposon is preferentially located on the neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Genetics* 145,261-266.

Strachan, T., Sodoyer, R., Damotte, M. & Jordan, B.R. (1984). Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene, HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes. *EMBO J.* 3:887-894.

Strachan, T., Webb, D. & Dover, G. (1985). Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *European Molecular Biology Organization Journal* 4:1701-1708.

Swofford, D. L. (1998). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

- Taberlet, P., G. Gielly, G. Patou & J. Bouvet.** (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17:1105–1109.
- Takezaki, N., A. Rzhetsky & M. Nei.** (1995). Phylogenetic test of molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.* 12:823–833.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.
- Trick, M. & Dover, G.** (1984). Unexpectedly slow homogenization within a repetitive DNA family shared between two subspecies of tse-tse fly. *Journal of Molecular Evolution* 20:322-329.
- Ugarkovic, D. & Plohl, M.** (2002). Variation in satellite DNA profiles –causes and effects. *European Molecular Biology Organization Journal* 21(22):5955-5959.
- Vogel, J. M., Nieto, M. C., Fischer, A. & Goodenow, R. S.** (1990). Overlapping palindromic sequences associated with somatic deletion and meiotic recombination of MHC class I genes. *Mol. Immunol.* 27:875-886.
- Voglmayr, H.** (2000). Nuclear DNA amounts in mosses (Musci). *Annals of Botany* 85: 531-546.
- Vyskot, B.** (1999). The role of DNA methylation in plant reproductive development. In: Ainsworth, C. C. Sex determination in plants. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Wagner, W. L., D. R. Herbst, & S. H. Sohmer.** (1999). Manual of the flowering plants of Hawaii, Volume 2. Revised edition. Bishop Museum Special Publication 97. University of Hawaii and Bishop Museum Press, Honolulu, Hawaii.
- Weiblen, G. D., R. K. Oyama & M. J. Donoghue.** (2000). Phylogenetic analysis of dioecy in monocotyledons. *Am. Nat.* 155:46–58.
- Westergaard, M.** (1946). Aberrant Y chromosomes and sex expression in *Melandrium album*. *Hereditas* 32:419-443.
- Westergaard, M.** (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv. Genet.* 9:217-281.

- White, T. J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 in M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, T. White, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California
- Whitehouse, H. L. K.,** (1982) *Genetic Recombination, Understanding the Mechanisms*. John Wiley & Sons, New York.
- Wilby, A. S. & Parker, J. S.** (1986). Continuous variation in the Y-chromosome structure of *Rumex acetosa*. *Heredity* 57:247-254.
- Wilby, A. S. & Parker, J. S.** (1988a). The supernumerary segment system of *Rumex acetosa*. *Heredity* 60:109-117.
- Wilby, A. S. & Parker, J. S.** (1988b). Recurrent patterns of chromosome variation in a species group. *Heredity* 61:55-62.
- Willard, H. F. & Wayne, J. S.** (1987a). Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for ancestral pentameric repeat. *Journal of Molecular Evolution* 25:207-214.
- Willard, H. F. & Wayne, J. S.** (1987b). Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends in Genetics* 3:192-198.
- Willard, H. F.** (1990). Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet.* 6: 410-416.
- Wright, J M.** (1989). Nucleotide sequence, genome organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). *Nucleid Acids Research* 17:5071-5079.
- Yamamoto, Y.** (1938). Karyogenetische Untersuchungen bei der gattung *Rumex*. VI. Geschlechtsbestimmung bei eu- und aneuploiden pflanzen von *Rumex acetosa* L. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* 13:1-59, Taf. I-IV.
- Ye, D., Oliveira, M., Veuskens, J., Wu, Y., Installe, P., Hinnisdaels, S., Truong, A. T., Brown, S., Mouras, A. & Negrutiu, I.** (1991). Sex determination in the dioecious *Melandrium*. The X/Y chromosome system allows complementary cloning strategies. *Plant Sci.* 80:93-106.

Zhang, Y.H., Di Stilio, V., Rehman, F., Avery, A., Mulcahy, D & Kesseli, R. (1998). Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. *Genome* 41:141-147.

8.- APÉNDICES

APÉNDICE 1.-

R. vesicarius	ATTTCAGAGAA	AGCCTGG--A	TAAAAA---T	GGGCA-TCCT	GAGCCA-CTC
		CTCCTTTCCA			
R. roseus	--.....--.----.....A...
				
R. japonicusC.....--.A--.-.....A...
				
R. graminifoliusC.TG.A---AA-A.....A...
				
R. cypriusC.....-A.----.....A...
				
R. pulcherC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. maderensisC.....-A.AA-A.....A...
				
R. sanguineusC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. aquitanicusC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. obtusifoliusC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. patientiaC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. cristatus	C.....--.	.C.....-A.AAA.GA.....A...
				
R. giganteusC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. tuberosusC.....TA.AA-A.....A...
				
R. hastatulus (NC)C.....-A.AAA.A.....A...
				
R. hastatulus (TX)C.....-A.AAA.A.....A...
				
R. abyssinicusC.....-A.AA-A.....A...
				
R. sagittatusC.....-A.AA-A.....A...
				
R. hastatusC.....TA.AA-A.....A...
				
R. induratusC.....-A.AA-A.....A...
				
R. scutatusC.....-A.AA-A.....A...
				
R. lunariaC.....-A.AA-A.....A...
				
R. acetosaC.....-A.AA-A.....A...
				
R. papillarisC.....-A.AA-A.....A...
				
R. acetosellaC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. conglomeratusC.....-A.AAA.A.....A...
				
R. crispusC.....-A.AAA.A.....A...
				
F. convolvulusC.....CA.	T.....AA-A.....A...
				
R. bucephalophorusC.....CA.AA-A.....A...
				
R. intermediusC.....-A.AA-A.....A...
				
R. thyrsoidesC.....-A.AA-A.....A...
				

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

<i>R. suffruticosus</i>C.....-A.AA-A....A...
	C.....			
<i>R. paucifolius</i>C.....-A.AAA.A....A...
				
<i>R. vesicarius</i>	A-AGGAAGAA	T-AAAACAGG	ATAGGTGCAG	AGACTCAATG	GAAGCTGTTC
		TAACAAATGG			
<i>R. roseus</i>	.-.....	C-.....
				
<i>R. japonicus</i>	.-.....	.-.....A..
				
<i>R. graminifolius</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. cyprius</i>	.-.....G.	-----	--.....
				
<i>R. pulcher</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. maderensis</i>	.A.....	.-.....
				
<i>R. sanguineus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. aquitanicus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. obtusifolius</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. patientia</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. cristatus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. giganteus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. tuberosus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. hastatulus (NC)</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. hastatulus (TX)</i>	.A.....	.T.....A..
				
<i>R. abyssinicus</i>	.A.....	.-.....
				
<i>R. sagittatus</i>	.A.....	.-.....
				
<i>R. hastatus</i>	.A.....	.-.....
				
<i>R. induratus</i>	.A.....	.-.....
				
<i>R. scutatus</i>	.A.....	.-.....T..
				
<i>R. lunaria</i>	.A.....	.-.....
				
<i>R. acetosa</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. papillaris</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. acetosella</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. conglomeratus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. crispus</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>F. convolvulus</i>	.A.....-	---C..A..T.....
				
<i>R. bucephalophorus</i>	.A.....A..	.-.....A-
				
<i>R. intermedius</i>	.A.....	.-.....A..
				
<i>R. thyrsoides</i>	.A.....	.-.....A..
				


```

R. suffruticosus .A..... -....A... .....
R. paucifolius  aA..... -....A... .....
R. vesicarius   AGTTGACGAT CTTGCGTTTT TAGTTATT-- -----
                -AAAGG
R. roseus       .....C..... -----
                -.....
R. japonicus    .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
R. graminifolius .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A
R. cyprius      ..... -----
                -.....
R. pulcher      .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
R. maderensis  .....A. .... -----
                -.....
R. sanguineus   .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
R. aquitanicus  .....AG .....AT AAGAATTCTT CCTTCGAAAC
                TCCAA...A.
R. obtusifolius .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
R. patientia    .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
R. cristatus    .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCCA...A.
R. giganteus    .....AG .....AT AAGAATTCTT CCA----AAC
                TCCAA...A.
R. tuberosus    .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA.....
R. hastatulus (NC) .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCACCGAAAC
                TCCAA...A
R. hastatulus (TX) .....G... .....A. ....AT AAGAATTCT- CCATCGAA-C
                TCCAA...A
R. abyssinicus ..... -----
                -.....
R. sagittatus   ..... -----
                -.....
R. hastatus     ..... -----
                -.....
R. induratus    .....A. .... -----
                -.....
R. scutatus     .....A. .... -----
                -.....
R. lunaria      .....G.----- -----
                -.....
R. acetosa      .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA.....
R. papillaris   .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA.....
R. acetosella   .....G... .....A. ....AT AACAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A
R. conglomeratus .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
R. crispus      .....AG .....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA...A.
F. convolvulus  .....G. ....G. ..-----T AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TTCAA.....
R. bucephalophorus .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA.....
R. intermedius  .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA.....
R. thyrsoides   .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                TCCAA.....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

R. suffruticosus   .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                  TCCAA....A
R. paucifolius    .....G... .....A. ....AT AAGAATTCTT CCATCGAAAC
                  TCCAA....A

R. vesicarius     AT----- -GAAGAATAA ACCTATACGC AGACATACTT AAATA-----
                  TAAATA-CT
R. roseus         ..----- -.....C. ....
                  .....-..
R. japonicus      ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. graminifolius ..----- -.....GT..... ..-... ..GAAA-
                  .....-
R. cyprius        ..----- -.....
                  .....-..
R. pulcher        ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. maderensis     ..GAAGAGGA T.....
                  .....-..
R. sanguineus     ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. aquitanicus    ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. obtusifolius   ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. patientia      ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. cristatus      ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. giganteus      ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. tuberosus      ..----- -.....
                  .....-..
R. hastatulus(NC) ..----- -.....C. GT..... ..-... ..GAAA-
                  .....-
R. hastatulus(TX) ..----- -.....C. GT..... ..-... ..G-----
                  -----
R. abyssinicus   ..----- -.....
                  .....-..
R. sagittatus     ..----- -.....
                  .....-..
R. hastatus       ..----- -.....
                  .....-..
R. induratus      ..GAAAAGGA T.....
                  .....-..
R. scutatus       ..GAAAAGGA T..... ..TA. ....-
                  C..T...A..
R. lunaria        ..----- -.....
                  .....-..
R. acetosa        ..----- -.....
                  .....-..
R. papillaris     ..----- -.....
                  .....-..
R. acetosella     ..----- -.....GT..... ..-... ..-----
                  G.....-
R. conglomeratus ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
R. crispus        ..----- -.....C... ..G.... ..-----
                  .....-..
F. convolvulus    ..----- -.....G... ..T..G.... ..-----
                  .....-
R. bucephalophorus ..----- -A..... ..G.... ..-----
                  .....-
R. intermedius    ..----- -.....
                  .....-..
R. thyrsoides     ..----- -.....
                  .....-..

```

R. suffruticosus	..-----	-.....T.....	-----
		G.....TA.		
R. paucifolius	..-----	-G.....T.....	-----
		G.....TA.		
R. vesicarius	TCCATCGGAT	GAGAATGAAG	ATAGAGTCCC	ATTCTACGTG TCAATCCTGA
		CAACAATGAA		
R. roseus
			
R. japonicus
			
R. graminifoliusC..
		..C.....		
R. cyprius
			
R. pulcher
			
R. maderensis
			
R. sanguineus
			
R. aquitanicus
			
R. obtusifolius
			
R. patientia
			
R. cristatus
			
R. giganteus
			
R. tuberosusT..T..
		..C..C....		
R. hastatulus (NC)C..
		..C.....		
R. hastatulus (TX)C..
		..C.....		
R. abyssinicus
			
R. sagittatusA..
			
R. hastatus
			
R. induratus
			
R. scutatus
			
R. lunaria
			
R. acetosaT..T..
		..C..C....		
R. papillarisT..T..
		..C..C....		
R. acetosellaC..
		..C.....		
R. conglomeratus
			
R. crispus
			
F. convolvulus	C.....
			
R. bucephalophorusG.....
		..C.....		
R. intermediusT..
		..C..C....		
R. thyrsoidesT..
		..C..C....		


```

R. suffruticosus .....---- --....A... AAAA..TTTT TTGA..T...
R. paucifolius .....A-.. AAAA..TTTT TTGA..T...
R. vesicarius CAGCTTTTT TGTTAACGGT TCAAATAAAA ATTGGGCTC TTCTTCATG
                ACTCTTCTTT
R. roseus ..... ..G.....
                ...A.....
R. japonicus ..T..... --.....
R. graminifolius ..-.....
R. cyprius .....
R. pulcher ..T..... A.--.....
R. maderensis .....
R. sanguineus ..T..... --.....
R. aquitanicus ..T..... --.....
R. obtusifolius ..T..... --.....
R. patientia ..T..... --.....
R. cristatus ..T..... --.....
R. giganteus ..T..... --.....
R. tuberosus .....
R. hastatulus (NC) ..-.....
R. hastatulus (TX) ..-.....
R. abyssinicus .G.....
R. sagittatus .....C...
R. hastatus .....
R. induratus .....
R. scutatus .....
R. lunaria .....
R. acetosa .....
R. papillaris .....
R. acetosella ..-.....
R. conglomeratus ..T..... --.....
R. crispus ..T..... --.....
F. convolvulus .CT.....C .....A. ....G..... .C.....T
                C.....
R. bucephalophorus .C..... .C...
R. intermedius .....
R. thyrsoides .....
                .....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

<i>R. suffruticosus</i>	...-.....
<i>R. paucifolius</i>	...-.....
<i>R. vesicarius</i>	CACAAAGGTA	TCCGAGCATA	AAAGTTTCC	TCTTATTCTC	TTAT-----
<i>R. roseus</i>T.-----
<i>R. japonicus</i>T.----	-----
<i>R. graminifolius</i>GGT.----	-----
<i>R. cyprius</i>AGTCTTT.-----
<i>R. pulcher</i>T.----	-----
<i>R. maderensis</i>C..T.CCTTAT
<i>R. sanguineus</i>T.----	-----
<i>R. aquitanicus</i>A-----T.----	-----
<i>R. obtusifolius</i>T.----	-----
<i>R. patientia</i>A-----T.----	-----
<i>R. cristatus</i>A-----T.----	-----
<i>R. giganteus</i>T.----	-----
<i>R. tuberosus</i>G.T.-----
<i>R. hastatulus (NC)</i>GGT.-----
<i>R. hastatulus (TX)</i>T..AGTCTTT.-----
<i>R. abyssinicus</i>GGT.-----
<i>R. sagittatus</i>AGTCTTT.-----
<i>R. hastatus</i>TTCT-T.-----
<i>R. induratus</i>C..T.CCTTAT
<i>R. scutatus</i>C..T.CCTTAT
<i>R. lunaria</i>T.-----
<i>R. acetosa</i>G.T.-----
<i>R. papillaris</i>G.T.-----
<i>R. acetosella</i>GGT.-----
<i>R. conglomeratus</i>T.----	-----
<i>R. crispus</i>T.----	-----
<i>F. convolvulus</i>G.T.A---	-----
<i>R. bucephalophorus</i>G....C-----T.G.T.----
<i>R. intermedius</i>G.T.-----
<i>R. thyrsoides</i>G.T.-----

```

R. suffruticosus .....A. ....T. ....-----
                .....-----
R. paucifolius .....T...A. ....T. C.....-----
                .....-----

R. vesicarius  -----A GTCTTGAT GTA-----TG ATGTAAATGA TACATGAGCA GCT-
                ---GCA
R. roseus      ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. japonicus   ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. graminifolius CTTATCACA. . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. cyprius     ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. pulcher     ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. maderensis ----- . . . . .----- . . . . . .T.-
                ---...
R. sanguineus ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. aquitanicus ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. obtusifolius ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. patientia   ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. cristatus   ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. giganteus   ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. tuberosus   ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. hastatulus (NC) CTTATCACA. . . . .----- . . . . .-----
                ---...C
R. hastatulus (TX) CTTATCACA. . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. abyssinicus ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. sagittatus  CTTATCACA. . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. hastatus    ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. induratus   ----- . . . . .----- . . . . . .T.-
                ---...
R. scutatus    ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. lunaria     ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. acetosa     ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. papillaris  ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. acetosella  ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. conglomeratus ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. crispus     ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
F. convolvulus ----- . . . . .----- . . . . . G.....
                .....TTGA...
R. bucephalophorus ----- . . . . . ATGTA. . . . . AT. . . . .
                ---...
R. intermedius ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...
R. thyrsoides  ----- . . . . .----- . . . . .-----
                ---...

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

R. suffruticosus	-----	-----	-----
R. paucifolius	-----	-----	-----
R. vesicarius	AGGAGTACTC	TTACTCATT	-GAAT-GATT	----CCCAAT	ACATATCATT		
		ACTCTTACTA					
R. roseus	-.....	-----	-----
						
R. japonicus	-A.....	-----	-----
						
R. graminifolius	-.....	-----	-----
						
R. cyprius	-.....	-----	-----
						
R. pulcher	-A.....	-----	-----
						
R. maderensis	.T.....	-.....	-----G.....	-----
						
R. sanguineus	-A.....	-----	-----
						
R. aquitanicus	-A.....	-----	-----
						
R. obtusifolius	-A.....	-----A.A.....	-----
						
R. patientia	-A.....	-----	-----
						
R. cristatus	-A.....	-----	-----
						
R. giganteus	-A.....	-----	-----
						
R. tuberosus	.A.....	.T.....	-.....	-----	-----
						
R. hastatulus (NC)	-.....	-----	-----
						
R. hastatulus (TX)	-.....	-----	-----
						
R. abyssinicus	-.....	-----	-----
						
R. sagittatus	-.....	-----	-----
						
R. hastatus	-.....	-----	-----
						
R. induratus	.T.....	-.....	-----	-----
						
R. scutatus	.T.....	-.....	-----	-----
						
R. lunaria	-.....	-----	-----
						
R. acetosa	.A.....	.T.....	-.....	-----	-----
						
R. papillaris	.A.....	.T.....	-.....	-----	-----
						
R. acetosella	-.....	-----	-----
						
R. conglomeratus	-A.....	-----	-----
						
R. crispus	-A.....	-----	-----
						
F. convolvulus	-.....	-----	.T.....	-----
		.A.....					
R. bucephalophorus	-.....T..A.	GATTT.....	-----
		.A.....					
R. intermedius	.A.....	.T.....	-.....	-----	-----
						
R. thyrsoides	.A.....	.T.....	-.....	-----	-----
						

R. suffruticosus
R. paucifolius	T.....
R. vesicarius	AGA---ACAT	ACAAAGTCTT	C--TTTTCAA	GCTACAGGAA	ATTCC--GGAG
		CCTAGA-TAA			
R. roseusC.....-..G.
R. japonicusG.C..G.
R. graminifoliusA..	...T.-..G.
R. cypriusAT-....
R. pulcher-..G.
		AA.....			
R. maderensisT.-..G.
R. sanguineus-..G.
R. aquitanicus-..G.
R. obtusifolius-..G.
R. patientia-..G.
R. cristatus-..G.
R. giganteus-..G.
R. tuberosusA..	...T.-..G.
R. hastatulus (NC)A..	...T.-..G.
	A...			
R. hastatulus (TX)A..	...T.-..G.
		...G.-...			
R. abyssinicusC.....-..G.
R. sagittatus-..G.
R. hastatus-....
R. induratusT.-..G.
R. scutatusT.-..G.
R. lunaria-....
R. acetosaA..	...T.-..G.
R. papillarisA..	...T.-..G.
R. acetosellaA..	...T.-..G.
R. conglomeratus-..G.
R. crispus-..G.
F. convolvulus	...CTT...A	.A.....A	TGA....T..	.A.....-..GA
R. bucephalophorusA..	...T.-..GA
R. intermediusA..	...T.-..GA
R. thyrsoidesA..	...T.-..GA

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

<i>R. suffruticosus</i>	...---.....-.....	A..	...T.-..G.
<i>R. paucifolius</i>	...---.cGt-.....	G	A.. ...T.-..G.
<i>R. vesicarius</i>	GACTTTGICA	TACCTTTTAC	GCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCCCTATTTT	-
<i>R. roseus</i>	T	-
<i>R. japonicus</i>	..T.....	-
<i>R. graminifolius</i>	-----..	-
<i>R. cyprius</i>	-
<i>R. pulcher</i>	..T.....	-
<i>R. maderensis</i>	..----.....	T	T	-
<i>R. sanguineus</i>	..T.....	-
<i>R. aquitanicus</i>	..T.....	-
<i>R. obtusifolius</i>	..T.....	-
<i>R. patientia</i>	..T.....	-
<i>R. cristatus</i>	..T.....	-
<i>R. giganteus</i>	..T.....	-
<i>R. tuberosus</i>	-----..	-
<i>R. hastatulus (NC)</i>	-----..	-
<i>R. hastatulus (TX)</i>	-----..	-
<i>R. abyssinicus</i>	-
<i>R. sagittatus</i>	-
<i>R. hastatus</i>	-
<i>R. induratus</i>	T	T	-
<i>R. scutatus</i>	..----.....	T	-
<i>R. lunaria</i>	-
<i>R. acetosa</i>	-----..	C...	-
<i>R. papillaris</i>	-----..	C...	-
<i>R. acetosella</i>	-----..	T	-
<i>R. conglomeratus</i>	..T.....	-
<i>R. crispus</i>	..T.....	-
<i>F. convolvulus</i>	A.	..TA.C..T.	-
<i>R. bucephalophorus</i>	-----..	T	-
<i>R. intermedius</i>	-----..	-
<i>R. thyrsoides</i>	-----..	-

```

R. suffruticosus -----.. ..... -
R. paucifolius -----.. ..... -
R. vesicarius TGAGTAGC-T GG-GCGTATC GAAACCTTG -GAAGCAGAC AGACCCGCGA
ACCCGTTCT
R. roseus .....- .T.....G.....G.. -C...T....
R. japonicus .....- .AT.....GCT CAG..... T.....
R. graminifolius .....- ..-...AG.. .....GC. -C.....
..A.....
R. cyprius .....- ..-.....GC. -C.....
.....T..
R. pulcher .....- .AT.....GCT CAG.....
R. maderensis .....- .T.....GC. -C.....
R. sanguineus .....- .AT.....GCT CAG.....
R. aquitanicus .....- .AT.....CT CAG.....A .....T..
R. obtusifolius .....- .AT.....GCT C.G.....
R. patientia .....- .AT.....GCT CAG..... T.....
R. cristatus .....- .AT.....GCT CAG..... T.....
R. giganteus .....- .AT.....CT CA..... T.....
..T..A..
R. tuberosus .....- .T.....GC. -CG.....A .....
..A.....T.
R. hastatulus (NC) .....- .T.....GC. -AG.....
..A.....
R. hastatulus (TX) .....- .T.....GC. -AG.....
..A.....
R. abyssinicus .....- .T.....GCA -C.....A.. .A....CTA.
R. sagittatus .....- .T.....A.....GCA -CG....A.. T...T.A..
..AT...G.
R. hastatus .....- .T....G. ....GC. -C.....
R. induratus .....- .T.....GC. -C.....
.....T.
R. scutatus .....- .T.....GC. -CG.....
.....T.
R. lunaria .....- .T.....T .....GCA -C.....T .....T..
.....C..T..
R. acetosa .....- .T.....GC. -CG.....
..A.....T.
R. papillaris .....- .T.....GC. -C.....
..A.....T.
R. acetosella .....- .T...C.. .....GC. -CG.....
..A.....
R. conglomeratus .....- .AT.....GCT CAG.....
R. crispus .....- .AT.....GCT CAG..... T.....
F. convolvulus .....AAC .T..A.....GC. -AG.....A .....
.....TAC
R. bucephalophorus .....- .T.....GC. -A.....
.....AT.
R. intermedius .....- .T.....GC. -CG.T...T .....A.
..A.....
R. thyrsoides .....- .T.....G..GC. -CG.....A.
..G.....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

R. suffruticosus .....-. ..T..... AG.....GC. -CG.....
                ..A.....
R. paucifolius .....-. ..G..... -.GC. -CG.....
                ..A.....

R. vesicarius   AAA-CGA--G CTGCCTCC-C CCCTCCCCCT AG----- ---GGCGGGG
                TGGGTGGGGG
R. roseus       ...-....-. .C.....C. ..-.....G ----- GC--
                G....A
R. japonicus    ..CA.A.AC. GC...C.-.-----
                -...C.
R. graminifolius ..CCT.---C GC.AGCA---
                -----
R. cyprius      ...A...-. .C.----- .TC....- .TCCCC-- -----..
                G.C.G....A
R. pulcher      ..CA.A.G-. GC...C.-.-----
                -...C.
R. maderensis   ...A...-. .C.----- -.C....TC CCTCCCCCTC ---.GC...
                G..CG..T..
R. sanguineus   ..CA.A.A-. GC...C.-.-----
                -...C.
R. aquitanicus  ..CA.A.A-. GC.G.CA---
                -...C.
R. obtusifolius ..CT.---. GC...C.-.-----
                -...C.
R. patientia    ..CA.A.AC. GC...C.-.-----
                -...C.
R. cristatus    ..CA.A.AC. GC...C.-.-----
                -...C.
R. giganteus    ..CA.A.A-. GC...C.-.-----
                -...C.
R. tuberosus    ...A.A---
                -----
R. hastatulus (NC) ..CCT.---C GC.AGCA---
                -----
R. hastatulus (TX) ..CCT.---C GC.AGCAT--
                -----
R. abyssinicus  ...-....-. .C.....-. ..T....T.C T.CCTTTTTT TAA.....A.
                G..CGA....
R. sagittatus   ...-A...-. .A.....- .....TTC -----
                G.CAG.....
R. hastatus     ...-....-. .C.....C. ..G....T.G -----
                CCC.G.....
R. induratus    ...A...-. .C.----- .TC....TC CCTCCCCCCC ---.GC...
                G..CG....T
R. scutatus     ...A...-. .C.----- .TC....TC CCTCCCCTCC ---.GC...
                G..CG....T
R. lunaria      ...-....-. .C.....CT ..G.....C T.G----- ---.GT...
                G...G.....
R. acetosa      ...A-A---
                -----
R. papillaris   ...A.A---
                -----
R. acetosella   ..CCT.---C GC.AGCA---
                -----
R. conglomeratus ..CA.A.A-. GC...C.-.-----
                -...C.
R. crispus      ..CA.A.AC. GC...C.-.-----
                -...C.
F. convolvulus  ...A.A.CG. GG..GCGG-. GT.GG....G T.CCGGCTCC GCG.C.CC.A
                A.TCC...CC
R. bucephalophorus .CCA.,---. ....GG....TC T---TCT--- -----C.A
                AA..GA....
R. intermedius  ...A.A---
                -----
R. thyrsoides   ...A.A---
                -----

```

```

R. suffruticosus  ..CCT.---C GCAAGCA--- -----
R. paucifolius   ..CCT.---T GC.AGCA--- -----

R. vesicarius    GACGCCG--- -ATGAACCCA AACCAGGCGC GGATTGCGCC AAGGAACCAT
                  GAATAGTAGC
R. roseus        .GG.GA.A-- -----... ..-....C
                  A..C.AC...
R. japonicus     C-----C GC-C..... CC..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. graminifolius -----G AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.C.GA.
R. cyprius       .G..G.---G AC-..... ..C..... ..-....C
                  ...C.....
R. pulcher       C-----C GC-C..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. maderensis   .G..G..--- CC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.....
R. sanguineus    C-----C GC-C..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. aquitanicus   C-----C GC-C..A... .C..CC.... ..-....C
                  .G.C.AA.T.
R. obtusifolius  C-----C GC-C..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. patientia     C-----C GC-C..... CC..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. cristatus     C-----C GC-C..... CC..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. giganteus     C-----C GC-C...TA. .C..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. tuberosus     -----AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AAT..
R. hastatulus (NC) -----G AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.C.G..
R. hastatulus (TX) -----G AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.C.G..
R. abyssinicus   AG..TTA--- AC-..... ..-..AT.T .....T.. ..-....C
                  A..A.A....
R. sagittatus    AG..GT.--- -..... ..AAT.. .....A..T .....A..C
                  .....A...
R. hastatus      AG..G.T--G AC-..... ..C..... ..-....C
                  ...C..C...
R. induratus     .G..G..A-- CC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C..G...
R. scutatus      .G..G..A-- CC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.....
R. lunaria       AG..G.A--- -.CA..... ..C.AT.T .....A.. ..-....
                  ...C.....
R. acetosa       -----AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AAG..
R. papillaris    -----AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AAG..
R. acetosella    -----G AC-..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.C....
R. conglomeratus C-----C GC-C..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
R. crispus       C-----C GC-C..... CC..C..... ..-....C
                  ...C.AA.T.
F. convolvulus   CGTC...G-C GC-C...A... .C..C..... ..-....C
                  ...C.TAG..
R. bucephalophorus .G.-----C CC-T..... .C..C..... ..-....C
                  ...C.C....
R. intermedius   -----AC-..... .C..C.A.A. ....T.....C
                  C.CC.AAG.T
R. thyrsoides    -----AC-..... .C..C..T.. .....A.. ..-..G.C
                  ...C.CA.C.

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

<i>R. suffruticosus</i>	-----G AC-..... .C..C.....
C.C....
<i>R. paucifolius</i>	-----G AC-..... .C..C.....
C.C.G..
<i>R. vesicarius</i>	GACCCCGGG AGGTCCGGTC CTCCGCATCC CGCACGG-CG GCGGAGTGTC
	GTTTCTACTT
<i>R. roseus</i>	AC.....T.. C..A..... ..AG.... T..C..T-A. .T..C....T

<i>R. japonicus</i>	.C..... C..C..... ..G.G.. ..G...-.. -...C.....
C.
<i>R. graminifolius</i>	.CT..T..C. C..C.....T ..G.G.. ..G...-.. .AA.C.C...
ACGA..
<i>R. cyprius</i>	.CT..... C..C..... ..G.CA. ...C...-..C.....
C.
<i>R. pulcher</i>	.C.....A. C..C..... ..G.G.. ..G...-..C.....

<i>R. maderensis</i>	.C.....TT. C..C..... ..G.... ..T...-..C.....

<i>R. sanguineus</i>	.C.....A. C..C..... ..G.G.. ..G...-..C.....

<i>R. aquitanicus</i>	.C.....A. CATC.T.... ..A.G.G.. ..G...-.. ...AC.....

<i>R. obtusifolius</i>	.C.....A. C..C..... ..G.G.. ..G...-..C.....

<i>R. patientia</i>	.C..... C..C..... ..G.G.. ..G...-..C.....
C.
<i>R. cristatus</i>	.C..... C..C..... ..G.G.. ..G...-..C.....
C.
<i>R. giganteus</i>	-C.....TA. CA.C...AA. ...TAG.G.. ..GT...-..CA....

<i>R. tuberosus</i>	.C.....C. C..C..... ..G.G.. ..T...-..C.C...
ACTA..
<i>R. hastatulus (NC)</i>	.CT..T..C. C..C..... ..G.G.. ..G...-.. .AA.C.C...
ACGA..
<i>R. hastatulus (TX)</i>	.CT.....C. C..C..... ..G.G.. ..G...-.. .AA.C.C...
ACGA..
<i>R. abyssinicus</i>	.C.....C -...AT.... ..T.G.... ..C..A-A .T.T....
	A.....
<i>R. sagittatus</i>	AC....A... CA.A..... ..AG..T. ...TT...-..C.....
T.G.C.
<i>R. hastatus</i>	.CT..... C..C...C.G.... ..C...-..C.....

<i>R. induratus</i>	.C.....T. C..C..... ..G.... ..T...-..C.....

<i>R. scutatus</i>	.C.....T. C..C..... ..G.... ..T...-..C.....
A.....
<i>R. lunaria</i>	.CT..... ..C..... .A..G.... T..C...-T. .T..C....
	A.....
<i>R. acetosa</i>	.C.....C. C..C..... ..G.G.. ..T...-..C.C...
ACTA..
<i>R. papillaris</i>	.C.....C. C..C..... ..G.G.. ..T...-..C.C...
ACTA..
<i>R. acetosella</i>	.CT..T..C. C..C.....T ..G.G.. ..G...-.. .AA.C.....
ACT-..
<i>R. conglomeratus</i>	.C.....A. C..C..... ..G.G.. ..G...A.C.....

<i>R. crispus</i>	.C..... C..C..... ..G.G.. ..G...-.. -...C.....
C.
<i>F. convolvulus</i>	.CG....TCC CC.C.-..... ..GCG- -GG...-.. ...TC.C...

<i>R. bucephalophorus</i>	.C.....C. C..C..... ..G.G.. ..G...-..C.....
A.....
<i>R. intermedius</i>	.C....A-C. CA.C..... ..G.GA. ...T...-.. ...AC..A..
	A...ACGA..
<i>R. thyrsoides</i>	CC.....-CA C..C..... ..A.G.. .A.T..A-T. ..AAC.CA..
ACGA..

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

R. suffruticosus  ...A..G.GT .G.....-- -CT....CC- TCC----- -...C....A -CC-
                    -----G
R. paucifolius   ...A..G.GT .T.....T-- ---....C-- TCC----- -.A....A.A -AA-
                    -----

R. vesicarius    GGGGCGGAGA CTGGCCTCCC GTGCGCCCCC GCGCGCGGCT GGCCTAAACG CG-
                    GACCCCG
R. roseus        ---..... .T...C... ..- .T..A....C .A.....A. .A-
                    .....A
R. japonicus     ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    .....
R. graminifolius ..... A..... .T.G .....C ..... .A-
                    .....
R. cyprius       ..... ..- ..... .A-
                    .....
R. pulcher       ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    .....
R. maderensis    ..... ..- .....
                    .....
R. sanguineus    ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    ....T..
R. aquitanicus   ..... .C.-- ..A...TA ..T..A... ..- .A-
                    C....TA
R. obtusifolius  ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    .....
R. patientia     ..... .C... A.....G .....C ..... .A-
                    .....
R. cristatus     ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    .....
R. giganteus     ..A.A..... .C... ..C...TG ..A.....C ..... .A-
                    .....T.
R. tuberosus     ..... T... .C... ..T..- .....C .....A. .A-
                    .....
R. hastatulus (NC) ..... A... .C... ..G .....TC .....-..... .A-
                    .....
R. hastatulus (TX) ..... A... .C... ..G .....TC .....C...T. .A-
                    .....
R. abyssinicus   -...A.T.. G..C..... T..T..... ..ATA.A.AA AA.....T. .A-
                    .....
R. sagittatus    ----- ----- ----- ----- .....G.A .A-
                    .....T
R. hastatus      ..... .G.C... ..G.....GC ..G....A. .A-
                    .....C
R. induratus     ..... ..- .....C AA-
                    A.....
R. scutatus      ..... ..- ..... .A-
                    .....
R. lunaria       ----- .. G..CG----- ----- .....T...T. ....T.... .A-
                    .TT....
R. acetosa       ..... T... .C... ..T..- .....TC .....A. .A-
                    .....
R. papillaris    ..... T... .C... ..T..- .....TC .....A. .A-
                    .....
R. acetosella    ..... A... .C... ..T.G .....C ..... .A-
                    .....
R. conglomeratus ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    .....
R. crispus       ..... .C... ..G .....-..C ..... .A-
                    .....
F. convolvulus   ..... .C... ..- .....C ..... .A-
                    .....
R. bucephalophorus ..... .C... ..G .....C ..... .A-
                    .....
R. intermedius   ...A..A... T... .C... ..T..- T.A....TC .....A. .A-
                    T.....
R. thyrsoides    ..... T...G.C... ..T..- ...AT...C .A.....A. AA-
                    .....A
    
```


R. suffruticosusC...GCA-

 R. paucifoliusA...T.
 TAT.....
 R. vesicarius CGGCCGCG-A GA--AGGCGC GCGGA--TTG GTGGCGTA-A ACATG-GCAT C---
 GCGTCG
 R. roseus ..A...T-.. --C..... .A...--A.A..- .----
 C.A.T.
 R. japonicus-.. .A-C..... .A...--C..CT T.....-.... .---

 R. graminifolius-.. --C..... .A...--... ..-..... .---

 R. cyprius-.. .A--..... .A...--C..-..... .---

 R. pulcher-.. .A-C..... .A...--...CT T.....-.... .---

 R. maderensisC-G --C..... .A...--...-..... .---

 R. sanguineus-.. .A-C..... .A...--...CT T.....-.... .---

 R. aquitanicus .C...A...-.. .A-C.A.A. .AT...--.AA..CT T.....-.... .---

 R. obtusifolius-.. .A-C..... .A...--...CT T.....-.... .---

 R. patientia-.. .A-C..... .A...--C..CT T.....-.... .---

 R. cristatus-.. .A-C..... .A...--C..CT T.....-.... .---

 R. giganteus-.. .A-C..... .A...--...CT T.....-.... T---
A
 R. tuberosusAAT. ..ATC..... .A...--... ..-..... .---

 R. hastatulus (NC)-.. --C..... .A...--... ..-..... .---

 R. hastatulus (TX)-.. --C..... .A...--... ..-..... .---

 R. abyssinicus T...T...-.. --TA.T.. AA...--...T...-..-A.. .---
C..
 R. sagittatus-.. T.--C..T.T .AT...--... ..A...-.. ..T...-.... .---
 A.A...
 R. hastatus ...G..... --.A.G.. CA.C.--C..-..... -G.. T---
T.
 R. induratus-.. --C..... .A...--C..G.-..... .---

 R. scutatus-.. --C..... .A...--C..-..... .---
 .ATA.....
 R. lunaria T.....-.. --...T.. AA...--...A...-..... .---
 A.....
 R. acetosaAAT. ..ATC..... .A...--... ..-..... .---

 R. papillarisAAT. ..ATC..... .A...--... ..-..... .---

 R. acetosella-.. --C..... .A...--... ..-..... .---

 R. conglomeratus-.. .A-C..... .A...--...CT T.....-.... .---

 R. crispus-.. .A-C..... .A...--C..CT TT.....-.... .---
G.
 F. convolvulus-.. -A-C..... .A...--...A...GT C.C.AC.... .---

 R. bucephalophorus-.. --C..... .A...--... ..-..... .---

 R. intermediusAAT. ..ATT..... .AT...--C.. A...A...-..... .---

 R. thyrsoidesAC-.. --C..... .A...--C..-A... T---
 ATT...

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

R. suffruticosus- . --C..... .A...--... ..-..... -...-..... -...-

R. paucifolius- . --..C.A. .A...AT..CT...- . ..-..... -...-
 T.T.T.

R. vesicarius CGCCCTCTG- CGGCCTCC-G GAGGTCGA-G GAC---CGAG -CACGCGGAC
 CCCCgggTCC
R. roseus .C..G..CTTGA CG...T...- ..T---...T -.GA.A....

R. japonicusAC G.C..C..G. ...A..ATC. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
R. graminifoliusC G.T...GGA ..A.....- .CT---GA.A -A.T.....
 ..T.....
R. cypriusC G.C.TC.--.-..... -.....G.

R. pulcherC G.C.A.C..G. ...A..ACC. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
R. maderensisC G.C.T.A-G. ...A.....- .GAATTT.TA G..T....G.
 A...T.C..
R. sanguineusC G.C..C..G. ...A..ACC. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
R. aquitanicusC...C GCC..C.TG. ...A..ATC. .C---G..C -ACA..... -
 ...-..T
R. obtusifoliusC G.C..C..G. ...A..ATC. .C---.CCC -ACA..... -
 ...-...
R. patientiaC G.C..C..G. ...A..ATC. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
R. cristatusC G.C..C..G. ...A..ATC. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
R. giganteusT G.C..C..G. ...A..ATC. .C---.C.C -A.A..A... -
 .T.-...
R. tuberosusA G.C..G.-G. AGA.C.T.-. ..A---AC.C T.....
 ..T.....
R. hastatulus (NC)C G.T...GG. ..A.....- .CT---G..A -A.....G.
 ..T.....
R. hastatulus (TX)C G.T...GG. ..A.....- .CT---GA.- -A.....G.
 ..T.....
R. abyssinicus T.....-GA ...A.....- ..T---G... -.....
 ...A.....
R. sagittatus- .A.....TG. ..AA.....- .---.A.. -...T...
 ...A.....
R. hastatusT..C G...T...- . ..T...- ..T---T... -.....
 .TT.C.....
R. induratusC G.C..C.-G. ...A.....- .---TCGA G..T....G.
 AT...T.C..
R. scutatus T.....C G.C..C.-G. ...A.....- .---.GA G..T....G.
 AT...T.C..
R. lunaria--.....A.-. ..T---...C -.....A...
 ...A.....
R. acetosaC G.C.AA.-G. A.A...T.-. ..A---AC.C T.....
 ..T.....
R. papillarisC G.C.AA.-G. AGA...T.-. ...---AC.. T..T.....
 ..T.....
R. acetosellaC G.T...GGA ..A.....- .CT---GA.A -A.....
 ..T.....
R. conglomeratusC G.C..C..G. ...A..ACC. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
R. crispus -.....C G.C..C.-. ...A.-ATT. .C-----C -...--C.. ----
 ---..T
F. convolvulusCGA.C G.T..C.-.C.A.G. ..-----
 .TA-A.A
R. bucephalophorusC G.C..G.A- . ..-.....- ..A---AG- CA.GCG.AC. -
 G.A....
R. intermedius .AT.....C G.C..C.-GA A.A...T.-. ...---AC.C T..T.....
 ..T.....
R. thyrsoides G.....AC G.C..C.-G. ...A.....- .---AC.C T..T.....
 ..T..CAA..

APÉNDICE 2.-

#R180_M81B	TATGG-TAAT	ATCTCGATCA	TATGAGAAGG	AATCGGCTC-	GAAATATCG-
#R180_M70B	...A.-....ACG..T.A	...A....-	A.....-
#R180_M67B	...A.-....CG.CG.AA.--
#R180_M64B-	A.....A	...A....--
#R180_M82B-A.C..CA	...A....--
#R180_M82	...A.-....T.....A-	C.....-
#R180_M80B	...T.-....	.A..T..C..AT--
#R180_M80	...A.-....A	...AA...-	A.....-
#R180_M78B	...A.-....A..T..	...CG...A	G....A.T--
#R180_M78	...A.-....ACG...A	...A..T-	A.....T.-
#R180_M77	...A.-....ATG...A	...C....-	A.....-
#R180_M76B-	.C.....A--
#R180_M76	...A.-....A	...A...-	A...C....-
#R180_74B	...A.-....T.....T..A--
#R180_M74	...A.-....TA	...T....--
#R180_M71C	...TA-CC..	..-G.T....	...C.A...A	...T....-T.-
#R180_M71B	...A.-..GC	..A..A....	...CG...A-	A.....T-
#R180_M71	...A.-....C.A...A	T.....-	A.....T.-
#R180_M69B	...A.-....CG...A--
#R180_M69	...A.-....ACGA...A	...C....-	A.....-
#R180_M66A	...A.-....	..A.T.....	...CG..T.AT-T.-
#R180_M66	...A.-....CG...A	..A.A.A.-AA-
#R180_M65A	...A.-....AAGTT..A	...A.G.-	A.....A-
#R180_M65	...A.-....CG...A	..C..A...--
#R180_2a	A..A.-....T..A-T.-
#R180_42	...A.-....AG...A	..AT.A...-A-
#R180_35	...A.-....C.A..AA-A.-
#R180_10	...A.-....CG...A	..C.AA...-	...G...T.-
#R180_6	...A.-....ACG...A	...A...-A-
#R180_34	...A.-....CG...A	..C.AA...-	...G...T.-
#R180_31A	...A.-....ACT...TA	...T...T-	A...G...T.-
#R180_31B	...A.-....T.....	...C...AA.T-A-
#R180_31C	...A.-....CG..T.AT-	T.....T.-
#R180_49	...A.-....	..G.....	...C.AG..AC	...G.....-
#R180_9a	...A.-....ACG...A	...T...T-	A.....T.-
#R180_9b	...A.-....A	T..T....--
#R180_17a	...A.-....CG...A	...T.A.A-TA-
#R180_17b	...A.-....T-...G	...C...AA-	T.....-
#R180_38a	...A.-....ACG...AA.-	A.....-
#R180_38b-A	...T....-A-
#R180_26a	...A.-....CG...A	...T.A.A-A-
#R180_26b	...A.-....C.A...A-A.-
#PAP_M110	...A.-....A...A	..AT.T...-A-
#PAP_M102	...A.-....AAA.--
#PAP_M101	...A.-....C.T....--
#PAP_M16	...A.-....C.A...A	...A....-T.-
#PAP_M7B	G..T.-....	.G.....	...A...A-T.-
#PAP_M7	...A.-....A	...T....-	A.....-
#PAP_M68A	...A.-....A...A	..C..T...--
#PAP_M68B	.T.A.-....	...A.....	.TAC.A...A	..C.....--
#PAP_M69A	...A.-....A.C.A	..C..T...-	T.....-
#PAP_M69B	...A.-....C.A...A	..C.....--
#PAP_M71A	...A.-....A...A	TCT.T...-	T.....-
#PAP_M71B	...A.-....C.A...A	..C.....T-	...TA...C-
#PAP_M73A	...A.-....C.A...A	..C.....--
#PAP_M73B	...A.-....	A...A...A	..C..T...--
#PAP_M74A	...A.-....	- --AA.A...AT--
#PAP_M77A	...A.-....A.A...A--

```

#PAP_M77B .T.T.-.... .A...G--- -----...A ...A.A.- .....T.-
#PAP_M78A ...A.-.... ..... A...A..A ..C..T...- ...G.....-
#PAP_M78B ...A.-.... ...AT..... ....AC..A .TC..T...- .....A.-
#PAP_M81 ...A.C.... ..... ..A...A ..CG.T...- A.....-
#PAP_M70 ...A.-.... ..... .TGA...C ..C.....- .....T-
#PAP_M83 ...A.-.... ..... .TGC.A...A ..A.....T- .....-
#PAP_M80 ...A.-.... ..... .C.C.A..TA ...T.....- A.....T.-
#PAP_M84 ...A.-.... ..... ..TA ...T...T- .....AAA-
#PAP_M81B ...A.-.... .A..T..C .....A...A ..C..T..A- .....AT.-
#PAP_M70B ...A.-.... ..... ..A...A ..C..T..T- .....A-
#PAP_M83B ...A.-.... ...T..... ..C.A...A ..C.A...- .....-
#PAP_M75B ...T.-.... ..... ..C.A...A .....G.- A....A.-
#PAP_M79B A..A.-.... ..... ..A.A...A ..C.....- .....T-
#PAP_M80B ...A.-.... ..... ..A..-A ..CT.TT.- .....A-
#PAP_M84B ...A.-.... ..... ..A...A ..CT.T...- T.....-
#MAR-20A ...A.-.... ..... ..C..T.A .....CT- .....A.-
#MAR-17A ...A.-.... ..... ..C.A..NA ...T.T...- .....A.-
#MAR-15A ...A.-.... ..... ..A.A..-A ..C.....- .....-
#MAR-12A ...A.-.... ..... ..G..TA .....T...- .....-
#MAR-20B ...A.-.... ..... .A. ...C.A...A ..T.....- .....C-
#MAR-17B ...AT-.... ..... .A. ...C.A...A ..CN...T- AGN.....-
#MAR-15B ...A.-G... ..... ..C.A..TA ...T.....- A.....-
#MAR-12B ...A.-G... ..... ..C.A..TA .....- A.....T-
#MAR-18A ...A.-.... ..... ..ACG...A .....AT- A....CT.-
#MAR-16A ...A.-.... ..... ..ACG...A .....AT- A....CT.-
#MAR-9 ...A.-.... ..... ..ACG...A .....T- A.....T.-
#MAR-7B ...A.-.... .A. ....CG...A .....AA- .....T.-
#MAR-18B ...A.-.... ..... ..CG..T.A .....T- .....T.-
#MAR-10A ...A.-.... ..... ..C.A...A .....- .....A.-
#MAR-5A ...A.-.... ..... ..CG..T.A .....A..T- .....T.-
#MAR-7A ...A.-.... ..... ..AGA.T.A .....T- .....T.-
#MAR-14B ...A.-.... ...T..... ..C...A .....T- .....A-
#MAR-11A ...A.-NN.. ..... ..TG...A ...T..A.T- .....-
#MAR-11B ...A.-.... ..... ..C...TA ..C...T- .....-
#MAR-4B ...A.-.... ..... ..CG...A ..C.AAT.A- .....A-
#MAR-28B ...A.-.... ..... ..CG...A ..C.AAG.A- .....AA-
#MAR-10B ...A.-.... .A..A. ....CG...A ...NA.GA- A.....-
#MAR-14A ...A.-.... ..... ..AC...A ...T.....- A...G...G
#MAR-26B .....-.... .A.CT..... .....T.A ...A.....- .....-
#MAR-4A ...A.-.... ..... ..T...A ...T.....- A.....-
#MAR-23B .....-.... ..... .....TA ...G..A.- .....-
#MAR-16B .....-.... ..... C.....A .....- .....A-
#MAR-26A ...A.-.... ..... .....A .....- .....-
#MAR-23A ...A.-.... ..... .....A .....- .....A-
#MAR-28A ...A.-.... ..... .....G..A .....T.- .....-

#R180_M81B AAACGTTATG CCGAAACCGC C-AATATCAT GGATTTT--T CTATCGATA-
#R180_M70B ...AA..C. ..A....A. .-..... ..A.-- T.....A
#R180_M67B C..T.AA... ..A..... .-...G... ..A.-- .....A
#R180_M64B .TC.T..... .T.....C. .-..... ..A.A.-- .....-
#R180_M82B ..GT..... AT.....T. .-..... ..A.-- ..A.....-
#R180_M82 ..... AT.T..... .-...G..G. ...A.A.-- ..G..T...-
#R180_M80B .....C. ....T. .-..A...A .....A.-- .....-
#R180_M80 .....C. ..A..... .-..... ..A.-- .....-
#R180_M78B .....A.... ..A...A... .-..... ..A.-- ....T...A
#R180_M78 .....A.... ..A...TT.. .-..... ..GA.-- ....T...A
#R180_M77 ..CT.A.... ..AG...A. .-..AT.... ..AA-- T.....A
#R180_M76B .....C.... ..A..... A-...A.G ..A.A.-- .....T...-
#R180_M76 .TCT..... .TA...T... .-G..... ..A.-- .....-
#R180_74B .....TC.... ..A..... A-...A.G ..A.A.-- .....T...-
#R180_M74 .....T..... T.....T .-...G.... ..A.A.-- ..T..T...-

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#R180_M71C	...T.A....	..A.....	-......A.A	C....A.--A
#R180_M71BA....	G.A...A.C.	-......A.A	C.....--A
#R180_M71A....	..A.....	-T....A.A	C....A.--A
#R180_M69BA....	..A.....	-.AT.G..A.--	A.....A
#R180_M69	...T.A....	..AG..T.A.	-.TAT....AA--	T.....A
#R180_M66AA....	..AA.....	-......A..A.--A
#R180_M66	...AAA....	TAC....A.	-......A.--A
#R180_M65AA....	..A.....A.	-......A.--	T.....A
#R180_M65	...TAC....	..A.....	-......T.A.--A
#R180_2a	T.....T.	-......A.--A-
#R180_42	...AA....	..A.....	G-.....T..A.--A
#R180_35A....	G.T.....	-......A.A	C.G..A.--A..A
#R180_10A.C...	..A.....	A-.....CA.--A
#R180_6A....	G.A....A.	-......A.A	C....A.AT.A
#R180_34AC....	..A.....	A-....A...A.--A
#R180_31A	...T.A....	-......A.--	..T..T..A
#R180_31BA....	..A.....A.	-.G.....	..G..A.--A
#R180_31CA....	..AA..C....	-......AG.	T....A.--A
#R180_49A....	GAA.....	-......G.G	T....GG--	T.....A
#R180_9aA....	..A.....T	-......A.--	...T...A
#R180_9b	..TC.....	..A.....	-......T..	...A.A.---
#R180_17a	...G.A....	..AG.....T	A-.....A.--A
#R180_17bC..	T.....TA..	-.AA...CA.--A-
#R180_38aA....	..A.....	-T.....A.--	A.....A
#R180_38bG.G..	TAC.....	-.G..G..	...A.A.--	..G..T..C-
#R180_26a	...G.A....	..AG.....	-......A.--A
#R180_26bA....	G.T.....	-......A.A	C.G..A.--A..A
#PAP_M110A.A	-......TG.	AT...A.--A-
#PAP_M102A....	..A.....	-......A.--	T.....-
#PAP_M101	-......	A...A.---
#PAP_M16C..AT.T	-......TG.	AT...A.---
#PAP_M7B	...T.C....AC.	-......T.	.A...A.--	..T.....-
#PAP_M7	...T...A	.A.....	-.G.GA.---
#PAP_M68AA....C	..AA...AACG	.C....TG.	AT...A.--A-
#PAP_M68BA..A-T	-.C..TT.	AT...A.--	.C.....-
#PAP_M69A	..T.A....	..A..AT..	-.TG.	AT...A.--A-
#PAP_M69BA....	T.A...A...	-.TG.	.T...A.---
#PAP_M71A	...A.C..A.TA...	-.TG.	AT...A.--A-
#PAP_M71BA....A.AA	T-....TG.	AT...A.--	...G..A-
#PAP_M73A	T...A..T	-.TG.	AT...A.---
#PAP_M73BA..A...	T-....T..	AT...A.---
#PAP_M74AA..C.	..A...AT	-.GCA.A	C....A.--A
#PAP_M77A	...TA....	..A.....	-.T.A.A	C....A.--A
#PAP_M77B	...AA....	T.A...T.	-.ATAA.--A..A
#PAP_M78AAA..AG..	-.T..	AT...A.--A-
#PAP_M78BA...	-.ATG.	AT...A.--A-
#PAP_M81A....	..AA..A...	T-....TC.	AT...A.--A.A-
#PAP_M70	...T.....	TG...A...	-.TG.	AT...A.---
#PAP_M83A....AA.T	-.CTG.	AT...A.---
#PAP_M80A....	G.A...T..	T-....AGA	C..A.A.--C.A
#PAP_M84A....	..G.....	-......A.---
#PAP_M81BA....A...	-.TG.	AT...A.--	...T..A-
#PAP_M70BA...	-.ATG.	AT...A.--A-
#PAP_M83B	...C.....A..T	-.T..	.T...A.--	-----
#PAP_M75B	..C.T....	..A...A...	-.CT..	AT...AA--	...T....-
#PAP_M79BT...T..TT	-.TG.	AT...A.---
#PAP_M80BGA...A.A.	-.TG.	AT...A.--	T.....A-
#PAP_M84B	..T.A....	..A..AT..	-.TG.	AT...A.--A-
#MAR-20AA....	G.T.T....	-.A.A	CAG..A.--A..A
#MAR-17A	CNNN.A...	G.T...A..G	-.A.A	C....A.--	ACT..A..A
#MAR-15AA.--	A.A...C.	T-....A.A	C..C.A.--	A.....G..A

```

#MAR-12A      . . . . . A . . . . . G . A . . . . . - . . . . G . A . A C . . . . A . AT . . . . . A
#MAR-20B      . . . T . A . . . . . G . A . . . . . - . . . . . A . A CAG . . A . - - . T . . . T . . . . A
#MAR-17B      . . . . . A . . . . . G . A . . . . . - . . . . . A . A CAG . . A . - - . T . . . . . A
#MAR-15B      . . . . . AA . . . . . G . A . . . . . - . . . . . A . A C . . . . A . - - . T . . . . . A
#MAR-12B      . . . . . A . . . . . G . A . . . . . - . . . . . A . A C . . . . A . - - . T . . . . . A
#MAR-18A      . . . . . A . . . . . . A . . . . . - . . . . . A . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-16A      . . . . . A . . . . . . A . . . . . - . . . . . A . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-9        . . . . . A . . . . . . A . . . . AA . - T . . . . A . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-7B       . . . . . A . . . T . TA . . . . . A - T . . . . . T . . . . AC - - . . . . . . . . . A
#MAR-18B      . . . . . A . . . . . AA . . . . . A . - . . . . AG . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-10A      . . . . . A . . . . . AAAG . . . . . - . . . . . A . A CAT . . A . - - . . . . . A . . . A
#MAR-5A       . . . . . A . . . T . AA . . . . . A . - . . . . A . . . . . A . - - . . TC . . . . . A
#MAR-7A       . . . . . A . . . . . AA . . . T . . - . . . . A . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-14B      . . . TAA . . . . . . A . . . . . A . - . . . . G . G . AG . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-11A      . . . G . A . . . . . - A . . . A . . - T . . C . G . . . C . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-11B      . . . . . A . . . . . . A . . . . . G . - . . . . T . . A . C . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-4B       . . . . . AC . . . . . . A . . . . . A . - . . . . . . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-28B      . . . . . AC . . . . . . A . . . . . . . - . . . . . . . . . . A . - - . . . . . . . . . A
#MAR-10B      . . . . . A . . . . . . A . . . . . . . - . . . . . . . . . . A . - - . . . . . A . . . A
#MAR-14A      . . . . . A . . . . . . . . . . . T . - . . . . . T . . . . A . - - . . CG . . T . . . A
#MAR-26B      . TC . . . . . . A . . . . . T T - . . . . . . . . . . A . A . - - . . . . . . . . . -
#MAR-4A       . TCT . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . T . . . . A . A . - - . . . . . . . . . -
#MAR-23B      . . AT . . . . . TT . . . . . T - . . . . . . . . . . A . A . - - . . . . T . . . -
#MAR-16B      . . . . . T TT . . . . . - . . . . . . . . . . A . A . - - . . . . T . . . -
#MAR-26A      . . . . . C . . . . . . . . . . . A . - . . . . . . . . . . A . A . - - . . . AA . . . -
#MAR-23A      . . . . . T . . . . . . . . . . . T . - . . . . . T . A . A . - - . . . . N . . . -
#MAR-28A      . . . . . T . . . . . . . . . . . TA . . . - . . . . . . . . . . A . A . - - . . G . . T . . -

```

```

#R180_M81B   TGAATGAAGT TCGATGAAAA ACGTTAG-AA TTCA-CCTAT AC-----
#R180_M70B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . C-A . . . . . T-----
#R180_M67B   . A . . . . . . A . . . . . T . . G . - . . . . - TA . . T-----
#R180_M64B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . AG . . ------
#R180_M82B   . . . . . T . C . A . . . . . T . . . . . - . . . . . G . T-----
#R180_M82    . . . . . . . . . . . A . . . . . - . . . . . - . . . . . G . . ------
#R180_M80B   . . . . . . . . . . . C . . . . . . . . . . . - . . . . . - AT . . . A-----
#R180_M80    . . . . . - - - . . . . . . . . . . . A . . . - - . . . A . C-----
#R180_M78B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . . . ------
#R180_M78    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . C . C . TA . . - . . . . . ------
#R180_M77    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . C-A . . . ------
#R180_M76B   . . . . . A . . . . . . . . . . . - . . . . . A . . . . . - . . . . . ------
#R180_M76    . . TA . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . G . . ------
#R180_74B    . . . . . A . . . . . . . . . . . - . . . . . A . . . . . - . . . . . G . . ------
#R180_M74    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . T . . . . . - . . . . . G . . ------
#R180_M71C   . . . . . T . . A . . . . . . . . . . . G . - . . A . G . - . . A-----
#R180_M71B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . G . - . . . . . . . C-----
#R180_M71    . . . . . G . A G . A . . . . . . . . . . . G . - . . AAG . - . . . ------
#R180_M69B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . C . G . - . . . . . A . . T-----
#R180_M69    . . . . . . . . . . . T . . . . . . . . . . . - . . . . . C-AT . . . ------
#R180_M66A   . . . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . . A . . . . . - . . . . . ------
#R180_M66    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - T . . . - C . . . . . ------
#R180_M65A   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . G . - . . . T . - . . . . ------
#R180_M65    . . . . . A . . . . . . . . . . . C . . . . . - . . . . . - . . . . . ------
#R180_2a     . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . A . . . ------
#R180_42     . . . . . A . . C . . C . T . . . A . . . . . - . . . . . - . . . . . ------
#R180_35     . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . - . . . . . ------
#R180_10     . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . T-----
#R180_6      . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . - A . . . . . ------
#R180_34     . T . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - . . . . . T-----
#R180_31A    . . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . . - . . . T - . . . - G . A . T-----
#R180_31B    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . G . - . . . . . A . . T-----
#R180_31C    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . - A . G . - . . . . . ------

```

```

#R180_49      . . . . . G . . . . . A.G . . . . .
#R180_9a     . . . . . .A . . . . . . . . .A . . . . .
#R180_9b     . . . . . . . . . .G . . . .A.G . . . . .
#R180_17a    . . . . . .A . .T . . . . . . . . .A .G . . . . .
#R180_17b    . . . . . . . . . . . . . . .T . . . .C .T . . . . .
#R180_38a    . . . . . . . . . . . . . . .T . . . .G .G .G . . . . .
#R180_38b    . . . . . G . . . . . . . . .A . . .AG . . . . .
#R180_26a    . . . . . . . . . . . . . . .T .A . . . . .
#R180_26b    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#PAP_M110   . . . .T . . . .G . . . . .G . . . .A . . . .T C . . . . .A .T . . . . .
#PAP_M102   . . . . . . . . . . . . . . . . . . .C . . . . .G . . . . .
#PAP_M101   .T . . . . .A . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .G . . . . .
#PAP_M16    . . . . . . . . . . . . . . .A . . .A .G . . . . . . . . . . .
#PAP_M7B    . . . . . . . . . . . . . . .A . . . .T . . .C . . .G . . . . .
#PAP_M7     C . . . .T . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . .
#PAP_M68A   . . . . . . . . . . . . . . .A . . .A .G . . . . .T . . . . .
#PAP_M68B   . . . . . . . . . . . . . . .C . . . . . . . . . . .A . . . . .
#PAP_M69A   . . . .G . . . . . . . . . .G . . . .T . . . . . . . . .A . . . . .
#PAP_M69B   . . . . . . . . . . .A . . . . .T . . .C . . . .T . . . . .T . . . . .
#PAP_M71A   . . . . . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . .T . . . . .
#PAP_M71B   G . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . .T . . . . .
#PAP_M73A   .A . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . .A . . . . .
#PAP_M73B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . .
#PAP_M74A   . . . . . . . . . . . . . . . . . . .C . . . . . . . . .G . . . . .
#PAP_M77A   . .T .A . . . . . . . . . . . . . . .G . . . .A .A . . . . .
#PAP_M77B   . . . . . . . . . . .C . . . . .G . . . . . . . . . . . . . . .
#PAP_M78A   . . . . . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . . . .
#PAP_M78B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . .G . . . . .
#PAP_M81    .C . . . . .A . . . . .A . . . . .T . . . . . . . . . . . . . . .
#PAP_M70    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .TG . . . . .
#PAP_M83    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .A . . . .T . . . . .
#PAP_M80    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .C . . . . . . . . .
#PAP_M84    . . . . . . . . . . .G . . . . . . . . . . .C . . . .A . . . . .
#PAP_M81B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#PAP_M70B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .C . . . .A . . . . .
#PAP_M83B   . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . .A . . .T . . . . .C . . . . .
#PAP_M75B   . . . . . . . . . . .G . . . . . . . . . . .G . . . . . . . . .
#PAP_M79B   . . . . . . . . . . . . . . . . . . .A . . . . . . . . . . .
#PAP_M80B   . . . . . . . . . . . . . . .T . . .T . . . . .G .G . . . . .
#PAP_M84B   . . . . . . . . . . . . . . .A . . .T . . . . .T . . . . . . . . .
#MAR-20A    . . . . . . . . . . . . . . . . . . .A . . . . . . . . . . .
#MAR-17A    . . .C . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#MAR-15A    . . . . . . . . . . .N . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . .
#MAR-12A    . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . .
#MAR-20B    . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . . . .G . . . . .
#MAR-17B    . . . . . . . . . . . . . . .GC . . . . .T . . . . .N . . . . .
#MAR-15B    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#MAR-12B    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#MAR-18A    . . . . . . . . . . . . . . .AA . .T . . . . . . . . .A . .T . . . . .
#MAR-16A    . . . . . . . . . . . . . . .TT . . . . . . . . . . .GG . . . . .
#MAR-9      . . . . . . . . . . .CC . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#MAR-7B     . . . . . . . . . . . . . . .T . . .GA . . . . . . . . . . .GGCTATAC
#MAR-18B    . . . .T . . . . . . . . . . .AA . .T . . . . . . . . . . .
#MAR-10A    . . . . . . . . . . . . . . .AA . .T . . . . . . . . . . .
#MAR-5A     . . . .TC . . . . .C . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . .
#MAR-7A     . . . .T . .A . . . . . . . . . . .A . . . . . . . . . . .
#MAR-14B    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#MAR-11A    . . . . . . . . . . .A . . . .AT . .T .G . . . .G .A .A . . . . .
#MAR-11B    . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . . . . . .T . . . .A . . . . .
#MAR-4B     . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .T . . . . .
#MAR-28B    . . . . .A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
    
```


#R180_M78B
#R180_M78
#R180_M77
#R180_M76B .C..
#R180_M76 .C..
#R180_74B .C..
#R180_M74 .C.T
#R180_M71C
#R180_M71B
#R180_M71
#R180_M69B
#R180_M69
#R180_M66A
#R180_M66 C..G
#R180_M65A
#R180_M65
#R180_2a
#R180_42
#R180_35
#R180_10
#R180_6
#R180_34
#R180_31A
#R180_31B
#R180_31C
#R180_49
#R180_9a
#R180_9b
#R180_17a
#R180_17b
#R180_38a .CC..
#R180_38b
#R180_26a
#R180_26b
#PAP_M110
#PAP_M102 .A..
#PAP_M101 .C..
#PAP_M16 G...
#PAP_M7B .C..
#PAP_M7 .C..
#PAP_M68A G...
#PAP_M68B
#PAP_M69A
#PAP_M69B
#PAP_M71A
#PAP_M71B .A..
#PAP_M73A
#PAP_M73B
#PAP_M74A .C..
#PAP_M77A
#PAP_M77B .A..
#PAP_M78A
#PAP_M78B .C..
#PAP_M81
#PAP_M70
#PAP_M83
#PAP_M80 ...T
#PAP_M84 ...T
#PAP_M81B .A..
#PAP_M70B ...T
#PAP_M83B A...

#PAP_M75B ..CC
#PAP_M79B ..T.
#PAP_M80B
#PAP_M84B ..C.
#MAR-20A
#MAR-17A
#MAR-15A
#MAR-12A
#MAR-20B .C..
#MAR-17B
#MAR-15B
#MAR-12B
#MAR-18A ..GC
#MAR-16A .C..
#MAR-9 .C..
#MAR-7B .C..
#MAR-18B ...T
#MAR-10A
#MAR-5A
#MAR-7A
#MAR-14B
#MAR-11A
#MAR-11B
#MAR-4B ..GG
#MAR-28B
#MAR-10B
#MAR-14A
#MAR-26B .C..
#MAR-4A .CC.
#MAR-23B .C..
#MAR-16B .C..
#MAR-26A .A..
#MAR-23A .C..
#MAR-28A .C..

APÉNDICE 3.-

#PAP_13	TATAGTANTC	TCTCGATCAT	ATCAAAAAGAA	TTTGGCTC-G	AAATATCGAA
#PAP_16A.AT.G.....	A.C.....-C....
#PAP_28AAGG.....	A.....T-A...
#PAP_12AN-
#PAP_17A.A-
#PAP-H115B	...G...A.A	.A.T.....	..G.G.....	A.C.....-A..
#PAP-H115A.AG.G.....	A.C.....-
#PAP-H108BA.AG.....	A.C..A.-A.T
#PAP-H108A.AGG.....	A.CT.A.A-A..
#PAP-H103BA.A	..G...A..	A.C.A.-
#PAP-H103A.A	A.C.....-A...
#PAP-H8BA.AG.G.....	A.C.....-AT
#PAP-H8A.AG.G.....	A.C.A.-A
#PAP-H28A.AAGG.....	A.....T-A...
#PAP-H13A.A-
#INT25aA.AT.G.....	A.C.....-AGA...
#INT25b	...G...A.A	.A.....	..G.G..T..	A.C.....-AA.C
#INT46aA.AC	..G.G.....	A.C.....-T.
#INT46b	...T...A.A	...A.....	..G.G.....	A.C.AT.-A
#INTF_121A..N	A.C.....-A..
#INTF_14A.AG.G.....	A.G..A.-AT...
#INTF_35TA..A.G...G	ACCAA.C.-A..
#INTF_121B	...G...A.A	A.....T..	A.C.....-A
#INTF_14BA.AA.GG..T..	A.C...T-AT...
#INTF_35BA.AN	.A.CG.....	A.C...T-A	...G.T...
#INTF_14CA.AG.....	ACC.A.-
#RA-F20A.AG.....	A.....-AAT..
#RA-F30	...T...A.A	...T....	..G.G.....	A.CA.T.-A
#RA-F31A.AT.G..T..	..N.....-T
#RA-F8A.A	T.G.G.....	-AC.....-A..
#RA-F49A.AG.G.....	A.C.....-	...C.....
#RA-F9A.AG.G.....	A.C.....-	...A.....
#RA-F3A.AA.GG.....	A.CC...-A
#RA-F14A.AA.GG.....	A.CC...-A
#RA-F37A.AGG.....	ACCAA.C.-AA..
#RA-F48A.AA.GG.....	A.CA...-A
#RA-F17A.AT.G.....	A.C.....-	...G.....
#RA-F43A.AT..	A..T.T.--TG.
#RA-F41A.A	A.....-T..
#RA-F46A.AG.....	ACC.....-
#RA-F24	-----	-----	-----	-----A.T
#RA-F2A.AGGCG...	A.C.AA.-
#RA-F5A.AC.GG.T..	A.C.....-T...
#RA-F36A.AA.....	A.C.....-A
#RA-F38A.AGG.....	ACC.A.-
#RA-F101	...G.T.AG.....	A.C.....-
#RA-F102A.AC..	..G.....	ACC.TA.-AT...
#RA-F103	...C..A.A	.T.A.....	A.C.AA.-	...TA.T..
#RA-F104A.AGG.....	ACCAA.C.-AA..
#RA-F105A..GT.	T.A...A..	.CA..G..C.A..
#RA-F106	...G.C.A.A	.T.T.....	..G.G.....	ACC.....T-
#PAP_13	A-TGATA-TG	CCAAAACCGC	CAATATAAAC	G-ATTATTCT	AT-C-AATAA
#PAP_16	-.C.....-AG.....C-.-G....
#PAP_28	-.C.....-C.TG-.-G....
#PAP_12--.-.....
#PAP_17--.-.....

```

#PAP-H115B .-C.T.-.T ..G.....T. ....C.TG .-...T.... ..-G...-
#PAP-H115 .-C.T.-C. .TG..... .C.TG .-...T.... ..-G...-
#PAP-H108B .-CA...-.. ..A... ..C.TG .-C.....T. C.-G...
#PAP-H108 .-G...-.. ..C.TG .-.....T. ..-G...
#PAP-H103B .-C...-.. G.....A...T A-G.....T. ..-G...
#PAP-H103 .-C...-A G.T...T.. ..-G..... ..-G...
#PAP-H8B C-.T.G-.. .T...T... ..C.TG .-.....T. ..-G...-
#PAP-H8 .-C.T.-.. ..G..... .C.TG .-...T.... ..-G...-
#PAP-H28 .-C...-.. ..C.TG .-.....T. ..-G...
#PAP-H13 .-.....-.. ..-G..... ..-G...
#INT25a .-CCT...-C. ....T. ....C..G .-A..... ..-G...T
#INT25b C-.T.-.. ..G..... .C.TG .-A..... ..-G...T
#INT46a .-C.T.-.T .GG..... .C.TG .-A..... ..-T...T
#INT46b .-C.C.-.. ..G.....T. ....C.TG .-A..... G.-G...T
#INTF_121 .-C.N.-.. G.....A. .... .-.....AT. C.ATCG...
#INTF_14 N-.CC.-.. ..C.TG .-.....T. ..-T-G...
#INTF_35 T-.CC-AT G.C..A.CG .C.ATATC.T A-.A.CA.TC TAT.-G...
#INTF_121B .-C...-.. G..... .-.....T. ..-G...
#INTF_14B .-C...-.. .T..... .C..G .-.....T. ..-T-G...
#INTF_35B .-C...-.. .T.....A. .T.....TG .-.....T. ..-G...
#INTF_14C .-AC...-.. ..G.....CTTG .-.....T. ..-G...
#RA-F20 .-..T.-.. T.G..... .C.TG .-.....T. ..-T...-
#RA-F30 .-A.T.-A ..G..... .C.TG .-A.....T. ..-G...
#RA-F31 .-C.T.-.. ..C.TG .-A.....A ..-G...-
#RA-F8 .-C.T.-.. AGG..... .G.C.TG .-A..... G.-T...-
#RA-F49 .-C.T.-C. ....C.TG .-...T.... ..-G...-
#RA-F9 .-C.T.-.. ..G..... .C.TG .-A..... ..-G...-
#RA-F3 .-C...-.. ..G...A. .TAT.C.TG .-...A.T. ..-G...
#RA-F14 .-C...-.. ..G.T..A. .TAT.C.TG .-...A.T. ..-G...
#RA-F37 .-CAT...-.. ..AT ..C.TG .-.....T. ..-G...T.
#RA-F48 .-C...-.. ..A. A...C.TG .-...A. ..-G...
#RA-F17 .-C...-.. ..G...A CT..... .C.-G...
#RA-F43 .-C...-.. G..... .-.....T. ..-G...
#RA-F41 .-C...-T G..... .G.. .-.....T. ..-G.C..
#RA-F46 .-C...-.. ..G..... A-G..... ..-G...
#RA-F24 .-C...-.. ..C.T. .-.....T. ..-G...
#RA-F2 .-..A.-C ..T.TG .-.....T. ..-G...
#RA-F5 .-C...-.. .A.....TG .-.....T. ..-G...
#RA-F36 .-C...-.. ..T... ..-.....T. ..-G...
#RA-F38 .-AC...-.. ..T...CTTG .-.....T. ..-G...
#RA-F101 T-.....-.. T.G..... .C.TG C-T..... ..-G...-
#RA-F102 .-C.T.-.. ..G...A... G.....TGTA T-..... ..-G.A.-
#RA-F103 .A.....-.. ..T ..C.TG .-.....T. ..-T-G...
#RA-F104 .ACAT...-.. ..G.....T ..C.TG .-.....T. ..-G...
#RA-F105 C-CA...-T G.....A... .T.TA A-C..... ..-TG...T
#RA-F106 .-C.T.-.. TTG..... .C.TG C-.A..... ..-GT...-

#PAP_13 TGA--ATGAA GTTCGAT-GA AAAACGTTGG AAATGACGTA TACCAACCAC
#PAP_16 ...--..... ..-.....- ..T.C..C. ...TG....
#PAP_28 ...--..... ..T...-.. ..-.....- ..T.C..C. ...G...A
#PAP_12 ...--..... ..-..... ..-.....- ..-.....- ..-.....-
#PAP_17 ...--..... ..-..... ..-.....- ..-.....- ..-.....-
#PAP-H115B ...--..... ..T... ..-...A. ..T.C.GC.G ...G..A..
#PAP-H115 ...--..T... ..-.....- ..-.....- ..T.C..A.G ...G..A..
#PAP-H108B ...--..... ..-.....G.....A. ..T.C..C. ...G.....
#PAP-H108 ...--..... ..-..... ..-.....- ..T.C..CA. ...G.....
#PAP-H103B ...--..... ..-..... ..-.....- ..T.T..C. ...G.....
#PAP-H103 A.--..... ..-.....- ..-.....- ..T.C..C. ...G.G...
#PAP-H8B ...--TA... ..-.....- ..-.....- ..T.C..C.G ...G.....
#PAP-H8 ...--..... ..-.....- ..-.....- ..T.CGGC.G C...G..A..
#PAP-H28 ...--..... ..T...-.. ..-.....- ..T.C..C. ...G...A

```



```

#INTF_14B      . . . . . AAAT . . . -- . . . . . A . . CC . . - . . - . . T . . . . . - . . . . .
#INTF_35B      T . T . G . A . . T . . . - - A . . . . . A . . CA . . - . . - . . . . G . . . A - A . . . . .
#INTF_14C      . . . . . . . . T . . . . - T . . . . . A . . . . . - . . - . . . . . . . . . . . - . . . C . .
#RA-F20        . . . . . . . . AT . . . . - . A . . . . . A . CAT . . - . . - . . . . . . . . . . . - . . . . .
#RA-F30        . . . . . . . . AT . . . . - . . . . C . . . . . A . TGA . . - . . - . . G . . . . . - . . . . .
#RA-F31        . . . T . . C TCG . . . . T . . . . . A . . . . . - . . - . . . . . C . . - . . C . .
#RA-F8         T . . . . . . . . T . . . . - . . . . . A . . C . . - . . - . . . . . . . . . . . - . . . A . .
#RA-F49        GAGACTCGTT . . . - - T . . C . . . . . A . TCT . . - . . - . . . . . . . . . . . - . . . . .
#RA-F9         A . . . . . . . . AT . . . . - . A . . . . . A . . CC . . - . . - . . . . . . . . . . . - A . . C . .
#RA-F3         . . . . . . . . AT . . . . - . . . . . A . TCA . . - . . - . . G . . . . . - . . A . . . .
#RA-F14        . . . . . . . . AT . . . . - . . . . . A . . CA . . - . . - . . G . . . . . - . . . . C
#RA-F37        . . . C . . . . . T . . . . - . . . . . A . . . . . - . . - . . . . . . . . . . . - . . . . .
#RA-F48        AA . . . . . . . T . . . . - . . . . . A . . AAA . . - . . - . . . . C . . . . - AG . . . . .
#RA-F17        . . . . . . . . T . . . . - . . . . . A . . AT . A - . . - . . . . . . . . . . . - . T . . . . .
#RA-F43        . . . . . . . . T . . . . - T . C . . . . . A . . AAAA - . . - . . . . . . . . . . . - G . . . . .
#RA-F41        . A . A . . . . . T . . . . - T . - . . . . A . TGT . . - A . . - . . . . . . . . . . . - . . . . .
#RA-F46        . . C . . . . . . T . . . . - . . . . . C . . C . . A - . . - . . . . . . . A - A . . . . .
#RA-F24        TA . . . . . . . AT . . . . - T . A . . . . . A . . C . . - . . - . . . . . . . . . . . - A . . . . .
#RA-F2         . T . . . . . . . T . . . . - . . . . . C . . CACA - . . - . . . . . . . A - A . . . . .
#RA-F5         . . . . . . . . T . . . . - . A . . . . . A . . . . . - . A . G . . . . A . . - . . . . .
#RA-F36        . T . . . . . . . T . . . . - T . . . . . A . T . T . . - . . - . . . . . . . . . . . - . . . G .
#RA-F38        . . . . . . . . T . . . . - . . . . C . . . . . A . . . . . - . . - . . . . . . . . . . . - T . . . . .
#RA-F101       . . . A . G . . AT . C . - T . . . . . A . . . . . - T . . . . . . . . . . . - A . . C . .
#RA-F102       . . . . . . . . T . . . . - . . . . . A . . C . . - . . - A . . . . . . . . . . . - . . C . .
#RA-F103       . . . . . . . . AT . . . . - GT . . . . . A . - CC . A - . . - . . . . . . . A - A . . . . .
#RA-F104       . . . C . . AATT . . . . - GT . A . AT . GA . . - - . . . . . . . . . . . - . . . . .
#RA-F105       T . . . . . . . T . . . A - TTCC . A . . CTC . - C . - . . C . . . . C . - . . C . . .
#RA-F106       T . . . . . . . T . T . . . . - T - . . . . C . . . . - . . - . . . . . C . . - . . C . .
    
```


APÉNDICE 4.-

```

#RACEF_12A -----
#RACEM_22A -----
#RACEF_14A -----
#RACEF_34A -----
#RACEM_41A -----
#RACEM_17A -----
#RACEM_19A -----
#RACEF_20A -----
#RACEF_32A -----
#RACEF_25A -----
#RACEF_36A -----
#RACEM_34A -----
#RACEF_21A -----
#RACEF_12B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_22B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_14B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_34B TATTGGATTA TCTCAACCAT ATTTGAAGAA AATGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_41B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_17B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_19B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_20B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_32B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_25B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_36B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_34B TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA AACGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_21B TATCGGATTA CCTCAATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_12C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEM_22C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_14C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_34C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEM_41C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAGGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEM_17C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEM_19C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_20C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_32C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_25C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_36C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEM_34C TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATT
#RACEF_21C TATTGGATTA TCTCAATCAT ATTTGAAGAA ATCGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_12D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_22D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_14D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_34D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_41D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_17D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_19D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_20D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_32D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_25D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_36D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_34D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_21D TATTGGATTA TCTCGATCAT ATTTGAAAAA ATTGGCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_12E ----- ----GAAGAA ATTGTCTCGT TTCGACAATC
#RACEM_22E ----- ----GAAGAA ATTGTCTCGT TTCGACAATC
#RACEF_14E ----- ----GAAGAA ATCGTCTCAT TTCGACAATC
#RACEF_34E ----- ----GAAGAA ATCGTCTCAT TTCGACAATC
#RACEM_41E ----- ----GAAGAA ATCGTCTCAT TTCGACAATC
#RACEM_17E ----- ----GAAGAA ATCGTCTCAT TTCGACAATC

```

```

#RACEM_19E -----
#RACEF_20E -----
#RACEF_32E -----
#RACEF_25E -----
#RACEF_36E -----
#RACEM_34E -----
#RACEF_21E -----

#RACEF_12A -----
#RACEM_22A -----
#RACEF_14A -----
#RACEF_34A -----
#RACEM_41A -----
#RACEM_17A -----
#RACEM_19A -----
#RACEF_20A -----
#RACEF_32A -----
#RACEF_25A -----
#RACEF_36A -----
#RACEM_34A -----
#RACEF_21A -----
#RACEF_12B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_22B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_14B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_34B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_41B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_17B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_19B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_20B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_32B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_25B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_36B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ANAATGAAGG
#RACEM_34B GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_21B GATACTCGAC AACAGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTGTCTG ATAATGAAGG
#RACEF_12C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_22C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_14C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_34C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_41C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_17C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEM_19C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_20C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_32C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_25C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_36C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATAATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_34C GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT TGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_21C GATACTCGAC AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_12D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_22D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_14D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_34D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_41D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_17D GATACTTGAA AACAGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_19D GATACTTGAA AACAGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_20D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_32D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAANGAAGG
#RACEF_25D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCA ATAATGAAGG
#RACEF_36D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEM_34D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_21D GATACTTGAA AACGGTCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAAGG
#RACEF_12E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG

```

```

#RACEM_22E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_14E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_34E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEM_41E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEM_17E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEM_19E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_20E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_32E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_25E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_36E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEM_34E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG
#RACEF_21E GATACTCGAA AACGGCCAAT ATCATTGAAT AGTTCTATCG ATAATGAATG

#RACEF_12A -----G AAAATAGTTG ATATTGACCT ATATCGATGA CCGAG-ACTC
#RACEM_22A ----- . . . . . - . . . . .
#RACEF_14A ----- . . . . . - . . . . .
#RACEF_34A ----- . . . . . - . . . . .
#RACEM_41A ----- . G . . . . . - . . . . .
#RACEM_17A ----- . . . . . - . . . . .
#RACEM_19A ----- . . . . . . . TC . . . . . - . . . . .
#RACEF_20A ----- . . . . . - . . . . .
#RACEF_32A ----- . . . . . T . CN . . . . . . . G . . . . .
#RACEF_25A ----- . . . . . . . . . . . . . . . G . . . . .
#RACEF_36A ----- . . . . . N . C . . . . . . . . . - . . . . .
#RACEM_34A ----- . . . . . . . N . . . . . . . . . - . . . . .
#RACEF_21A ----- . . . . . GA . . . . . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEF_12B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEM_22B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_14B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_34B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEM_41B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEM_17B AAGTTGAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEM_19B AAGTTGAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_20B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_32B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_25B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_36B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEM_34B AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . - . . . . .
#RACEF_21B AAGTTTGAT . . . . . GAG . . . . . - . . . . .
#RACEF_12C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEM_22C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEF_14C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEF_34C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . TT . . . . . - . . . . .
#RACEM_41C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . TT . . . . . - . . . . .
#RACEM_17C AAGTTGAT . G . . . . . C . . . . . TT . . . . . - . . . . .
#RACEM_19C AAGTTGAT . G . . . . . C . . . . . TT . . . . . - . . . . .
#RACEF_20C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . TT . . . . . - . . . . .
#RACEF_32C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . TT . . . . . - . . . . .
#RACEF_25C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEF_36C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEM_34C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEF_21C AAGTTGAT . . . . . C . . . . . T . . . . . - . . . . .
#RACEF_12D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEM_22D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEF_14D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEF_34D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEM_41D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEM_17D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEM_19D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEF_20D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .
#RACEF_32D AAGTTCAAT . . . . . C . . . . . A . . . . . - . . . . .

```

```

#RACEF_25D AAGTTCAAT. . . . .C. . . . .A. . . . .- . . . .
#RACEF_36D AAGTTCAAT. . . . .C. . . . .A. . . . .- . . . .
#RACEM_34D AAGTTCAAT. . . . .C. . . . .A. . . . .- . . . .
#RACEF_21D AAGTTCAAT. . . . .C. . . . .A. . . . .- . . . .
#RACEF_12E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEM_22E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_14E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_34E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEM_41E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEM_17E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEM_19E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_20E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_32E AAGTCCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_25E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_36E AAGTTCGAT. . . . .G- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEM_34E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_21E AAGTTCGAT. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .

```

```

#RACEF_12A GTTTTTCGTT AAATCTTTT GTATATTTTG ATCAA
#RACEM_22A . . . . .
#RACEF_14A . . . . .
#RACEF_34A . . . . .
#RACEM_41A . . . . .
#RACEM_17A . . . . .
#RACEM_19A . . . . .
#RACEF_20A . . . . .
#RACEF_32A . . . . .
#RACEF_25A . . . . .
#RACEF_36A . . . . .
#RACEM_34A . . . . .
#RACEF_21A . . . . .T. . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_12B .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_22B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_14B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_34B .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_41B .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_17B .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_19B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_20B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_32B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_25B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_36B .A. .G. . . . .A. . . . .
#RACEM_34B .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_21B . . . . .T. . . . .
#RACEF_12C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_22C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_14C A. . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_34C . . .G. . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_41C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_17C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_19C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_20C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_32C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_25C A. . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_36C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEM_34C . . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_21C A. . . . .A. . . . .A. . . . .
#RACEF_12D . . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEM_22D . . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_14D . . . . .- . . . .- . . . .- . . . .- . . . .
#RACEF_34D . . . . .T. . . . .- . . . .- . . . .- . . . .

```

```

#RACEM_41D .....T... ..-- -----
#RACEM_17D .....T... ..-- -----
#RACEM_19D .....T... ..-- -----
#RACEF_20D .....T... ..-- -----
#RACEF_32D .....T... ..-- -----
#RACEF_25D ..... ..-- -----
#RACEF_36D ..... ..-- -----
#RACEM_34D ..... ..-- -----
#RACEF_21D ..... ..-- -----
#RACEF_12E -----
#RACEM_22E -----
#RACEF_14E -----
#RACEF_34E -----
#RACEM_41E -----
#RACEM_17E -----
#RACEM_19E -----
#RACEF_20E -----
#RACEF_32E -----
#RACEF_25E -----
#RACEF_36E -----
#RACEM_34E -----
#RACEF_21E -----

```

APÉNDICE 5.-

#sufm_43A	TATAG-TAAT	ATCTCGATCA	TATCAGAAGA	AATAGGCTCG	AAATATCA-A
#sufm_43B-G..	...C.....G-
#sufm_45A--
#sufm_41A-C.....-
#sufm_28B-C.....-
#sufm_24B-C.....-
#sufm_61B-C.....-
#sufm_45B-C..T...-
#sufm_82A-C...T.-
#sufm_28A-C	...C.....-
#sufm_24A-	C.....T.	...C.....-
#sufm_61A-C.....-
#suff_20A-C..C.....G-
#suff_21A-N..C.....-
#suff_21B-C.....A-
#suff_24A-N..C.....-
#suff_24B-T.....G-
#suff_129A-N..C.....G-
#suff_129B-C.....T-T
#suff_31A-N..T...A.TG-
#suff_31B-C.....T-T
#suff_41A-N..T.....G-
#suff_47A-N..T.A...T-T
#suff_47B-C.....TG-
#suff_49A-NC.T.A..T.G-
#suff_49B-C	...C.....-
#suff_50A-CC.GGC.....C-G-T
#suff_50B-C	...C.....-
#sufm_43A	AA-CGATATG	CCAAAACTGC	C-GATATTA-	TAGA-TTA-T	TCTATCGATA
#sufm_43B	..-.....C.C..	..-.....--.....-
#sufm_45A	..T-.....C..	..-.....--.....-
#sufm_41A	..T-.....C..	..-.....--.....-	..T.....
#sufm_28B	..T-.....C..	..-.....G--.....-
#sufm_24B	..T-.....T.C..	A-.....--.....-
#sufm_61B	..-.....C..	..-.....--.....-
#sufm_45B	..-.....C..	..-.....--.....-
#sufm_82A	..-.....C..	..-.....--.....-
#sufm_28A	..-..A.C...C..	..-.....--.....-
#sufm_24A	..-..C...C..	..-.....--.....-
#sufm_61A	..-..A.....G.C..	..-.....--.....-T...
#suff_20A	..-.....TC..	..-.....--.....-
#suff_21A	..-.....C..	A-A.....--.....-
#suff_21B	..-.....C..	..-.....--.....-	..T.....
#suff_24A	..-.....	..G...C..	..-.....--.....-
#suff_24B	..-..G...-.....--.....-
#suff_129A	..T-..G..G.C..	A-A.....--.....-
#suff_129B	..-.....-C..	..-.....--.....-
#suff_31A	..-.....-.....--.....-
#suff_31B	..-.....-C..	..-.....--.....-
#suff_41A	..-.....-.....--.....-
#suff_47A	TC-.....C..	..-.....-	C.....-.....-
#suff_47B	..-..G...C..	..-.....--.....-
#suff_49A	..-.....-.....--.....-
#suff_49B	..-.....C..	..-.....--.....-
#suff_50A	CC-.....-C..	..-.....--.....-
#suff_50B	..-..C...C..	..-.....--.....-

```

#sufm_43A AT-GAATGAA GTTC-GAT-- ---GAAAAAC -GTT-AGAAT TCACCTATAC
#sufm_43B ..-..... -...-...- ---..G.... -...-.....
#sufm_45A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_41A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_28B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_24B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_61B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_45B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_82A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#sufm_28A ..-..... -...-...- ---..... -...-..... .A...T.
#sufm_24A ..-..... -...-...- ---..... -...-..... .A...
#sufm_61A ..-..... -...-...- ---..... -...-..... .A...
#suff_20A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_21A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_21B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_24A ..-..... -...-...- ---..... -...-..... .....T
#suff_24B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_129A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_129B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_31A ..-..... -...-...- ---..G.... -...-.....
#suff_31B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_41A ..-..... -...-...- ---..... -...-..G.
#suff_47A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_47B ..-..... -...-...- ---..... -...-..... .....T
#suff_49A ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_49B ..-..... -...-...- ---..... -...-.....
#suff_50A ..-..... -...-...- ---..G.... -...-.....T.
#suff_50B ..-..... -...-...- ---A..... -...-.....

#sufm_43A CGACCACCGA GACTCGTTTT T-C-GTT-AA AATTTTGTGT ATATTTT-GA
#sufm_43B ..... -...-...- ..-...-... ..-...-...
#sufm_45A .....A.... -...-..G-.. .TG...T... ..-...-...
#sufm_41A .....A... ..-...-... ..CG...T... ..-...-...
#sufm_28B .....A.... -...-...- ..AG..... ..-...-...
#sufm_24B .....A.... -...-...- ..C...T... ..-...-...
#sufm_61B ..... -...-...- ..A...T... ..-...-...
#sufm_45B ..... -...-...- ..A...T... .....G-..
#sufm_82A ..... -...-...- ..A...T... ..-...-...
#sufm_28A ..... -...-...- ..AA...T... ..-...-...
#sufm_24A ..... -...-...- ..AA...T... ..-...-...
#sufm_61A .A..... -...-...- ..CA...T... ..-...-...
#suff_20A ..... -...-...- ..CG...T... ..-...-...
#suff_21A ..... -...-...- ..CC...T... ..-...-...
#suff_21B ..... -...-...- ..CG...T... ..-...-...
#suff_24A ..... -...-...- ..A...T... ..-...-...
#suff_24B .....G ..A.... -A-...- ..CG...T... ..-...-...
#suff_129A ..... -...-...- ..CG...T... ..-...-...
#suff_129B ..... -...-...- ..CA...T... ..-...-...
#suff_31A ..... -...-...- ..CA...T... ..-...-...
#suff_31B .....A.... -...-...- .....T... ..-...-...
#suff_41A ..... -...-...- ..CG...T... ..-...-...
#suff_47A .....A.... -...-...- ..C...T... ..-...-...
#suff_47B ..... -...-...- ..CG...TC... ..-...-...
#suff_49A ..... -...-...- ..CA...T... ..-...-...
#suff_49B ..... -...-...- ..CG...T... ..-...-...
#suff_50A ..... -...-...- ..CC...T... ..-...-...
#suff_50B .....A... -...-...- ..CC...T.A. ..-...-...

```

#sufm_43A -TTAA---
#sufm_43B -....---
#sufm_45A -....---
#sufm_41A -....---
#sufm_28B -....---
#sufm_24B -....---
#sufm_61B -....---
#sufm_45B -....---
#sufm_82A -....---
#sufm_28A -....---
#sufm_24A -....---
#sufm_61A -....---
#suff_20A -....---
#suff_21A -....---
#suff_21B -.C.---
#suff_24A -....---
#suff_24B -....---
#suff_129A -....---
#suff_129B -....---
#suff_31A -....---
#suff_31B -....---
#suff_41A -....---
#suff_47A -....---
#suff_47B -....---
#suff_49A -....---
#suff_49B -.C.---
#suff_50A -....---
#suff_50B -...G---

APÉNDICE 6.-

#RA_5	TCTCGG-ACC	AATTATCTCA	TTAATTGATG	TTTT--CTTA	A-TTATTGAG
#RA_4-51-A.....--.....-
#RA_12-5---.....-
#RA_12-6---.....-
#RA_6---.....-
#RA_12-2---.....-
#RA_33---.....-
#RA_50	-.....---.....-
#RA_8-G.....--.....-
#RA_40	-.....---.....G.
#RA_42	-.....---.....-
#RA_48---.....-
#RA_38	-.....---.....-
#RA_30---.....-
#RA_7-G.....--.....	T.....
#RA_34	-.....-C.....--.....-
#RA_44---.....-
#RA_46---.....-
#RA_25	-.....---.....-
#RA_13---.....-
#RA_24-G.T.....-A.....
#RP_42--.....C.....--.....G.....
#RP_45	.AG..A-T..T.C.....--.....G.....
#RP_1-T.C.....--.....-
#RP_51--.....T.C.....--.....G.....
#RP_37-T.C.....--.....-
#RP_46-T.C.....--.....G.....
#RP_39-T.CA.....--.....-
#RP_43-T.C.....--.....G.....
#RP_31N	---T.....T.....--.....-
#RP_32N	---T.....T.....--.....-
#RP_35N	-----	---.....T.....--.....-
#RP_30NC.....T.....--.....-
#RP_10N-TCC.....--.....-
#RP_139G.....T.C.....--.....-
#RP_6N-A.....--.....-
#RP_8N-T.C.....--.....	T.....
#RP_12N-T.C.....--.....-
#RP_34	-.....-T.C.....--.....-
#RP_35-T.....--T.....-
#RP_137	-----	-----T.C.....--.....-
#RP_40	-----	---.....T.C.....--.....-
#RP_143	-.....-T.C.....--.....-
#RP_38	-.....-G.T.C.....--.....-
#RP_36	-.....-AT.C.....--.....-A.....
#RP_19N-T.C.....C.....--.....-
#RP_41	-.....-T.C.....--.....-
#RA_5	CCAATGTATA	CTAGTTATT	CACTATATCG	GCTCCCAAAT	AATGAAACAA
#RA_4-51T.....
#RA_12-5
#RA_12-6
#RA_6
#RA_12-2
#RA_33T.....
#RA_50
#RA_8T.....
#RA_40T.G.....

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#RA_42T.....
#RA_48
#RA_38C.....A.....T.....
#RA_30
#RA_7T.....T.....
#RA_34C.....
#RA_44T.....G.....
#RA_46T.....G.....
#RA_25A.....A.....
#RA_13T.....
#RA_24
#RP_42-T-T.....
#RP_45G.....T.....T.....
#RP_1T.....T.....
#RP_51-T.....
#RP_37T.....
#RP_46
#RP_39T.....
#RP_43T.....
#RP_31NT.....T.....
#RP_32NT.....T.....
#RP_35NT.....
#RP_30N-T.....T.....
#RP_10NT.....T.....
#RP_139G.....T.....T.....
#RP_6NA.....
#RP_8NT.....
#RP_12NT.....
#RP_34T.....
#RP_35T.....T.....
#RP_137T.....
#RP_40T.....
#RP_143
#RP_38
#RP_36T.....
#RP_19NT.....
#RP_41
#RA_5	GCTCGAATTC	AACCAAATTC	TCCCAAAATA	AGCCCAATTG	TGTTATTT-A
#RA_4-51	...A.....	...A.....	.T.....-
#RA_12-5	...G.....T.....T.....G.....-
#RA_12-6	...G.....T.....T.....G.....-
#RA_6G.....-
#RA_12-2T.....-
#RA_33T.....-
#RA_50A.....-
#RA_8T.....C.....-
#RA_40	T.....C.....-
#RA_42-
#RA_48	...T.....G.....A.....-
#RA_38A.....T.A.....-
#RA_30	T.....A.....-
#RA_7-
#RA_34-
#RA_44	C.....T.....T.....G.....-
#RA_46T.....C.....-
#RA_25	AA.....G.....T.....G.....-
#RA_13-
#RA_24A.....A.....-
#RP_42A.....T.....-
#RP_45A.....T.....-

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#RP_8N	.A.....T	.G...G.CG	T.....
#RP_12N	.A.....T	.G...G.C	A.....
#RP_34	.A.....T	.G...G.CC
#RP_35	.A.....T	.G...CG.C
#RP_137	.A.....T	.G...G.CC	T.....A
#RP_40	.AC.....T	.G...G.CC	A.....A
#RP_143	.A.....T	.G...G.C
#RP_38	.A.....T	.G...G.CC
#RP_36	.A.....T	.G...G.CA
#RP_19N	.A.....T	.G...G.CC
#RP_41	.A.....T	.G...G.CC
#RA_5	TCAACTATCG	GATTTTTTAA	TGTCCTTAAA	ATGACCCCAT	TATACCAATA
#RA_4-51TCA
#RA_12-5	T.....TCG
#RA_12-6	T.....TCG
#RA_6AA...TCA
#RA_12-2TC
#RA_33TCA
#RA_50TCA
#RA_8C.CCAA
#RA_40TCC	G...A-
#RA_42TC	..A.A
#RA_48	.G.....TCA
#RA_38TCA.T
#RA_30TAA
#RA_7TCA
#RA_34TT.CA
#RA_44	A.....TCA
#RA_46	A.....TCA
#RA_25	A-.....T	..G...CA	..G.....
#RA_13C.TA
#RA_24	.G.....TTCA
#RP_42GTG.C	.C.A
#RP_45GTG.C	.C.A
#RP_1GT	.A..G.CA
#RP_51GTG.C	.C.A
#RP_37GTG.C	.C.A
#RP_46AGTC.A.T
#RP_39GTC	.C.A.T
#RP_43	.A.....TGTC	.C.A
#RP_31NGTG.C	.C.AT
#RP_32NGTG.C	.C.AT
#RP_35NGTG.C	.C.A
#RP_30NGTG.CG	.C.A
#RP_10NGTA.C	.C.A
#RP_139GTG.C	.C.A
#RP_6NAGTG.C	.C.A
#RP_8NGTT.C	.C.A
#RP_12NGTG.C	.C.A
#RP_34TGTC	.C.A
#RP_35A.GTG.C	.C.A
#RP_137GTC	.C.A
#RP_40GTC	.C.A.T
#RP_143GTC	.C.A
#RP_38GTC	.C.A
#RP_36GTG.C	.C.A
#RP_19NGTG.C	.C.A
#RP_41GTG.C	.C.A

```

#RA_5      AAGGCT-CAA TTAACTCATA TATTGACGTT TACTCCAAGA TAAAGCGCGT
#RA_4-51   .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_12-5   .....-A.. .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .CC....A..
#RA_12-6   .....-A.. .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .CC....A..
#RA_6      .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .....
#RA_12-2   .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_33     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_50     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_8      .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_40     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_42     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_48     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... GC....A..
#RA_38     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RA_30     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C....A..
#RA_7      .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C....T...
#RA_34     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... G....T.T..
#RA_44     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .CC.-----
#RA_46     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .CC..T.A..
#RA_25     ..T.C-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .CC....A..
#RA_13     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .CG....A..
#RA_24     .T.....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .C.....
#RP_42     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_45     ..A...-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG...TA..
#RP_1      .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_51     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_37     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TT......CG....A..
#RP_46     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_39     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...T....TG.T....CG....A..
#RP_43     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG.T....CG....A..
#RP_31N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...A.T....TG......CGT...A..
#RP_32N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...A.T....TG......CGT...A..
#RP_35N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...A.T....TG......CGT...A..
#RP_30N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...A.T....TG......CGT...A..
#RP_10N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_139    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG..A....CG....A..
#RP_6N     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_8N     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG.T....TG....AA..
#RP_12N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_34     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...A.T....TG......CGT...A..
#RP_35     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G....T...AA.T....TG......TGT...A..
#RP_137    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG.T....CG....A..
#RP_40     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_143    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_38     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T...T...T...TG......CG....A..
#RP_36     .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T...T...T...TG......CG....A..
#RP_19N    .....-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..
#RP_41     ..C.G,-... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .T....T...TG......CG....A..

#RA_5      ATCAACTTGT TTTTT--CAC AATATAGACT TTGTAATACT CT-TTAAGTG
#RA_4-51   ..T....C.. .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_12-5   ..T....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_12-6   ..T....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_6      .....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G..CA.....
#RA_12-2   .T.....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-T...
#RA_33     .T.....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_50     .T.....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_8      .T.....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-G...
#RA_40     .....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_42     .....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-G...
#RA_48     ....G.... .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-.....
#RA_38     ..T....   .....,..... .....,..... .....,..... .....,..... .G...-G...

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#RA_30	..T.....--..G.	..-.....
#RA_7	..T.....--..G.	..-.....
#RA_34	..T.....--..G.	..-.....
#RA_44	-----	-----G.G.
#RA_46	..T.....--..G.G.	..-.....
#RA_25	..T..G...--..G.G.	..-.....
#RA_13	..T.....--.TG.	..-.....
#RA_24	..T.....--..G.	..-.....
#RP_42	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_45	..T.....--.GGT.G.	..-.....
#RP_1	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_51	..T.....--.GGG.	..-.....
#RP_37	..T.....--.GGG.	..-.....
#RP_46	..T.....--.GAG.	..-.....
#RP_39	T.T.....--.GGA.G.	..-.....
#RP_43	..T.....--.GGA.G.	..-.....
#RP_31N	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_32N	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_35N	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_30N	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_10N	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_139	..T.....	...T-.GGG.	..-.....
#RP_6N	..T.....	...T-.GGG.G.	..-.....
#RP_8N	..T.....--.GGA.G.	..-.....
#RP_12N	..T.....	...T-.GGG.	..-G.....
#RP_34	..T.....	...TTGGG.	..-.....
#RP_35	..T.....	...TT-GGG.	..-.....
#RP_137	..T.....--.GA.G.	..-.....
#RP_40	..T.....	...T--GAG.	..-.....
#RP_143	..T.....	...T--GGG.	..-.....
#RP_38	..T.....	...TT-GGG.	..-.....
#RP_36AT.--.GGG.	..-.....
#RP_19N	..T.....--.GGG.	..-.....
#RP_41	..T.....--.GGG.	..-.....
#RA_5	TTTGAAATGA	ACAATTTTTA	A--CAATCTC	CACCCAATTA	CCT-AAAAAT
#RA_4-51C.	..-A.....G..A.	...C.....
#RA_12-5C.	..-.....C.....
#RA_12-6C.	..-.....C.....
#RA_6C.A....	TAT..T...C.....
#RA_12-2C.A..C.	..-.....C.....
#RA_33C.	..-.....T.	...C.....
#RA_50C.	..-.....CT.....
#RA_8	A..A.....C..C.	..-.....C.....
#RA_40C.	..-T.....T.....	...C.....
#RA_42C.	..-.....C.....
#RA_48C.	..-.....C.....
#RA_38C.	..-.....C.....
#RA_30A.	..-.....C.....
#RA_7C.	..-.....C...A
#RA_34C.	..-.....C...A
#RA_44	..A.....	..C.A..C.	..-.....C.TT...
#RA_46C.A..C.	..-.....TC.TT...
#RA_25C.A..C.	..-.....TC.TT...
#RA_13C.A..C.	..-A.....C.....
#RA_24C.	..-.....A.....
#RP_42T.	..C.A..C.	..-.....CGTTCT.
#RP_45T.	..C.A..G.	..-.....CGTT.T.
#RP_1T.	..C.A..C.	..-.....C.TT.T.
#RP_51C.A..C.	..-.....TA.	...C.TT.T.
#RP_37C.A..C.	..-.....C.TT.T.

```

#RP_46      . . . . . A . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C . T T . T .
#RP_39      . . . . . A . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C . T T . T .
#RP_43      . . . . . . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C . T T . T .
#RP_31N     . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T G T T . T .
#RP_32N     . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T G T T . T .
#RP_35N     . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T . . C G T T . T .
#RP_30N     . . C . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T . . C G T T . T .
#RP_10N     . . . . . T . T . T C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C G T T . T .
#RP_139     . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C G T T . T .
#RP_6N      . . . . . A . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C G T T . T .
#RP_8N      . . . . . A . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C . T T . T .
#RP_12N     . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C . . C G T T . T .
#RP_34      . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T . . C G T T . T .
#RP_35      . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C G T T . T .
#RP_137     . . . . . A . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C . T T . T .
#RP_40      . . . . . . . C . A C . C . . -- . . . . .      . . . . . C . T T . T .
#RP_143     . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T . . C G T T . T .
#RP_38      . . . . . T . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C G T T . T .
#RP_36      . . . . . T . T C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . C G T T . T .
#RP_19N     . . T . . . . C . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T . . . . A . . C . T T . T .
#RP_41      . . . . . . . C . A . . C . . -- . . . . .      . . . . . T . T . . . . . C . T T . T .

#RA_5      TGATGT-TTT CTCCAAAATT GATCTAAGAT ATACT-AGAT ATTTCACTAT
#RA_4-51   . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_12-5   . . . . . G . . . . .      . . . . . T . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_12-6   . . . . . G . . . . .      . . . . . T . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_6      . . . . . C . - . . . .      . . . . . A . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_12-2   . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . T . . . . .
#RA_33     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_50     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . . A . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_8      . . . . . - . . . . .      . . . . . T . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . T .
#RA_40     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_42     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_48     . . . . . - . . . . .      . . . . . T . . . . .      . . . . . A . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_38     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . .
#RA_30     . . . . . - . . . . .      . . . . . T A . . . . .      . . . . . A . . . . .      . . . . .      . . . . . A . . . . .
#RA_7      . . . . . - A . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . A . . . . .
#RA_34     . . . . . - A . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . A . . . . .
#RA_44     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_46     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . A . . . . .
#RA_25     . . . . . C . - . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .
#RA_13     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . T . - . . . .
#RA_24     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . T . . . . . C .
#RP_42     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . T - C .
#RP_45     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_1      . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_51     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . T . . . . . - C .
#RP_37     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_46     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . A . . . . . - C .
#RP_39     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_43     . . . . . - A . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_31N    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_32N    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_35N    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_30N    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . A G . . . . . - C .
#RP_10N    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_139    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_6N     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . G . . . . - C .
#RP_8N     . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_12N    . . . . . - . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .
#RP_34     . . . . . A . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . .      . . . . . G . . . . . - C .

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#RP_35-A.....-C..T...
#RP_137-G.....-C..
#RP_40-G.....-C..
#RP_143-	...T.....	..G.G.....-C..
#RP_38-G.....-C..
#RP_36-G.....-C.A
#RP_19N-G...T..-C..
#RP_41-G.....-C..
#RA_5	ATGGACTCTC	AAATATTCAA	AAAAGTTTTG	AATTTATTAA	ATTCTCGTAA
#RA_4-51A....A.....CC..
#RA_12-5A....A....TCC..
#RA_12-6A....A....CC..
#RA_6A....A-....	..G.....CC..
#RA_12-2A....A....A....AC..
#RA_33A....G.A....CC..
#RA_50A....G.A....CC..
#RA_8A....A....CC..
#RA_40A....A....ICC..
#RA_42A.A..A....CC..
#RA_48A....AA....CC..
#RA_38A....A....CA..
#RA_30A....TA....CC..
#RA_7GA....A....C..
#RA_34AA.A..G.A....CC..
#RA_44A....A....G....CC..
#RA_46T..A....A....CC..
#RA_25A....A....CC..
#RA_13A....A...ACA..
#RA_24A.A..	...G..A....CC..
#RP_42TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_45TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_1TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_51TA....	...A--....TC.CC..
#RP_37TA....	T...AA-....TC.TC..
#RP_46TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_39	..T.....TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_43TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_31NTA....	T...AA-A..T	...AA.CC..
#RP_32NTA....	T...AA-A..T	...AA.CC..
#RP_35NTA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_30NTA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_10NTA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_139TA....	T...AA-A..TC.CC..
#RP_6NTA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_8NTA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_12NTA....	T...AA-....TC.CC--
#RP_34TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_35TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_137TA....	T...AA-...T	T..C..C..TC.CC..
#RP_40TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_143	..T.....TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_38TA....	T...AA-....TC.CC.C
#RP_36TA....	T...AA-....TC.CC..
#RP_19NTA...-	...AA-....T..TC.CC..
#RP_41A.A..TA...T	...AA-....TC.CC..
#RA_5	ATTAAGCCCA	ATTTTGTAT	GTA-ACAAT-	GTTTTAT-CC	ATGATAGAGT
#RA_4-51C.-T...--	T.....
#RA_12-5G...	..C.-.....-	..G.....-
#RA_12-6G...	..C.-.....--

#RA_6	TC.-.....-.....C.....			
#RA_12-2	TC.-.....-.....T.			
#RA_33C.-.....-.....			
#RA_50C.-.....-.....			
#RA_8C.-.....-.....			
#RA_40C.-.....-T.C.....			
#RA_42C.-.....-.....			
#RA_48C.-.....-.....			
#RA_38C.-.....-.....			
#RA_30	T.....A.....	TC.-.....-.....			
#RA_7A.....	TC.-.....-.....			
#RA_34	TC.-.....-.....			
#RA_44G.....	TC.-.....-.....G			
#RA_46G.....	TC.-.....-.....			
#RA_25G.....	TC.-.....-.....			
#RA_13G.....	TC.-G.....-.....G.....C.....			
#RA_24	TC.-.....-.....			
#RP_42C.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_45C.A.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_1C.....	TC.-.....-.....G.....			
#RP_51A.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_37T.....C.....	TC.-.....C-.....			
#RP_46C.....	TC.-.....C-.....G.T.....			
#RP_39	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_43C.....	.C.-.....C-A.....G.....			
#RP_31NC.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_32NC.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_35NC.....C.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_30NT.....C.....	TC.-.....C-.....-T.G.....			
#RP_10NC.....	TC.-.....-.....G.....			
#RP_139C.....	TC.-.....C-.....G.....T.....			
#RP_6NC.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_8NA.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_12N	-----.....C.....	TC.-.....C-A.....G.....			
#RP_34C.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_35C.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_137	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_40C.....	TC.-.....C-.....G.T.....			
#RP_143A.....	TC.-.....-.....G.....			
#RP_38C.....	TC.-.T.C-.....G.....			
#RP_36	GG.....A.....	TC.-.....-.....G.....			
#RP_19NA.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RP_41C.....	TC.-.....C-.....G.....			
#RA_5	CGCAATTTAA	TTGTTCTTTC	A-CTATATCA	ACTCTCGAGT	TTTCATAAGT
#RA_4-51C.....-G.....T.
#RA_12-5-C.....G.....
#RA_12-6C.....G.....
#RA_6	..A.....C.....A.....A.....
#RA_12-2	..A.....C.....A.....A.....
#RA_33
#RA_50
#RA_8A.....A.....
#RA_40C.....A.....
#RA_42C.....A.....
#RA_48	..A.....C.....AA.....G.....
#RA_38	..A.C.....C.....
#RA_30	..A.....C.....A.....T.....
#RA_7	..A.....C.....A.....A.....
#RA_34	T.A.....C.....A.....
#RA_44	A.A.....C.....G.....A.....

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#RA_46	..AC.....C	-.....T..A.
#RA_25	..AA.....C	-.....A.
#RA_13	..A.....C	-.....A.
#RA_24	G..A.....C	-.....
#RP_42	..A.....C	-.....A.
#RP_45	..A.....C	-.....A.
#RP_1	..A.....C	-.....A.G
#RP_51	..A.....C	-.....A.
#RP_37	..A.....C	-.....A.
#RP_46	..A.....C	-.....TG
#RP_39	..A.....C	-.....T..T.
#RP_43	..A.....C	-...C.....A.
#RP_31N	..A.....C	-.....A..A.
#RP_32N	..A.....C	-.....A..A.
#RP_35N	..A.....C	-.....A..A.
#RP_30N	..A.....C	-.....A.
#RP_10N	..A.....C	-.....A.
#RP_139	..A.....C	-.....A.
#RP_6N	..A.....C	-..A.....A.
#RP_8N	..A.....C	..C.....	-.....T.
#RP_12N	..A.....C	-.....A.
#RP_34	..A.....C	-.....A..A.
#RP_35	..A.....C	-.....A..A.
#RP_137	..AA.....C	C.....	-.....A.
#RP_40	..A.....C	-.....TG
#RP_143	..A.....C	-.....A.
#RP_38	..A.....C	-.....A.
#RP_36	..A.....C	-.....A.
#RP_19N	..A....C.C	-.....A.
#RP_41	..A.....C	-.....A.
#RA_5	GTTTGAAATG	AACTTATTCT	ACCAA-TATA	GTCTCCATTA	CCTCGTTCTT
#RA_4-51TT,-...GA...A.
#RA_12-5	...A.....-A.
#RA_12-6	...A.....-A.
#RA_6-A.
#RA_12-2TA.-.....A..A.
#RA_33-A.
#RA_50-A.
#RA_8-A.
#RA_40-	...A.....A.
#RA_42AT.-.....	A..A.....	..T...A.
#RA_48-A.
#RA_38-A.
#RA_30-A.
#RA_7-	..T.....	...A..A.
#RA_34-A.
#RA_44C.....-A.....	..G..A..A.
#RA_46C.....-ACA..A.
#RA_25C.....-C.....	...A..A.
#RA_13-A..A.
#RA_24-A.
#RP_42	..GCA.....-A..A.
#RP_45	..CA.....	T.....-A..A.
#RP_1	..CA.....T.....-A..A.
#RP_51	..CA.....-A..A.
#RP_37	..CA.....-A..A.
#RP_46	..CA.....---A..A.
#RP_39	..CA.....-A..A.
#RP_43	..CA.....-A..A.
#RP_31N	..CA.....-A..A.

```

#RP_32N  ...CA..... -..... A...A.
#RP_35N  ...CA..... -..... A...A.
#RP_30N  ...CA..... -..... T... A...A.
#RP_10N  ...CA..... -..... A...A.
#RP_139  ...CA..... A..... -..... A...A.
#RP_6N   ...CA..... -..... A...A.
#RP_8N   ...CA..... -..... A...A.
#RP_12N  ...CA..... T..... -..... A...A.
#RP_34   ...CA..... -G..... A...A.
#RP_35   ...CA..... -..... A...A.
#RP_137  ...CA..... -..... A...A.
#RP_40   ...CA..... -..... A...A.
#RP_143  ...CA..... -..... A...A.
#RP_38   ...CA..... -..... A...A.
#RP_36   ...CA...A..... A..... -..... A...A.
#RP_19N  ...CA..... -..... A...A.
#RP_41   ...CA..... -..... A...A.

#RA_5    TGGTGTTTT- CACGAAGATC AAGCTAATGT TTAC-TTGTT CTCTCACTAT
#RA_4-51 .AT.....- ..... G...G... -.....
#RA_12-5 .T.....- ..T..... -.....
#RA_12-6 .T.....- ..T..T..A. -.....
#RA_6    .T.....- ..T..... -.....
#RA_12-2 .T.....- ..... -.....
#RA_33   .T.....- ..... -.....
#RA_50   .T.....- ..... -.....
#RA_8    .T.....- ..... -.....
#RA_40   .T.T.....- ..... G..T... A.....
#RA_42   .T.....- .G..... -.....
#RA_48   .T.....- ..... -.....
#RA_38   .T.....- ..... A..... -.....
#RA_30   .T.....- ..... -.....
#RA_7    .T.....- ..... -.....
#RA_34   -.T..C...- ..... -..... C.....
#RA_44   .T.....- ..A..... -..... A.....
#RA_46   .T.....- ..A.....G..C..... -...T... A.....
#RA_25   .AT.....- ..G..... -..... C.....
#RA_13   .T.....- .....A..... -.....
#RA_24   .T.T.....- ..... T... -...-.....
#RP_42   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_45   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_1    .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_51   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_37   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_46   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_39   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_43   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_31N  .T.....- ..A..... A... -...-..... A.....
#RP_32N  .T.....- ..A..... A... -...-..... A.....
#RP_35N  .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_30N  .TT.....T A..... A... -...-..... A.....
#RP_10N  .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_139  .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_6N   .T.....- ..T..... A... -...-..... A...T...
#RP_8N   .T.....- ..... -...A... -...-..... A.....
#RP_12N  .T.T.....- ..... A... -...-..... A.A.....
#RP_34   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_35   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_137  .T.....T..... A... -...-C... A.....
#RP_40   .T.....- ..... A... -...-..... A.....
#RP_143  .T.....- ..T...TA. A... -...-..... A.....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```
#RP_38 ..T.....- ..T..... ..A. .-.-..... A.....
#RP_36 ..T.....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RP_19N ..T.....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RP_41 ..T.....- ..T..... ..A. .-.-..... A.....
```

```
#RA_5 ATC-GACTTA T-CAATAGTC TTATGTAGTG AAAATGAACC CATTCT-AAC
#RA_4-51 .....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_12-5 .....- ..... ..G.....-.....
#RA_12-6 .....- ..... ..G.....-.....
#RA_6 .....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_12-2 .....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_33 .....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_50 ..T.....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_8 .....- ..... ..A.....-..C.
#RA_40 .....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_42 .....- ..... ..A. .-.-..... A.....
#RA_48 .....- ..... ..T.....-.....
#RA_38 .....- ..... ..T.....-.....
#RA_30 .....- ..... ..C.....-..T.
#RA_7 .....- ..... ..T.....-.....
#RA_34 .....- ..... ..A.....-.....
#RA_44 .....- ..... ..C.....-.....
#RA_46 .....- ..... ..C.....-.....
#RA_25 .....- ..... ..C.A.....-.....
#RA_13 .....- ..... ..A.....-.....
#RA_24 .....- ..... ..G.....-.....
#RP_42 .....-A.....- ..... ..A.....-.....-..T
#RP_45 .....- ..... ..C.....-..C.....-.....
#RP_1 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_51 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_37 ..T.....- ..... ..C.....-.....-.....
#RP_46 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_39 .....-A.....- ..... ..C.....-.....
#RP_43 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_31N .....- ..... ..C.....-..C.....-..A.....-..A
#RP_32N .....- ..... ..C.....-..C.....-..A.....-..A
#RP_35N .....- ..... ..C.....-.....
#RP_30N .....-T.....- ..... ..C.....-..A.....-.....
#RP_10N .....- ..... ..C.....-.....
#RP_139 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_6N .....- ..... ..C.....-.....
#RP_8N .....-A.....- ..... ..C.....-.....
#RP_12N ..G-..A.C. ....- ..... ..C.....-.....
#RP_34 .....-A.....- ..... ..C.....-.....
#RP_35 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_137 .....- ..... ..C.....-..A.....-.....
#RP_40 .....-A.....- ..... ..C.....-.....-..G.
#RP_143 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_38 .....- ..... ..C.....-.....
#RP_36 .....- ..... ..A.....-.....
#RP_19N .....- ..... ..C.....-.....
#RP_41 .....- ..... ..C.....-.....
```

```
#RA_5 -AA
#RA_4-51 -..
#RA_12-5 -..
#RA_12-6 -..
#RA_6 -..
#RA_12-2 -..
#RA_33 -..
#RA_50 -..
```

#RA_8 -..
#RA_40 -..
#RA_42 -..
#RA_48 -..
#RA_38 -..
#RA_30 -..
#RA_7 -..
#RA_34 -..
#RA_44 -..
#RA_46 -..
#RA_25 -..
#RA_13 -..
#RA_24 -..
#RP_42 -..
#RP_45 -..
#RP_1 -..
#RP_51 -..
#RP_37 -..
#RP_46 -..
#RP_39 -..
#RP_43 -..
#RP_31N -..
#RP_32N -..
#RP_35N -..
#RP_30N -..
#RP_10N -..
#RP_139 -..
#RP_6N -..
#RP_8N -..
#RP_12N -..
#RP_34 -..
#RP_35 -..
#RP_137 -..
#RP_40 -..
#RP_143 -..
#RP_38 -..
#RP_36 -..
#RP_19N -..
#RP_41 -..

APÉNDICE 7.-

```

#INT31 GAAGCGTTAG TTCCTAACTA GTATCAATTG AACCATTTAT ATTT-GTTTC GCACCATATT AATGCATTGA AAACCTTGAT- TTCCACTATA --
#INT46 .....TTGACTCT.....
#INT37 .....C.....
#INT39 .....T.....T.....
#INT42 .....T.....A.....T.....
#INT41 .....T.....T.....
#INT47 .....T.....T.....C.....
#INT35 .....T.....T.....
#INT44 .....C.....T.....
#INT45 .....A.....A.....G.....G.....A.....C.....G.....T.....A.....
#PAP124 A.....A.....G.....C.....A.....G.....T.....
#PAP2 T.....A.....T.....T.....T.....GCC.....C.....T.....G.....A.....T.....C.....
#PAP9 T.....A.....T.....T.....T.....GCC.....C.....T.....G.....A.....T.....C.....
#PAP40 T.....A.....T.....T.....T.....C.....GCCA.....C.....C.....A.....T.....C.....
#PAP21 T.....A.....T.....T.....T.....GCCA.....C.....C.....A.....T.....C.....
#PAP7 T.....A.....T.....T.....T.....C.....GCC.....C.....C.....A.....T.....C.....
#PAP13 T.....A.....T.....T.....T.....C.....GCCA.....C.....A.....T.....C.....
#PAP12 T.....A.....T.....TT.....T.....CC.....K.....C.....A.....C.....T.....A.....T.....C.....C.....
#INT2 .....T.....T.....
#INT6 .....T.....T.....C.....
#INT14 .....T.....T.....
#INT3 .....T.....
#PAP104 A.....A.....G.....H.....C.....A.....G.....T.....
#PAP11 C.....A.....T.....GC.....C.....A.....T.....C.....
#INT15 .....A.....-GAT.....
#INT29 .....C.....-GAT.....
#INT146 .....-GAT.....
#INT49 .....-GAT.....
#INT8 .....G.....-GAT.....A.....
#INT38 .....-GAT.....A.....
#INT7 .....-GAT.....A.....
#INT139 .....A.....-GAT.....A.....
#INT36 .....T.....T.....-GAT.....A.....
#INT114 .....A.....-GAT.....
#INT18 .....T.....GT.....T.....C.....A.....-GAT.....
#ACE12 .....A.....G.....G.....C.....A.....T.....G.....-GAT.....
#ACE25 .....A.....G.....C.....G.....C.....A.....T.....G.....-GAT.....
#ACE29 .....A.....G.....G.....C.....A.....T.....G.....-GAT.....
#ACE53 .....A.....G.....G.....A.....C.....A.....T.....C.....-GAT.....
#ACE14 A.....A.....G.....C.....A.....G.....-GAT.....T.....
#ACE20 A.....A.....G.....C.....A.....G.....-GAT.....T.....
#ACE28 A.....A.....G.....C.....A.....G.....-GAT.....T.....
#ACE57 A.....A.....G.....C.....G.....G.....-GAT.....T.....
#ACE19 A.....A.....G.....C.....A.....G.....-GAT.....T.....

```

```

#ACE10 A...A... .G... C...A... -...G... -GAT .T... --
#ACE1 A...A... .G... C...A... -...G... G... -GAT ... --
#ACE62 A...A...C... .G... C...A... -...G... G... -GAT ... --
#ACE27 A...A...C... .G... C...A... -...G... G... -GAT ... --
#ACE16 A...A... .G... T...A... T...T... G... -GAT ... --
#ACE11 A...A... .G... T...A... T... G... -GAT ... --
#ACE45 A...A...T... .G... T...A... -...G... -GAT ... --
#ACE9 A...A... .G... C...A... -...G... G... -GAT ... --
#ACE3 A...A... .G... C...A... G...-... G... TGAT ... --
#ACE17 A...A... .G... C...A... G...-... G... -GAT ... --
#PAP34 T...A...T...T...T... .CCC... CT... -T...T...AG... .T...C... --
#PAP38 T...A...T...T...T... .GCC... C... -TA... .T...C...A... --
#PAP4 TC.A.A...T A...T...T... .GCC... C... -C... A... .T...C... --
#PAP41 TC.A.A...T A...T...T... .GCC... C... -C... A... .T...C... --
#PAP1 CC...A...T A...T...T... .GCC.G... C... -T...T... .T...C... --
#PAP66 CC...A...T A...T...T... .GCC.G... C... -T...T... .G... .T...C... --
#PAP140 CC...A...T A...T...T... .GCC.G... C... -T...T... .A... .T...C... --
#PAP68 CC.T.A...T A...T...T... .GCC.G... C... -T...T... .A... .T...C... --
#PAP39 CC...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .T...C...C... --
#PAP22 T...A...T...T...T... TGCC... C... -C... .A... .T...C...G... --
#PAP35 T...AA...T...T...T... .GCC... C... -C...T... .A... .T...C... --
#PAP135 T...AA...T...T...T... .GCC... C... -C...T... .A... .T...C... --
#PAP112 T...AA...T...T...T... .GCC... C... -C... .A... .T...C... --
#PAP20 T...A...T...T...T... .GCC... C... -C... A... .T...C... --
#PAP122 T...A...T...T...T... .GCC... C... -C...T... .A...A... .T...C... --
#PAP36 T...A...T...T...T... .GCC... C... -T... .A... .T...C... --
#PAP136 T...A...T...T...T... .GCC... C... -T... .A... .T...C... --
#PAP44 T...A...T...T...T... .GCA... C... -C...T... .A... .T...C... --
#PAP23 T...A...T...TT...T... .CC... C...A... -C...T... .AG... .T...C...C... --
#PAP67 T...A...T...T...T... .GCA... C... -C...T... .A... .T...C... --
#PAP121 T...A...T...AT...T... .GCCT... C... -T... .A... .T...C... --
#PAP24 T...A...T...T...T... .GCCT... C... -CA... .A... .T...C... --
#PAP43 T...A...T...T...T... .GCC... C.T... -CA...T... .A... .T...C...C... --
#PAP37 T...A...T...A...T... .GCC... C... -CA...T... .A... .T...C...C... --
#PAP25 T...A...T A...T...T... .GCC... C... -CA...T... .A... .T...C...C... --
#PAP26 T...A...T...T...T... .GCC... C... -C... .T... .A... .T...C...C... --
#ACE42 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .A... .T...C... --
#ACE82 T.A.A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .A... .T...C... --
#ACE7 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... C... .G... .A... .T...C... --
#ACE66 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .G... .A... .T...C... --
#ACE83 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .G... .A... .T...C... --
#ACE111 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .A... .T...C... --
#ACE81 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .A... .T...C... --
#ACE23 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -T...T... .A... .T...C... --
#ACE145 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -C... .A... .T...C... --
#ACE21 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -T... .A...TA...A... .T...C... --
#ACE110 T...A...T...T...T... .GCC... C...G... -T... .A... .T...C...T... --

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#ACE72 T...A...T...T...T...GCC.....C.....G...-T.....A.....T.....C.....C..--
#ACE15 T...A...T...T...T...GCC.....C..A.....-C.....T..A.....T.....C..GT.....--
#ACE24 T...A...T...T...T...GCC.....C.....-C...T.....AC.....T.....C.....--
#ACE26 T...A...T...T...T...GCC.....C.....-C...T.....AC.....T.....C.....--
#ACE76 T...A...T...T...T...GCC.....C.....-C...T.....AC.....T.....C.....--
#ACE114 T...A...T...T...T...GCC.....C..C.....-C.....A.....T.....C.....--
#ACE211 T...A...T...T...T...GCC.....C..TC.....-C.....A.....T.....C.....--
#ACE85 T...A...T...T...T...GCC.....C.....G.....-C.....A...A...A..T.....C.....--
#ACE78 T...A...T...T...T...GCC...A..C.....-T.....A.....T.....C.....--
#ACE2 T...T...T...T...T...GCC.....C.....-T.....A.....T.....C.....--
#ACE112 T...A...T...T...T...GCC.....-C...T.....AC.....T.....C.....--
#ACE13 T..T.A...T...T...T...GCC.C...C.....-CC...C..A.....A.....T..C...C.....--

#INT31 CAATATTAAG TAAGAATATA AATGAACTAA TTGTGCTC-- AACT-AGTAC AATTTCTCA TCCATCGACA TTGCACAATA CACAAAGGTA
#INT46 .....-.....C.
#INT37 .....G.....C.
#INT39 .....G.A.....C.
#INT42 .....G.A.....C.
#INT41 .....G.....C.
#INT47 .....G.....C.
#INT35 .....AG.....C.
#INT44 .....G.....T.....C.
#INT45 .....G.....C.
#PAP124 .....-A...-C...-G.T.....T.....T.....C.
#PAP2 .....A..C...-CG.G...A.....T.....G.....T.TC...C.
#PAP9 .....A..C...-CG.G...A.....T.....G.....T.TC...C.
#PAP40 .....A..C...-CA.....T.....G...G...A..T.TC....
#PAP21 .....A..C...-CG...T.....T.....T.TC...C.
#PAP7 .....-CT. A.TATGC.-C...-CA.....T.....G.....T.TC....
#PAP13 .....-CT. A.TATGC.-C...-CA.....T.....G...G...A..T.TC....
#PAP12 .....-CT. A.TACGC.-C...-CG...T...A..G.....T.TC...C.
#INT2 .....-CT. A.TGTGCT-C...-G.....C.
#INT6 .....-CT. A.TGTGCT-C...-G.A.....C.....C.....C.
#INT14 .....H.GCT. A.TGTGCT-C...-G.....C.
#INT3 .....C.....-CT. A.TGTGCT-C.....C.
#PAP104 .....-CT. A.TGTGCTTC...-G.T.....T.....T.....C.
#PAP11 .....A...A...T.....-GT. A.TGTGC.-C...-G...T.....T.....C...G.T.....C.
#INT15 A...G.....-G.....T.....AC.....A.C.
#INT29 A...G.....-G.....T.....AC.....C.
#INT146 A...G.....-G.....T.....AC.....C.
#INT49 A...G.....-G.....T.....AC.....C.
#INT8 .....G.....-G.....T.....AC.....C.
#INT38 .....G.....-G.....T.....AC.....C.
#INT7 .....G.....-G.....T.....AC.....C.
#INT139 A...A.....-G...-G.....G.....C.
#INT36 A...A.....-G...-G...C.....A.....C.
#INT114 .....G.....-G.....C.
#INT18 .....G.....-G.....C.

```



```

#ACE12 .....G.....C.....--.....G.T.....G.....T...T.....C.
..G.....
#ACE25 .....G.....--.....G.T.....T...T.....C.
..G.....
#ACE29 .....G......T.....G.T.....T...T...T.....C.
..G.....
#ACE53 .....G.....--.....G.T.....T...T.....C.
..T.....
#ACE14 .....G.....--.....G.T.....T...T.....C.
..G.....
#ACE20 .....G.....--.....G.T.....T...T.....C.
..G.....
#ACE28 .....G......A.--.....G.T.....A.....T...T.....C.
..G.....
#ACE57 .....G.....--.....G.T.....T...T.....C.
..G.....
#ACE19 .....G.....--.....G.T.....T...T.....C.
..G.....
#ACE10 .....G......TCA..T.--G.T.....T...T.....C.
..G.....
#ACE1 .....G.....--.....G.T.....T...T.C.
..G.....
#ACE62 .....G......T.....G.T.....T.T.G.T.C.
..G.....
#ACE27 .....G......T.....G.T.....T...G.T.C.
..G.....
#ACE16 .....G.....--.....G.T.....T.T...T...T...G...C.
..G.....
#ACE11 .....G.....--.....G.T.....T...T...T...G...C.
..G.....
#ACE45 .....G.....--.....G.T.....T...T...T...G...C.
..G.....
#ACE9 .....G......T.....G.T.....T...T...T...G...C.
..G.....
#ACE3 .....G......T.....G.T.....T...T...T...G...C.
..G.....
#ACE17 .....G.....--.....G.T.....A.....T.T.G.T.C.
..G.....
#PAP34 ..A.G......A.T.C.--G.-TGG.....T...A.G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP38 .....G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP4 .....G......A..C.--CG.....A..T.....A.A...T.TC...C.
..G.....
#PAP41 .....G......A..C.--A.-CG.....T.....T...T.TCT...C.
..G.....
#PAP1 ..C.A.G......A.T.C.--CG.....T.....T...T.TC...TC.
..G.....
#PAP66 ..A.G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP140 ..A.G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP68 ..A.G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP39 .....G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.C.....
#PAP22 .....G......A..C.--CG.....T.G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP35 .....G......A..C.--CA.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP135 .....G......A..C.--CA.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP112 .....G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP20 .....G......CA...A..C.--CG.A.....T...A.....T.TC...C.
..G.....
#PAP122 .....G......C.....A..C.--CGT.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP36 .....G......A..C.--CG.....T.....G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP136 .....G......A..C.--CG.....T.....G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP44 .....G......A..C.--CG.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP23 .....G......A.T.C.--CG.....T...A.G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP67 .....G......A..C.--CG.T.....T.....T...T.TC...C.
..G.....
#PAP121 .....G......A..C.--CA.....T.....G.....G.....T.TC...
..G.....T
#PAP24 .....G......A..C.--A.-CG.....T.....G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP43 .....G......A..C.--CG.....-..C..T.G..A..G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP37 .....G......A..C.--CG.....-..C..T...A..G.....T.TC...C.
..G.....
#PAP25 .....G......A..C.--CG.....-..C..T...A..G.....T.TC...I.C.
..G.....
#PAP26 .....G......A..C.--CG.....----- ----- -.....T.TC...C.
..G.....
#ACE42 .....GA......A..C.--CG.....T.T..T...G.....T.TC...C.
..C.....
#ACE82 .....GA...C......A..C.--TG.....T.T..T...G.....T.TC...C.
..C.....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#ACE7      ....GA... ..C... ..A...C-- G...-CG.. .....T.T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE66     ....GA... ..A...C-- .....CG.. ...A...T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE83     ....GA... ..A...C-- .....CG.. ...A...T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE111    ....GA... ..A...C-- .....CG.. ...A...T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE81     ....GA... ..A...C-- .....CG.. .....T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE23     ....GA... ..A...C-- .....CG.. .....T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE145    ....GA... ..A...C-- .....CG.. ...A...T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE21     ....GA... ..C......A...C-- .....CG.. .....T. .T.....G ..... T.TC...A.
#ACE110    ....GA... ..A...C-- .....CG.. .....T. .T.....G ..... T.TC...C.
#ACE72     ....G......A...C-- .....CG.. .....T.....TG ..... T.TC...C.
#ACE15     ....G.T.....G ..A...CA-- C...-CG.. .....TT... .T...AT... .. T.TC...C.
#ACE24     ....G......A...C-- .....CA.. ...A... .T..... .. T.TC...C.
#ACE26     ....G......A...C-- .....T.CAC. .... .T...C... .. T.TC...C.
#ACE76     ....G......GG......A..T-- .....CG.. .....T..... .. T.TC...C.
#ACE114    ....G......A.C.C-- .....CG.. .....T..... ..G. T.TC...C.
#ACE211    ....G......A...C-- .....CG.. .....T..... ..C.....G. T.TC...C.
#ACE85     ....G......T......A...C-- .....CG.. .....A... .T..... ..C.....G. T.TC...C.
#ACE78     ....G......C......C......A...C-- .....CG.. .....T..... .. T.TC...C.
#ACE2     ....G......C......C......A...C-- .....CG.. .....T..... .. T.TC...C.
#ACE112    ....G...T G......GG......C.A..C-- .....CG.. .....T..... ..G...-TC..A.C.
#ACE13     ....G......C......C......A...C-- .....CG.. .....T..... .. T.TC...C.

#INT31    GATCATCC-A CCTAATACAC TCTCGAATAT GCCAAAAAC TATAATCGA- AATAATTGG CCCAACAAGG CTCATTTC TCATTTCATTG
#INT46
#INT37
#INT39
#INT42
#INT41
#INT47
#INT35
#INT44
#INT45
#PAP124   .G......G......G...A .....G.....- .C.....T... ..G...T.....A
#PAP2     .....G......G ..G......C.....- .C.....T...T.TT G.....G...
#PAP9     .....G......G ..G......C.....- .C.....T...T.TT G.....G...
#PAP40    .....G... ..A.....G .....C.....- .GC.....T...T.TT G.....G...
#PAP21    .....G... ..T.....G T......C.....- .....TT.TT G.G...G...
#PAP7     .....G... ..A...C.G .....C.....- .C.....T...T.TT G.....G...
#PAP13    .....G... ..A.....G .....C.....- .C.....T...T.TT G.....G...
#PAP12    .....-C .....G......G ..G......C.....- .CT......A...T.TT G.....G...
#INT2     .....- .....G.S ..G......C.....- .C.....G.....T..A
#INT6     .....- .....G......G .....C.....- .C.....G.....T...
#INT14    .....- .....G......G .....C.....- .C.....G.....T...
#INT3     .....- .....G......G .....C.....- .....T...
#PAP104   .G......G......G...A .....G.....- .C.....T... ..G...T.....A
#PAP11    .....- .....G... A......G .T......G.....- .C.....T...T... ..GM...S.. YT...C..
#INT15    .....- A......G......G... A......G...AACA ..A......T...T... T......A.....
#INT29    .....- .....G......G... A......G...AA.A ..A......A...T... T......A.....

```

```

#INT146 .....G...G...A.....G...AA.A..A....C..T..T...T.....
#INT49 .....G...G...A.....G...AA.T..A.....T..T...T.....
#INT8 .....G...G...A.....G...A.A..A.....T..T...T.....
#INT38 .....G...G...A.....G...AA.A..A.....T..T...T.....A.....
#INT7 .....G...G...A.....G...AA.A..A..A...T..T...T.....T.....
#INT139 .....G...G...A.....G...A.-..A....C..T.....
#INT36 .....G...G...G...A.....G...AA.-..A....T..T..T.....-.....
#INT114 .....G...G...G.....G.....-..C.....T.....
#INT18 .....G...G.....-..C.....T.....
#ACE12 .....G...G...G.....G.....-..C.....T.....
#ACE25 .....G...G...G.....G.....-..C.....T.....
#ACE29 .....G...G...G.....G.....-..C.....T.....T.....A
#ACE53 .....G...A.A.G...G.....G.....T-..C.....T.....C.....
#ACE14 ..G.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE20 ..G.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE28 ..G.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE57 T.G.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE19 ..G.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE10 ..G...C.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE1 .....T.-...T..G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE62 .....T..G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....G.A
#ACE27 .....T..T...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#ACE16 .....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....
#ACE11 .....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....
#ACE45 .....G...G...A.....G.....-..C.....T.....G..CT.....
#ACE9 .....-T.....G...G...A.....G.....-..C.....T.....T.....
#ACE3 .....G...G...A.....G.....-..C.....T.....-G..T.....
#ACE17 .....C.A...G...A.....G.....-..C.....T.....G..T.....A
#PAP34 .....G...G...G...G.....C...A.-..G.....T.TT G.A...G...
#PAP38 .....G...A...G...G.....C...TA.-..C.....T.TT G.A...G...
#PAP4 ..A.....G...G.....C...A.-..C.....T.TT G.A.C..G...
#PAP41 .....G...G...G...G.....C...A.-..C.....T.TT G.A...G...
#PAP1 A.....G-...G...G...G...T.....C.....-..C.....T.TT G...G...T
#PAP66 A.....G...G...G...T.....C.....-..C.....T.TT G...G...
#PAP140 .....G...G...T.....C.....-..C.....T.TT G...G...
#PAP68 .....G...C...G...T.....C...A.-..C.....T.TT G.A...G...A...
#PAP39 .....A...G...A...G...G.....C...A.-..C.....T...T.TT G.A...G...
#PAP22 .....C.-...G...G...G...G.....C...A.-..C.....T.TT G.A...G...
#PAP35 .....G...G...G...G...G.....C...A.-..C.....T.TT G.A...G...T
#PAP135 .....G...G...G...G...G.....C...A.-..C.....T.TT G.A...G...T
#PAP112 .....G...G...A...G.....C...C.A.-..C.....TT...T.TT G.A...G...
#PAP20 .....G...G...G...G.....C...A.-..C...A...T.TT G.A...G...
#PAP122 .....A...G.T...T...G...AG...TC...A.-..C.....T.TT G.A...G...
#PAP36 .....G...G...G...G...G.....C...AA.-..C.....T.A...T.TT G...G...
#PAP136 .....G...G...G...G...G.....C...AA.-..C.....T.A...T.TT G...G...
#PAP44 .....G...G...G...G...G.....C...A.-..C.....T...T.TT G...G...
#PAP23 .....-C...G...C...G...G...G.....C...A.-..C.....T...T.TT GA...G...

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#PAP67 ....G...- .....G.. .....G ..G..... .C...A.- ..C..... T....T.TT GA....G.. .....
...A.....
#PAP121 .....- .....G.. .....G ..G..... .C...A.- ..C..... T....T.TT G....G.. .....
...A.....
#PAP24 ....G...- .....G.. .....G ..G..... .C...AA.- ..C..... T....T.TT G....G.. .....
...A.....
#PAP43 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .A...T.TT G....CG.. .....
.....
#PAP37 .....- .....G.. .....G .....C.....- ..C..... .A...T.TT G....CG.. .....
.....
#PAP25 .....- .....G.. .....G ..G..... .C...A.- ..C..... .A...T.TT G....CG.. .....
.....
#PAP26 .....- .....G.. .A...G ..G..... .C.....- ..C..... .AT...T.TT G....G.. .....
.A.....
#ACE42 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .G...T.TT G....G.. .....
.....G..
#ACE82 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .G...T.TT G....G.. .....
.....
#ACE7 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .G...T.TT G....G.. .....
.....
#ACE66 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- T.C..... .T.CT G....G.. .....
.....
#ACE83 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- T.C..... .T.CT G....G.. .....
.....
#ACE111 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- T.C..... .T.TT G....G.A .....
.....
#ACE81 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE23 .....- .....G.. .....G ..G..G.. .C.....- ..C..... .G...T.TT G....G.. .....
.....
#ACE145 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- T.C..... .T.TT G....G.A .....
.....
#ACE21 A.....- .....G.. .....G ..TG... .C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE110 A.....-C .....G.. .....G ..G... .C.....- ..C..... A .....T.TT G....G.. .....
.....
#ACE72 .....- .A...G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .T...
...G.....
#ACE15 .....- .....G.. .....G .....C...A.- ..C..... .TT.TT G....G.. .....
.....
#ACE24 .....- .....G.. .....G.G .....C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
..C...T.
#ACE26 .....- .....G.. .....G .....C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE76 .....- .....G.. .....G ..G..... .C...TA.- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.T.....
#ACE114 .....- .....G.. .G.....G ..G...- ..C.....- ..C..... .T.TT GC...G.. .....
.....
#ACE211 .....- .....G.. .G.....G ..G...- ..C.....- ..C..... .T.TT GC...G.. .....
.....
#ACE85 .....- .T...G.. .....G ..G...- ..C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE78 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE2 .....- .....A...G ..T.G..... .C.....- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE112 .....- .....G.. .T..... .C...A.- ..C..... .T.TT G....G.. .....
.....
#ACE13 .....- .....G.. .....G ..G..... .C.....- ..C..... .T.CT G....G.. .....
.....

#INT31 CT-ATATCGC GACATAATGT ACTAGAGATT GTAGTATATA TA--GTATCT AATGGGTAAA AA-AAATATA AATGAAGCAG TTGGCCCAA
CTAGGCCCAA
#INT46 .....- .....G.....- .....A.....- .....C.....
.....
#INT37 ..-..... .G.....- .....-.....-.....
.....
#INT39 ..-..... .G.....- .....A.....- .....C.....
.....G
#INT42 T.-..... .G.....- .....A.....- .....C.....
.....G
#INT41 ..-..... .HK... .G.....- .....A.....- .....C.....
.....
#INT47 ..-..... .G.....- .....A.....- .....C.....
T.....
#INT35 ..-..... .GC... ..-..... .A.....- .....C.....
.....
#INT44 ..-..... .C..... ..TA..... .A.....- .....C.....
.....
#INT45 ..-..... A. A..... .G..... .T--..... .A.....- .T.....
.....
#PAP124 ..-..... .T.G..T... ..G.....- .....A...G.. ..-C... ..A.....G
.....
#PAP2 ..-.....T... ..A...CA.TG.. A...A...-C... ..A.T.GG. .T...G.G ..T..A ..T.A...
...T.....
#PAP9 ..-.....T... ..A...CA.TG.. A...A...-C... ..A.T.GG. .T...G.G ..T..A ..T.A...
...T.....
#PAP40 ..-.....T... ..A...CA.TG.. A...A...-C... ..A.T.GG. .A...G.G ..T..A ..TT.A...
...T.....
#PAP21 ..-.....T... ..G...A...CA.TG.. A...A...-C... ..A.T.G. .-...G.G ..CA.T ..T.A...
...T.....
#PAP7 ..-.....T... ..A...CA.TG.. A...A...-C.A... ..A.T.G. .A...G.G ..T..A ..T.A...
...T.....
#PAP13 ..-.....T... ..A...CA.TG.. A...A...-C... ..A.T.GG. .A...G.G ..T.GA ..TT.A...
...T.....

```

```

#PAP12 .-...T. ....A. ...CA.TG.. A.T...A.A. ...--C... ..A.T..G. ..A.T..G.G .....CA.T ..T.A...
#INT2 ..-..... ..G..... ..A..... ..A.-..... ..C.....
#INT6 ..-..... ..G..... ..A..... ..A.-..... ..C.....
#INT14 ..-..... ..G..... ..A..... ..A.-..... ..C.....
#INT3 ..-..... ..A..... ..A.-..... ..C.....
#PAP104 ..-..... ..T.G..T... ..A..... ..A.--C... ..A.....G
#PAP11 ..-.....A. AC..C..Y... ..C..T... ..A.....G. ..A.-..... ..T...A .....
#INT15 .C-..... ..T..... ..A.....T. ..A.-C... ..A.....
#INT29 .C-..... ..T..... ..A.....T. ..A.-C... ..A.....
#INT146 .C-..... ..T..... ..A...GT. ..A.-..... ..A...T.....
#INT49 .C-..... ..T..... ..K..... ..A...GT. ..A.-..... ..A...T.....
#INT8 .C-..... ..T..... ..A.....T. ..G.-..... ..A...T.....
#INT38 .C-..... ..T..... ..A.T..T. ..A.-..... ..A.....
#INT7 .C-..... ..T..... ..A.....T. ..G.-..... ..A...T.....
#INT139 .G-....A. ....T... ..A..... ..A.....T. ..A.-..... ..T.A .....
#INT36 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-..... ..A.....
#INT114 ..-..... ..G..... ..T..... ..A.....G. ....
#INT18 ..-..... ..G..... ..A.....
#ACE12 A.-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A...CA..T.G
#ACE25 A.-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A...CA..T.G
#ACE29 A.-..... ..G..T... ..AA..... ..A.....G. ..A.-C... ..A...CA..T.G
#ACE53 ..-..... ..G..TG... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....T.G
#ACE14 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE20 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE28 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE57 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE19 ..-.....T ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE10 ..T..... ..T.G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE1 ..-..... ..T..... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....T
#ACE62 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE27 ..-..... ..G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A...CA..T.G
#ACE16 ..-..... ..T.G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE11 ..-..... ..T.G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE45 ..-..... ..T.G..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#ACE9 ..-..... ..G..T... ..T..... ..A.....G. ..A.-C... ..G.....A .....
#ACE3 ..-..... ..T.GC.T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....T
#ACE17 ..-..... ..T..T... ..A.....G. ..A.-C... ..A.....G
#PAP34 ..-...T. ....A. ...CA.TG.. A...A..G --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.A...
#PAP38 ..-...T. ....A. ...CCA.TG.. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.A...
#PAP4 ..-...T. ....C...A. ...CCA.TG.. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T..ATG..
#PAP41 ..-...T. ....A. ...CA.T... A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.A...
#PAP1 ..-...T. ....A. ...CA.TG.. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.TA...
#PAP66 ..-...T. ....A. ...CA.TT. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.TA...
#PAP140 ..-...T. T.....A. ...CA.TG.. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.TA...
#PAP68 ..-...T. ....A. ...CA.TG.. A...A... G--C.C.A ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..TTTA...
#PAP39 ..-...T. ....A. ...C.A.TG.. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....AA.T ..T.A...
#PAP22 ..-...G. ....A. .A.CA.TG.. A...A... --C.C... ..A.T..G. ..A.-.G.G .....CA.T ..T.A...

```



```

#INT44 .....A--- ..G.....A.....A.....
      .CG.....
#INT45 ..A-----A.....A--- ..GA... ..G..... ..A..... ..T..T.....
      .AG...A...
#PAP124 .....A...A...C...A.TA GC..... ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#PAP2 ..T-----G.A.....AT-- ..T...TA. TT..T.A... ..A..... A..A..T...
      .A.....
#PAP9 ..T-----G.A.....AT-- ..T...TA. TT..T.A... ..A..... A..A..T...
      .A.....
#PAP40 ..T-----G.A.....AT-- ..T...TA. TT..T.A... ..A..... A..A..T...
      .A.....
#PAP21 .....GGA.....AT-- ..T...TA. ..G..T.A... ..AT..... A..A..T...
      .A...A...
#PAP7 ..T-----G.A.....ATTA ----TA. TG..T.A... ..A..... A..A..T... A...
      .A.....
#PAP13 ..T-----G.A.....ATTT ----TA. TT..T.A... ..A..... A..A..T...
      .A.....
#PAP12 .....G.A.....A.TA ----TA. ..G..T.A... ..A.....A. AA..A..T... ..A.....
      .A.....
#INT2 ..T-----A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#INT6 ..T-----A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#INT14 ..T-----A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#INT3 .....A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#PAP104 .....A...A...C...A.TA GC..... ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#PAP11 .....C.....A.TA ----C...C... ..G..T.A..C ..AA..... ..A.C..T... ..A...
      .AG.....
#INT15 .....TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..T.....A.....
      .CG..T...
#INT29 .....TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..T.....A.....
      .CG..T...
#INT146 .....TA.AA ---- ..G..... ..G.A..... ..T.....A.....
      .CG..T...
#INT49 .....TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..G..T... ..A.....
      .CG..T...
#INT8 .....TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..T.....A.....
      .CG..T...
#INT38 .....A...TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..T.....A.....
      .CG..T...
#INT7 .....TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..T.....A..T...
      .CG..T...
#INT139 .....TA.AA ---- ..G..... ..A..... ..T.....G.A.....
      .CG.....
#INT36 .....C...TA.AA ----G ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#INT114 .....CG..A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#INT18 .....T... ..CG..A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG.....
#ACE12 .....A.TA ---- ..G..... ..A..T... ..T...T...
      .CG...T...
#ACE25 .....A.TA ---- ..G..... ..A..T... ..T...T...
      .T.....
#ACE29 .....ATTA ---- ..G..... ..A..T... ..T...T...
      .CG.....
#ACE53 .....A.TA ---- ..G..... ..A..T... ..T...T...
      .CG.....
#ACE14 .....A...A...C...A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#ACE20 .....A...A...C...A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T...T... ..T...
      .CG...C...
#ACE28 .....A...A...C...A.TA ---- ..GT..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#ACE57 .....A...A...C...A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#ACE19 .....A...A...C...A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#ACE10 .....A...A...C...A.TA GC ---- ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#ACE1 .....A...A...A.TA ---- ..T... ..G..... ..A..... ..T.....
      .CG...C...
#ACE62 .....A...A...C...A.TA ---- ..G..... ..A..T... ..T... ..A...
      .CG.....
#ACE27 .....ATTA ---- ..G..... ..A..T... ..T...T...
      .CG.....
#ACE16 .....A...A...A.TA ---- ..G..... ..T... ..T...T...
      .G...C...
#ACE11 .....A...A...A.TA ---- ..G..... ..T... ..T...T...
      .G...C...
#ACE45 .....A...A...A.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .CG...C...
#ACE9 .....A...A...A.TA ---- ..G..... ..A..... ..A..T...
      .CG...C...
#ACE3 .....A...A...A.TA ---- ..T... ..G..... ..A..... ..T.....A...
      .CG...C...
#ACE17 .....A...A...C...TA.TA ---- ..G..... ..A..... ..T.....T...
      .AG...C...
#PAP34 .....AT... ..G.A.....ATTA ----TA. ..G..T.A... ..A..... A..A..T...
      .A...A...

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#PAP38 G.A.T..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #PAP4 G.A..... ATTATA. .G.T.A... .A..... AT.A.T...
 .A.....
 #PAP41 G.A.T..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #PAP1 G.A..... TTTATA. .G.T.A... .A.C...A AT.A.TG... .G.A.-
 .A..T...
 #PAP66 G.A..... TTTATA. .G.T.A... .A.....A AT.A.TG... .G.A..
 .A..T...
 #PAP140 G.A..... TTTATA. .G.T.A... .A.....A AT.A.TG... .G.A..
 .A.....
 #PAP68 GGA..... ATTACA. .T.T.A.C. .A..... A.A.T... .G
 .A...A...
 #PAP39 G.A.T..... ATTATA. .G.T.A... .A..... AT.A.TG...
 .A.....
 #PAP22 GGA..... ATTATA. .G.T.AC. .A..... A.A.T...
 .A...A...
 #PAP35 .C----- GGA.....G ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A...A.-
 #PAP135 .C----- GGA..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A...A...
 #PAP112 G.A..... TTTATA. .G.T.A... .A.....A AT.A.TG... .G.A.G
 .A.....
 #PAP20 G.A..... G... ATTATA. .G.T.A... .A..... AT.A.T...
 .A.....-
 #PAP122 G.A..... ATTATA. .G.T.A... .A..... AT.A.TG...
 .A..T...-
 #PAP36 T. G.G..... ATTATA. .G.T.A... .TA.C... A.A.T... .A..
 .A...A.-
 #PAP136 T. G.G..... ATTATA. .G.T.A... .TA.A... A.A.T... .A..
 .A...A...
 #PAP44 T. G.G..... ATTATA. .T.T.A... .A..... A.A.T...
 .G.....
 #PAP23 T. G.G..... ATTATA. .G.T.A... .A.A.-... A.A.GT... .A...G
 .A.....-
 #PAP67 T. G.G..... ATTATA. .G.T.A... .A.A... A.A.GT... .A...G
 .A.....
 #PAP121 .T----- G.A..... ATTTTA. TT.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #PAP24 G.A..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T... -
 .C.....-
 #PAP43 G.A..... A.TATA. .G.G.A... .AT... A.A.T... .A..
 .A.....
 #PAP37 G.A..... A.TATA. .G.G.A... .AT... A.A.T... .A..
 .A...A...
 #PAP25 G.A..... G... A.TATA. .G.T.-... .A..... A.A.T... .A..
 .A.....
 #PAP26 .C----- GGA..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A...A...
 #ACE42 G.A..... A...A.TATA. .G.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A.....
 #ACE82 G.A..... A...A.TATA. .G.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A...A...
 #ACE7 G.A..... A...A.TATA. .G.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A.....
 #ACE66 T. G.A..... A.TATA. .T.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A.....
 #ACE83 T. G.A..... A.TATA. .T.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A.....
 #ACE111 G.A..... A.TATA. .T.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A.T...
 #ACE81 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A.A... A.G.G... .A..
 .A.....
 #ACE23 G.A..... A...A.TATA. .G.T.A... .A.A... A.A.T... .A..
 .A.....
 #ACE145 A.A..... A.TATA. .G.T.A... .A..... A.GA.T... .C..
 .A...A...
 #ACE21 G.A..... A...A.TATA. .GA.T.A... .A..... A.A.T... .C..
 .A.....
 #ACE110 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A..... A.A.T... .C..
 .A.....
 #ACE72 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A.A... AT.A.T... .A..
 .A.T...
 #ACE15 G.A..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #ACE24 .A----- G.A..... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #ACE26 .A----- G.A..G... ATTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #ACE76 .A----- G.A..... TTATA. .G.T.A... .A..... A.A.T...
 .A.....
 #ACE114 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A...C. A.A.T...
 .AG.....
 #ACE211 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A...C. A.A.T...
 .A.....
 #ACE85 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A.A..C. A.A.T...
 .A.....
 #ACE78 G.A..... A.TATA. .G.T.A... G.A... A.A.T...
 .A...G...
 #ACE2 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A..... A.A.T... .A..
 .A...G...
 #ACE112 G.A..... A.TATA. .G.T.A... .A..... A.A...
 .A...A...

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#ACE62 .....G....T....A...C..... ---GTCGCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA .-.-.....
#ACE27 .....G....T....A...C..... ---GTCGCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA .-.-.....
#ACE16 .....G....T.....C.....T. ---GT.GCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA T-.-.....
#ACE11 .....G....T.....C.....T. ---GT.GCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA T-.-.....
#ACE45 .....G....T.....C.....C. ---GTCGCT. .A.A.TATAT CA-.GACATA T-.-.....
#ACE9 .....G....T.....C.T.....C. ---GTCGCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA .-.-.....
#ACE3 .....G....AT.....C.....G... ---GTCGCT. .ACA.TATAT .A-.G.CATA .-.-.....
#ACE17 .....G....TTT.A...C.....C. ---GTCGCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA .-.-.....
#PAP34 C....C.A. ....C.A .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP38 C....C.A. ....C.A .G.....GC.....CA..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP4 C....CGA. ....A..C. A.G.....GC.....A..TG TTAGTCGCTC CACA.TATAT CA-.G.CATA G-CTGTGA.T
#PAP41 C....C.A. ....C.A .GT.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP1 C....C.A. ....C. .G...-N GC...N...A..T. ---GTCGCT. CACA.TATAT CA-.GACATA C-.T-----
#PAP66 C....C.A. ....C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP140 CT....C.A. ....G..C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA .T-T-----
#PAP68 C....C.A. ....C. .G.....TGC...A..T...A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA CT-T-----
#PAP39 .....C.A. ....C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP22 C....C.A. ....C. .G.....TGC...A..T...A..T. T--GTCGCT. .ACA.TATAT CAG.G.CATA C-.TA--G.C
#PAP35 C....C.A. ....C. .G...-N GC...-...A..T. ---GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP135 C....C.A. ....C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP112 C....C.A. ....C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA..ATAT CA-.T.CATA C-.T-----
#PAP20 C....CGA. .A--C..C. A.G...-N GC...G...A..T. ---GTCGCTC CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP122 C....CCA. ....C. .G...-N GC...N...A..T. ---GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP36 C....C.A. ....-C. .G...-N GC...N...C...A..T. ---GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP136 C....C.A. ....C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP44 C....C.A. ....C. .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CATA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP23 CA....CNA. ....C. .GT.....GC...G...A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP67 CA....C.A. ....C. .GT.....GC.....A..T. T--GTCGCT. .ACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP121 C....C.A. ....C. .G...-N GC...N...A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP24 C....C.-. ....C. .G.....GC.....A..T. ---GTCGCT. CACA.TATAT CA-...CATA C-.T-----
#PAP43 .....C.A. ....C. .G.....A GC.....A..T. --CGTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP37 .....CNA. ....CC. ....A GC...N...A..T. --CGTCGCC- CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP25 .....C.A. ....C. .G...-N GC...G...A..T. --TGTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#PAP26 C....C.A. ....C. .G.....N GC...G...A..T. --TGTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE42 .....C.A. ....C. .G.....T.A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE82 .....C.A. ....C. .G.....A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE7 .....C.A. ....C. .G.....A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAC CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE66 .....C.A. ....C. .G.....ACCT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATG C-.T-----
#ACE83 .....C.A. ....C. .G.....ACCT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATG C-.T-----
#ACE111 .....C.A. ....C. .G.....A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE81 .....C.A. ....C. .G.....A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE23 .....C.A. ....C. .G.....A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAC CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE145 C....C.A. ....C. .G.....GC.....A..TA T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE21 C....C.A. ....C.T .G.....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE110 C....C.A. ....C.T .G.....T GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE72 .....C.A. ....C. .G.....A.CT. T--GTCGCT. AACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE15 .....C.A. ....C. .G.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----

```

```

#ACE24 C....C.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE26 CT....C.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE76 C....C.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCTCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----
#ACE114 C....C.A. ....C.. .....GC.....T...A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT AA-.G.CGTA C-.T-----
#ACE211 C....C.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT AA-.G.CGTA C-.T-----
#ACE85 C....C.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT AA-.G.CATA C-.T-----
#ACE78 C....C.A. ....C.. .....T....GC.....A..T. T--GTCGCT. CAGA.TATAT AA-.G.CATA C-.T-----
#ACE2 C....T.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCGCT. CAGA.TATAT AA-.G.CAAA C-.T-----
#ACE112 G....C.A. ....C.. .....A.GC.....A..T. T--GTCGCT. CGCA.TATAT AA-.G.CATA C-.T-----
#ACE13 .....C.A. ....C.. .....GC.....A..T. T--GTCGCT. CACA.TATAT CA-.G.CATA C-.T-----

#INT31 CAC---TTTA TTAACAATC- GTGTAGT-AG G-AGA-ATGT AAGCATTGG TCCTAATTAG GCCAAATT-G GACCATTAGT AGTCATTGCC
CATCATAT--
#INT46 .....S K-C.....
#INT37 .....C.....S D-V.....-C.....
#INT39 .....S DNC.....-C.....
#INT42 .....V N-C.....-.....
#INT41 .....V W-C.....-.....
#INT47 .....S D-C.....-C.....
#INT35 .....RS D-C.....A.....-C.....
#INT44 .G.....C DVG.....-C.....T.....
#INT45 .....G.....S RTC.....-C.....G.....
#PAP124 .....V H-C.....C.....A.....GA
#PAP2 .S......GG.....C T-C.....A.....GA
#PAP9 .....GG.....C T-C.....C.....GT.....A.....GA
#PAP40 .....GG.....C T-C.....T.....A.....GA
#PAP21 .....GG.....C T-C.....T.....A.....GA
#PAP7 .RS......GG.....C TCGA.....T.....A.....GA
#PAP13 .....GG.....C TCGA.....T.....G.....A.....GA
#PAP12 .....G.CMC.Y.-.....GRV TCGA.....T.....A.....GA
#INT2 .....MM.....DR.C TCGA.....A.....GA
#INT6 .....M...C .....WRV- TCGA.....-.....
#INT14 .....RC- TCGA.....-C.....
#INT3 .....-C.....
#PAP104 .....AC- TCGA.....-C.....A.....GA
#PAP11 .....A... .G......AGV TCGA.....-C.....A.....GA
#INT15 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....
#INT29 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....
#INT146 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-C.....
#INT49 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....
#INT8 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....
#INT38 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....
#INT7 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....A.....-.....
#INT139 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....
#INT36 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-.....T.....
#INT114 .....A.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-A.....G.....
#INT18 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--.....-A.....G.....
#ACE12 .C......G.....G TGTAGTACTC .A.-----.....T.....G.....A
#ACE25 .C......G.....G TGTAGTACTC .A.-----.....G.....A

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#ACE29 .C----- .G.....G TGTAGTACTC .A----- .G...A
#ACE53 .....G.....G TGTAGTACTC .A----- .G...A
#ACE14 .....G TGTAGTACTC .A----- .G...A
#ACE20 .....G TGTAGTACTC .A----- .G...A
#ACE28 .....G TGTAGTACTC .A----- .C...G...A
#ACE57 .....G TGTAGTACTC .A----- .C...G...A
#ACE19 .....G TGTAGTACTC .A----- .G...A
#ACE10 .....G TGTAGTACTC .A.T--- .G...A
#ACE1 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--- .G...A
#ACE62 .CT----- .G.....AG ----- .C...G...A
#ACE27 .C----- .G.....G TGTAGTACTC .A.T--- .G...A
#ACE16 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--- .C...G...A
#ACE11 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--- .C...G...A
#ACE45 .....G.....G TGTAGTACTC .A----- .C...G...A
#ACE9 .....G.....G TGTAGTACTC .A----- .C...G...A
#ACE3 .....G.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...G...A
#ACE17 .....G TGTAGTACTC .A.T--- .G...A
#PAP34 .....AG.....G TGTAGTACTC .AT--- .C...GT...A...GA
#PAP38 .....GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...A...GA
#PAP4 .G.AGC... .GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...A...GA
#PAP41 .....GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...A...GA
#PAP1 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...G...A...GA
#PAP66 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...A...GA
#PAP140 .....GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...T...A...GA
#PAP68 .T----- .GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...A...GA
#PAP39 .....GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .C...T...A...GA
#PAP22 .....GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...A...GA
#PAP35 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...A...C...GA
#PAP135 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...A...C...GA
#PAP112 .A----- .GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...A...GA
#PAP20 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...A...GA
#PAP122 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...G...A...GA
#PAP36 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...A...GA
#PAP136 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...A...GA
#PAP44 .....GG.....G TGTAGTACTC .AT--- .T...G...A...GA
#PAP23 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...G...A...AA
#PAP67 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...A...GA
#PAP121 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...G...A...GA
#PAP24 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .A...T...A...GA
#PAP43 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...C...A...GA
#PAP37 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...C...A...GA
#PAP25 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .T...A...GA
#PAP26 .....GG.....G TGTAGTACTC .A--- .CT...A...GA
#ACE42 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .T...T...A...GA
#ACE82 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .TGG...A...CGA
#ACE7 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .TG...A...CGA
#ACE66 .....GG.....G TGTAGTACTC .A.T--- .TG...A...CGA

```

```

#ACE83 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .T-T--.....T.G.-. ....A. ....GA
..C.....--
#ACE111 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....TG.-. ....A. ....GA
..C.....--
#ACE81 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....T.-. C.....A. .A.....GA
..C.....C--
#ACE23 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....T.-. C.....A. .A.....GA
..C.....--
#ACE145 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A-T--.....TGT.-. .A.A. ....GA
..C.....--
#ACE21 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....TT.-. ....A. ....GA
..C.....C--
#ACE110 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....TTG.-. ....A. .A.....GA
..C.....--
#ACE72 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A-T--.....T.-. C..A...A. ....GA
..C.....--
#ACE15 ...---.A.. .GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....T.-. ....A. ....GA
..C.....--
#ACE24 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....T.-. C..A...A. ....GA
..C.....--
#ACE26 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....T.G.-. C.....A. .A.....GA
..C.....C--
#ACE76 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A-T--.....T.-. ....A. .A.....GA
..C.....--
#ACE114 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....TT.-. ....A. ....GA
..C.....--
#ACE211 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A-T--.....TT.-. ....A. .A.A...CGA
..C.....C--
#ACE85 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A-T--.....TGT.-. ....A. .A.....CGA
..C.....--
#ACE78 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A-T--.....TGG.-. ....A. ....GA
..C.....C--
#ACE2 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....T.-. .A...A. ....GA
..C.....--
#ACE112 T...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....TTT.T. .A...A. .A.....GA
..C.....AT
#ACE13 ...---.GG.....G TGTAGTACTC .A.T--.....A .T.-. ....A. ....GA
..C.....--

#INT31 --CATTGAAT AAGATATTTG ATCTTCCACT CT--GGA--T CCCT-AAAA GACT-ACGTA AACT-A-T- AATTAAT--- --CCAATTCA
GTCCAATTC
#INT46 .....-T.-. ....-
#INT37 .....-T.-. ....CM.-. ....G.-. ....G....
.....
#INT39 .....-T.-. ....-A...G
T.....
#INT42 .....-T.-. ....-A...G
T.....
#INT41 .....A .....-T.-. ....-G
T.....
#INT47 .....A .....-T.-. ....-G
T.....
#INT35 .....A .....T.-T.-. ....-G
T.....
#INT44 .....A .....T.....-T.-. ....C.-. ....G
..G.....
#INT45 -T.A.....T.....-T.-. ....-GG
..A.G....
#PAP124 ...AG...A .A...C... .G.....-T.-. ....G.G.....-GG
.....
#PAP2 ...AA...A .A...C... ..-Y.....G.....T.-.-.G.....-GG
.Y.....
#PAP9 ...AG...A .A...C... ..-T.....G.....-GG
.C.....
#PAP40 ...G...A .A...C..T .....-T.-.-.G.....-GG
.C.....
#PAP21 ...AG..CA .A...C... ..-T.....G.....-G...C.GG
.C.....
#PAP7 ...AG...A .A...C... ..ATT.-.-C... .G.-...T...AT--.G.....-C.GG
.C.....
#PAP13 ...AG...A .A...C... ..ATT.-.-C... .G.-...T...AT--.G.....-C.GG
.C.....
#PAP12 ...AG...A .A...C... ..ATT.-.-C... .G.-...T.T.TT--.G.....-GC.GG
.C.....A
#INT2 ...AG...A .A...C..A .....ATT.-.-C... .G.-...T...AT--.G.....-C.GG
.C.....
#INT6 .....ATT.-.-C... .G.-..A. .T.T.TT--.G.....-C.GG
.C.....
#INT14 .....ATT.-.-C... .G.-...T.T.AT--.G.....-GG
.C.....
#INT3 .....ATT.-.-C... .G.-...T.T.TT--.G.....-C.GG
.C.....
#PAP104 ...AG...A .A...C... .G.....ATT.-.-C... .G.-...T.T.TT--.G.....-C.GG
.C.....
#PAP11 ...AA...A .A...C... ..ATT.-.-C... T.G.-...T.T.TT--.G.....-C.GG
.C.....
#INT15 .....ATT.-.-G.....T...A.-.-.GG
..T...A..
#INT29 .....ACT.-.-G.....T...A.-.-.GG
..A..
#INT146 .....ATT.-.-G.....T...A.-.-.GG
..A..
#INT49 .....ATT.-.-G.....T...A.-.-.GG
..A..

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#INT8  --.....ATT.....G.....T...A.....GG
#INT38  --.....A.....ATT.....G.....T...A.....GG
#INT7   --.A.....ATT.....G.....T...A.....GG
#INT139 --.A.....T.ATT.....G.....TC...A.....C.....GG
#INT36  --.A.....T.....ATT.....G.....A.....GG
#INT114 --T.A.....T.....ATT.....T...G...G.....A.....AG
#INT18  --T.A.....T.....ATT.....T...G...G.....G
#ACE12  --.A.....A.....G.....G.GC.....GG
#ACE25  --.A.....A.....G.....G.GC.....GG
#ACE29  --.A.....A.....G.....TGC.....GG
#ACE53  --.A.....A.....G.....G.GC.....GG
#ACE14  --.A.....A.....T.G.....G.....GG
#ACE20  --.A.....A.....T.G.....G.....GG
#ACE28  --.A.....A.....T.G.....G.....GG
#ACE57  --.A.....A.....T.....T.G.....G.....GG
#ACE19  --.A.....A.....T.G.....G.....GG
#ACE10  --.A.....A.....A.....G.G.....GG
#ACE1   --.A.....A.....T.....T.....A.....G.....GG
#ACE62  --.A.....A.....A.....G.....GG
#ACE27  --.A.....A.....A.....G.....GG
#ACE16  --.A.....A.....C.....A.....G.....GG
#ACE11  --.A.....A.....C.....A.....G.....GG
#ACE45  --.A.....A.....A.....G.....GG
#ACE9   --.A.....A.....A.....G.....GG
#ACE3   --.A.....A.....AA.....G.....A.....G.....GG
#ACE17  --.A.....A.....AA.....G.....A.....G.....GG
#PAP34  --.AG...A...A...C...G.....ATT.....C.....G.....T...AT...G.....C.GG
#PAP38  --.AA...A...C.....ATT.....C.....G.....T...AT...G.....C.GG
#PAP4   --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G.....T.T.TT...G.....GC.GG
#PAP41  --.G...A...A...C...T.....ATT.....C.....G.....T...AT...G.....C.GG
#PAP1   --.AG...CA...A...C.....ATT.....C.....G...A...T.T.TT...G.....C.GG
#PAP66  --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G.....T.T.AT...G.....GG
#PAP140 --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G.....T.T.TT...G.....C.GG
#PAP68  --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G.....T.T.TT...G.....C.GG
#PAP39  --.AG...A...A...C...A.....ATT.....C...T.G.....T.T.TT...G.....C.GG
#PAP22  --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G...AC...T...AT...G.....T...C.GG
#PAP35  --.G...A...A...C...T.....ATT.....C.....AG...T...T...AT...G.....G...C.GG
#PAP135 --.G...A...A...C...T.....ATT.....C.....AG...T...T...AT...G.....G...C.GG
#PAP112 --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....AG.....T...AT...G.....G...C.GG
#PAP20  --.AG...A...A.....G.....ATT.....C.....G.....T...AT...G.....C.G.
#PAP122 --.AG...A...A...C.....TTT.....C.....G...A...T...AT...G.....C.GG
#PAP36  --T.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G...A...T...AT...G.....C.GG
#PAP136 --T.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G...A...T...AT...G.....C.GG
#PAP44  --T.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G...A...T...AT...G.....C.GG
#PAP23  --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G...A...T...AT...G.....C.GG
#PAP67  --.AG...A...A.....ATT.....C.....G...A...T...AT...G.....T...C.GG
#PAP121 --.AG...A...A...C.....ATT.....C.....G...AC...T...AT...G.....C.GG

```

```

#PAP24 --.AG...A ..A..C... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.TG
.C.....
#PAP43 --.AG... ..A..C... ..AG... A.ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#PAP37 --...G... ..A..C... ..AG... A.ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#PAP25 --T.AG...A ..A..C... ..ATT...--- -...-C... ..G.-...A. ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#PAP26 --T.AG...A ..A..C... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..G...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE42 --.AG... ..A..A... T-..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...ATG--- ..GC.....- -...C.GG
.C.....
#ACE82 --.AG... ..A..A... T..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -T..C.GG
.C.....
#ACE7 --.AG... ..A..C... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE66 --.AG... ..A..A... -..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE83 --.AG... ..A..A... -..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE111 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..GG-...A. ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE81 --.AG... ..A..A... -..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE23 --.AG... ..A..A... -..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...GG
.C.....
#ACE145 --.AG... ..A..A... T-..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE21 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T.T.AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE110 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE72 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...GG
.C.....
#ACE15 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...GG
.C.....A.
#ACE24 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.CGG.....
#ACE26 --.AG... ..A..C... T..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.CGG.....
#ACE76 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-T... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE114 --.AG... ..A..A... T..... ..ATT...--- -...-C... ..G.-...C. ..T...A--- ..GG.....- -...C.GG
.C.....
#ACE211 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE85 --.AG... ..A..A... -..... ..ATT...--- -...-C... ..GG-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.TG
.C.....
#ACE78 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-...A... TT...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C.....
#ACE2 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -T..C.GG
.C.....
#ACE112 AT..AG... ..A..C... ..ATT...--- -T-..C... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -G..C.GG
.C.....
#ACE13 --.AG... ..A..A... ..ATT...--- -...-T... ..G.-... ..T...AT--- ..G.....- -...C.GG
.C..G.....

#INT31 T----TTATT CATCAATATT GCATAC--TA TATATGCATA ATATACATAT ACTTCCACTT TATATTCTCT TGAATCGGCC AAAATTCTAT C-
AATTAACC
#INT46 -----
#INT37 -----
#INT39 -----C.C.
#INT42 -----C.C.
#INT41 -----C.C.
#INT47 -----C.C.
#INT35 -----C.C. A
#INT44 -----T. A. C. A
#INT45 -----C. G. T.C. T. C. G. T.T. A. G. CA. A-
...G...
#PAP124 -----C. G. T.C. C. G. C. A. G. AT. -
...G...
#PAP2 C----CT. G.G. T.C. T. G.C. G. A. T. G...CC. -
...GT...
#PAP9 C----CT. G.G. T.C. T. G.C. G. A. T. G...CC. -
...GT...
#PAP40 C----CT. G.G. T.C. T. G.C. G. A. T. G...CC. -
...GT...
#PAP21 C----CT. G.G. T.C. T. G.C. G. A. T. T. G...CC. -
T.GT...
#PAP7 C----CT. G.G. T.C. T. G.C. G. A. T. G...CC. -
R.GT...
#PAP13 C----CT. G.G. T.C. T. G.C. G. A. T. G...CC. -
...GT...
#PAP12 C----CT. G. TG.C. T. G.C. G. C. T. T.C. G...CC. -
...GT...
#INT2 C----CT. -----C. -
.....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

#INT6 C----.CT..--.....C..TC -
 #INT14 C----.CT..--.....C..... -
 #INT3 C----.CT..--..... -
 #PAP104 C----.CT..G.. T..C.--.....C.....G.....C....A... G...AT... -
 #PAP11 C----.CT.. .GAA...G.. T..C.--.....A.....T.....G...CC.... -
 #INT15 .----.....GA. TA.C.--...C.....G.....C.....T.....G...C.... -
 #INT29 .----.....GA. TA.C.--...C..T..G.....C.....T.....A.....G...C.... -
 #INT146 .----.....GA. TA.C.--...C.....G.....C.....T.....G...C.... -
 #INT49 .----.....GA. TA.C.--...C.....G.....C.....T.....T.....G...C...A -
 #INT8 .----.....GA. TA.C.--...C.....G.....C.....T.....G...C.... -
 #INT38 .----.....GA. TA.C.--...C.....G.....C.....T.....G...C.... -
 #INT7 .----.....G.. T..C.--...C.....C.....T.....A...A... G..... -
 #INT139 .----.....G.. T..C.--...C.....C.....T.....G.T..C.... -
 #INT36 .----.....G.. T..C.--...C.....C.....T.....G...C.... -
 #INT114 .----.....T.....C.T.....G...C.... -
 #INT18 .----.....A.--.....C.....C.....G...C.... -
 #ACE12 -.CTTGC... ..G.. T..C.--.....C.....G.....A.....G...C.... -
 #ACE25 -.CTTGC... ..G.. T..C.A--.....C.....G.....A.....G...C.... -
 #ACE29 -.CTTGC... ..G.. T..C.--.....C.....A.....G.....A.....G...C.... -
 #ACE53 .GCTTGC... ..G.. T..C.--.....C.....G.....A.....G...C.... -
 #ACE14 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE20 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C.....C.... -
 #ACE28 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE57 .----.C... ..G.. TA.C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE19 .----.C... ..G.. T..C.--.....T...C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE10 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C....A... G...AT... -
 #ACE1 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE62 .----.C... ..G.. T..C.--...G.....C.....G.....CG.....G...C.... -
 #ACE27 .----.C... ..G.. T..C.--...G.....C.....G.....CG.....G...C.... -
 #ACE16 .----.C... ..AT...G.. T..C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE11 .----.C... ..AT...G.. T..C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE45 .----.C... ..AT...G.. T..C.--.....C.....G.....C.....T... G...CT... -
 #ACE9 .----.C... ..AT...G.. T..C.--.....C.....G.....C.....G...C.... -
 #ACE3 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C....A... G...C.... -
 #ACE17 .----.C... ..G.. T..C.--.....C.....G.....C....A... G...C.... -
 #PAP34 C----.CT..G.G.. T..C.--...T.....G.C.....G.....T...T... -...CC.... -
 #PAP38 C----.CT..T.G.. T..C.--...T.....G.C.....C...T...T... G...CC.... -
 #PAP4 C----.CT..G.G.. T..C.--...T.....G.C.....G.....AT...AT.T G...CC.... -
 #PAP41 C----.CT.. A...G.G.. T..C.--...T.....G.C.....G.....AT...AT.T G...CC.... -
 #PAP1 C----.CT..G.G.. T..C.--...T...A...G.C.....G.....AT...T.T ...CC.... -
 #PAP66 C----.CT..G.G.. T..C.--...T...A...G.C...G...G.....AT...T... G...CC.... -
 #PAP140 C----.CT..G.G.. T..C.--...T...A...G.C.....G.....AT...T... G...CC.... -
 #PAP68 C----.CT..G.G.. T..C.--...T...A...G.C.....G.....AT...T... G...CC.... -
 #PAP39 C----.CT..G.G.. T..C.--...T...A...G.C.....G.G.....AT...T... G...CC.... -
 #PAP22 C----.CT..G.G.. T..C.--...T.....G.C.....G.....--AT... G...CC.... -
 #PAP35 C----.CTA.G.G.. T..C.--...T.....G.C.....T...T... G...CC.... -
 #PAP135 C----.CTA.G.G.. T..C.--...T.....G.C.....T...T... G...CC.... -


```

#PAP112 C----.CTA. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T....T. G...CC.... -
...GT...
#PAP20 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T....T. ....CC.... -
...GT...
#PAP122 C----.CT.. ....TG.G.. T.C.--. .T.T..... .G.C.. .....G ..... .T....T. G...CC.... -
...GT...
#PAP36 C----.CT.. ....G.... T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .....A... .T...AT. G...CC.... -
...AGT...
#PAP136 C----.CT.. ....G.... T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .....A... .T...AT. G...CC.... -
...AGT...
#PAP44 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T...AT. G...CC.... -
...AGT...
#PAP23 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T...AT. G...CC.... -
...AGT...
#PAP67 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T...AT. G...CC.... -
...AGT...
#PAP121 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T...AT. G...CC.... -
...AGT...
#PAP24 C----.CT.. ....G.. TT.C.--. .T..... .G.C.. .....G C..... .T.T...T. ....CC.... -
...GT...
#PAP43 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G C..... .T....T. ....CC.... -
...GT...
#PAP37 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G C..... .T....T. ...TCC.... -
...GT...
#PAP25 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T.T..... .G.C.. .....G C..... .T....T. ....CC.... -
...AGT...
#PAP26 C----.CT.. ....GG.G.. T.CC.--. .G.T..... .G.C.. .....G ..... .T....T. G...CC.... -
...GT...
#ACE42 C----.CT.. AT.....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....T..G .....C. .T....T. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE82 C----.CT.. AT.....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....T..G .....C. .T....T. G...CC.... -
...CCT.G.
#ACE7 C----.CT.. AT.....G.. T.C.--. .T.T..... .G.C.. .....G .....C. .T...AT. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE66 C----.CT.. AT.....G.. T.C.--. .T.T..... .G.C.. .....T..G .....C. .T....T. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE83 C----.CT.. AT.....G.. T.C.--. .T.T..... .G.C.. .....T..G .....C. .T....T. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE111 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .....C. .T....T. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE81 C----.CT.. ....G.C T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .....C. .T....T. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE23 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G.G .....C. .T....TT. G...CC.... -
...GT...
#ACE145 C----.CT.. ....G.G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .C...C. .T....T. G...CC.... -
...GT.G.
#ACE21 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .T..G.C.. .....G .....C. .T....T. G...CC.... -
...GT...
#ACE110 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .....C. .T....T. G...CC.... T-
...GT...
#ACE72 C----.T. ....T.C.--. .T..... .G.C.. .....G .....C. .TC...AT.T G...CC.... -
...AT.G.
#ACE15 C----.AT. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T....T.T G...CC.... -
...GT...
#ACE24 A----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....C.G ..... .T....T. G...CC.... -
...GT..G
#ACE26 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.. .....G ..... .T....T. G...CC.... -
...GT..G
#ACE76 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..... .G.C.C .....A ..... .T....T. G...CC.... -
...GT...
#ACE114 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..G... .G.C.. .....G .....C..... .T...TT. ....CC.... -
...GT...
#ACE211 C----.CTG. ....G.. T.C.--. .T..G... .G.C.. .....G .....C..... .T...TT. ....CC.... -
...GT...
#ACE85 C----.CT.. ....G.G.. T.CC.--. .T..... .G.C.. .....G .....C. .T...T.T.T G...CC.... -
...GT.G.
#ACE78 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..G... .G.C.. .....G .....A. .T....T. G...CC.... -
...GT...
#ACE2 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..G... .G.C.. .....G ..... .T...T.T. G...CC.... -
...GT...
#ACE112 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..G... .G.C.. .....G .....A... .T....T. G...CC..G. -
...GT...
#ACE13 C----.CT.. ....G.. T.C.--. .T..G... .G.C.. .....G .....C..... .T...TT. ....CC.C.
.C...GT...

#INT31 AATTGGGGCCA ACTA-GGCAT AATTGCATT TTTTTTGTG TTTCAAAATA TATCGAGGCA TAATGTACAC AAT--C-TTC CACTATATTG
ACTATTGCAT
#INT46 .....A.....
#INT37 .....A.....
#INT39 .....G.....A.....
#INT42 .....G.....A.....
#INT41 .....G.....A.....
#INT47 .....G.....A.....
#INT35 .....G.....G.....A.....
#INT44 .....A.....A.....TG--.....A.A.....-C-.....C.
#INT45 .....TG .....A.....C.....ATA.....G.....

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#PAP124 ...C.....T.....A.....C..C.....A.....A.....CC.
#PAP2 .....T.....-AAT.....A A.....A.AA.T.....A.A.....-AG---
#PAP9 .....T.....-AAT.....A A.....A.AA.T.....A.A.....-AG---
#PAP40 .....T.....-AAT.....A A.....A.AA.C.....A.A.....-AG---
#PAP21 .....T.....-CA.....A A.....A.AA.C.....A.....-AG---
#PAP7 .....T.....-AAT.....A A.....-A.A..C.AT ATATC.AAGC AT.A-G-G--
#PAP13 .....T.....-AAT.....A A.....-A.A..C.AT ATATC.AAGC AT.A-G-G--
#PAP12 G...A...T.....-C.....A A.....-A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A-G-G--
#INT2 .....-.....-GTC G..TCG..AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA C.AT--...C.
#INT6 .....-.....G...-GTC G..TCG..AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA C.AT--...C.
#INT14 .....-.....-GTC G..TCG..AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA C.AT--...C.
#INT3 .....-.....-GTC G..TC...AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA C.AT--...C.
#PAP104 ...C.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT--...CC.
#PAP11 ...A..AT. CTA.-T.....A.....A...-AT...TC.C.AT ATATC.A.GC CT.ATGTACT ..AT-.T.C. ....CA
#INT15 .....-.....-ATC G..TC.C.AT ATATC.A.GT AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT29 .....A.-.....A...-ATC G..TC.C.AT ATATC.A.GT AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT146 .....-.....A...-ATC G..TC.C.AT ATATC.A.GT AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT49 .....A.....-.....C.....AA...-ATC G..TC.C.AT ATATT.A.GT AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT8 .....-.....A...-ATC G..TC.C.AT ATATC.A.GT AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT38 .....-.....A...-ATC G..TC.C.AT ATATC.A.GT AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT7 .....-.....A...-ATC G..TC.C.AT ATATC.ATGC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT139 .....C.....A...-ATC G..TC.C.AT ATATC.ATGC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT36 .....-.....A...-GTC G..CTC.C.AT ATATT--GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#INT114 .....-.....G-C-A -...TC...AT ATATC.A.GC A..ATGTACA C.AT-.T.C. ACAATATC-.
#INT18 .....T.....-.....G...-CGA A..TC...AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA C.AT-.T.C. ACAATATC-.
#ACE12 .....-.....A...-GTC G...C...AT ATATC.A.GC .T.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE25 .....-.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC .T.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE29 .....-.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC .T.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE53 .....-.....TGTC G...C.C.AT ATATC.A.GC .T.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE14 .....-.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATACC-.
#ACE20 .....-.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATACC-.
#ACE28 ...C.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATACC-.
#ACE57 .....-.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATACC-.
#ACE19 .....-.....T.....-A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATACC-.
#ACE10 ...C.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGT-CA ..AT-.T.C. ACTATACC-.
#ACE1 ...C.....T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATA.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATACCC.
#ACE62 .....-.....T...T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATA.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE27 .....-.....T...T.....A...-GTC G...C.C.AT ATATA.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE16 ...A..A.....-.....C...A...-GTC A...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE11 ...A..A.....-.....C...A...-GTC A...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE45 .....A.....-.....C...A...-GTC A...C.C.AT ATATC.A..C AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE9 .....A.....-.....C..C...A...-GTC A...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..AT-.C.C. ACTATATC-.
#ACE3 .....-.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A..C AT.ATGTACA ..AT-.T.C. ACTATATC-.
#ACE17 .....-.....A...-GTC G...C.C.AT ATATC.A.GC AT.ATGTACA ..ATA.T.C. ACTATATC-.
#PAP34 .....T.....-CA.....A A.....-A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT-.
#PAP38 .....T.....-A.....A A.....-A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT-.
#PAP4 .....T.....-CA.....A A.....-A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT-.

```

```

#PAP41 .....T. ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP1 .....TT ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP66 .....TT ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP140 .....TT ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G..T---.C. ACTATAT.-.
#PAP68 .....TT ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G..T---.C. ACTATAT.-.
#PAP39 .....TT ....-CA... .....A A.----- -AAA..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP22 .....T. .A.-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.G. A.TATAT.-.
#PAP35 .....T. ....-CA... .....A A.--C----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP135 .....T. ....-CA... .....A A.--C----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP112 .....T. ....-CA... ..CA...A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GG---.C. ACTATAT.-.
#PAP20 .....T. ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP122 ....A..T. ....-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP36 .....T. .A.-CA... ..A...A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.G. AT.A----- G.GT---.C. A.TATAT.-.
#PAP136 .....T. .A.-CA... ..A...A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.G. AT.A----- G.GT---.C. A.TATAT.-.
#PAP44 .....T. .A.-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. A.TATAT.-.
#PAP23 .....T. .AC.-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC GT.A----- G.AT---.C. A.TATAT.-.
#PAP67 .....T. .A.-CA... .....G.A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. A.TATAT.-.
#PAP121 .....T. .A.-CA... .....A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP24 .....T. ....-C... ..T...A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP43 .....T. ....-C... ..T...GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- .GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP37 .....T. ....-C... ..GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- .GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP25 .....T. ....-C... ..GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- .GT---.C. ACTATAT.-.
#PAP26 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE42 .....AT. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE82 .....T. ....-C... ..T...A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE7 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.AA----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE66 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE83 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE111 .....T. ....-C... ..GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.G. AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE81 .....T. ....-C... ..GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.G. AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE23 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE145 .....T. ....-CA... ..GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.G. AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE21 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE110 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE72 .....T. ....-C... ..GA A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.G. AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE15 ....A..T. ....-CA... .....A A.----- -A..T..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE24 .....T. ....-C... ..T...A A.----- -A.A..C.AT ATA.C.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE26 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE76 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE114 .....T. ...G-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE211 ....A..T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE85 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE78 .....T. G...-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE2 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE112 .....T. ....-C... ..A A.----- -A.A..C.AT ATATC.A.GC AT.A----- G.GT---.C. ACTATAT.-.
#ACE13 .....T. ...GGC... ..A A.----- -A.A..CC.AT ATATC.A.GC AT.A----- .G.T---CC. ACTATAT.-.

```

Evolución de los Sistemas Reproductivos en el Género *Rumex*

```

#INT31 TGTACTCGAA TG
#INT46 .....
#INT37 .....
#INT39 .....
#INT42 .....
#INT41 .....
#INT47 .....
#INT35 .....
#INT44 .....A...
#INT45 .....T...
#PAP124 .....
#PAP2 .....A...A
#PAP9 .....A...A
#PAP40 .....A...A
#PAP21 .....A...A
#PAP7 .....A...A
#PAP13 .....A...A
#PAP12 .....A...A
#INT2 .....
#INT6 .....
#INT14 .....
#INT3 .....
#PAP104 .....
#PAP11 .A.....A
#INT15 .....
#INT29 .....
#INT146 .....
#INT49 .....
#INT8 .....
#INT38 .....
#INT7 ....T.G...G.
#INT139 .....G...G.
#INT36 .....T...C.
#INT114 .....
#INT18 .....
#ACE12 ....T.T...
#ACE25 ....T.T...
#ACE29 ....T.T...
#ACE53 ....T.T...
#ACE14 .....
#ACE20 .....
#ACE28 .....
#ACE57 .....
#ACE19 .....
#ACE10 .....
#ACE1 .....
#ACE62 .....
#ACE27 .....
#ACE16 .....
#ACE11 .....
#ACE45 .....
#ACE9 .....
#ACE3 .....
#ACE17 .....
#PAP34 .....A.T.A
#PAP38 ...G.A...A
#PAP4 .C.....A...A
#PAP41 .C.....A...A
#PAP1 .C.....A...A
#PAP66 .C.....A...A
#PAP140 .C.G.A...A
#PAP68 .C.....A...A
#PAP39 .C.....A...A
#PAP22 .C.....A...A
#PAP35 .....A...A
#PAP135 .....A...A
#PAP112 .....A...A
#PAP20 .....A...A
#PAP122 .....A...A
#PAP36 .C.....A...A
#PAP136 .C.....A...A
#PAP44 .C.....A...A
#PAP23 .....A...A
#PAP67 .C.....A...A
#PAP121 .....A...A
#PAP24 .....A...A
#PAP43 .....A...A
#PAP37 .....A...A
#PAP25 .....A...A
#PAP26 .....A...A
#ACE42 .....A...A
#ACE82 .....A...A
#ACE7 .....A...A
#ACE66 .....A...A
#ACE83 .....A...A
#ACE111 .....A...A
#ACE81 .....A...A
#ACE23 .....AA...A
#ACE145 .....A...A
#ACE21 .A....AA...A
#ACE110 .....AA...A
#ACE72 .....A...A
#ACE15 .....A...A
#ACE24 .....A...A
#ACE26 .....A...A

```

```
#ACE76 .....A.. -  
#ACE114 .....A.. C  
#ACE211 ...G...A.. C  
#ACE85 .....A.. A  
#ACE78 .....AG. A  
#ACE2 .....A.. A  
#ACE112 .....A.. A  
#ACE13 G.....A.. A
```

#RI_30B	-CGAG-T-TT	CACTTATTTG	TCCG---AAA	AAGGTT-GAA	-TTTGTATAC
#RI_30	-.....-.-.T...
#RI_37B	-.....-A-C.
#RI_19B	-.....-A-C.
#RI_37	-.....-.-.
#RI_19	-.....C.-.
#RI_17B	-.....-.-.A---.C	N.....CT
#RS_16	-.....-.-.
#RS_9	-.....-.-.
#RS_1	-.....-.-.
#RS_37	-.....-.-.
#RS_11	-T.....-.-.
#RI_17	-.....C.C..TAC..C	A.....
#RI_50	-.....-.-.	.C.....	.GGCG--.	...A.-.	-...C...G
#RI_49	-.....-.-.	A.....
#RI_10	-.....-.-.
#RI_11	T.....-.-.
#RI_46	-.....-.-.	C..A---.-T..CT
#RI_4	-.....-.-.
#RI_44	T.....-.-.T.....
#RI_26	T.....-.-.N-.
#RI_30B	TTATATATAA	-TAATTTTAT	CAA---GT-T	TATATT-TTT	ACGGTAT-TA
#RI_30	..T...T.G.	-G.....A..-A.
#RI_37B	..T.....G.	-G.....-T.-.-G.	...G...-
#RI_19B	..T.....G.	-G.....-T.-.-G.	...G...-
#RI_37	...T-.T.	-G..A...G.	G.G---.-A.	.T.....-C
#RI_19	...T-.T.	-G..A...G.	G.G---.-A.	.T.....-C
#RI_17B	..T.T...G.	-G..A.....	..T---.	.T....-GA	.A..G...-AC
#RS_16	..T.....G.	-G.....G..	G.TCAA.-.
#RS_9	..T.....G.	-G.....G..	G.TCAA.-.
#RS_1	..T.....G.	-G.....G..	G.TCAA.-.	...G.-.	N....GGN.
#RS_37	..T.....G.	-G.....G..	G.TCAA.-.-G.
#RS_11	..T.T...G.	-G.....G..	G.TCAA.-.	...A.-G.
#RI_17	..T.....C-	-G.GAGA...G.	G.TCAA..A.C.GN	N....TG.
#RI_50	..T.....CC	AG.....G.-G.	.TTA..G-..
#RI_49	..T.....AN.	-G.....-G.	CG.....
#RI_10	..T.....G.	-G.....G..-G.	..TA...-
#RI_11	-G..AA..T.G.-G.	..AT...-C
#RI_46	..T.T...G.	-G..A...G.T....-GA	.A.....-AC
#RI_4	..T.....G.	-G..A...G.	.T---A.-.-G.	.T.....-C
#RI_44	.GT.....	-G..A...G.-A-	.T....-G.-C
#RI_26	..T.T...T.	-G..A.N.GG	G.G---.	..C...-A.	.T.....-C
#RI_30B	TA-TGACTGG	TAGAATAAAT	TATAT-TGAA	TTTTGTTTAT	CTTAAAAATA
#RI_30	..-A.....A	A...T....	...C...A.
#RI_37B	..-A.....AGT....	A..C...T..
#RI_19B	..-A.....AGT....	A..C...T..
#RI_37	..-AT.TCAA	.GC.....AT....	A..C.....
#RI_19	..-AT.TCAA	.GC.....AT....	A..C.....
#RI_17B	..-A..T.AATA.-.C.....
#RS_16	..-A.....A	-A...	...AT....	.A.C.....
#RS_9	..-A.....AT.-A.	...AT....	.A.C.....
#RS_1	..-A.N...A-A.	...AT....	.A.C.....
#RS_37	..-A.....A-.
#RS_11	..-A.....A	.GA.....T....	...C.....
#RI_17	..CA.....A-..N.A...	...GN....	...C.G.T..
#RI_50	..-A.....AAT....	...C.....
#RI_49	..-A.....A	T..T.....
#RI_10	..-A.....AC.....

```
#RI_11  ..-A.T..AA ..... .G...-..... .....C.....
#RI_46  ..-A..T.AA ..... .TA..-...T .....T.....C.....
#RI_4    ..-A..T.AA .G..... .A..-..... .A.TA.A..C.....
#RI_44   ..-AA.T.AA C..... .A..-..... .A.....-...GG.....
#RI_26   ..-AT.TCAA .TC.....C .....-..... .....A..C.....
```

```
#RI_30B TGCAA-TAAG TTCAAAGGGG G-TAGTACAA ACGTTTTT
#RI_30  AA...-A.T. ....-.....C GGT...A
#RI_37B .....-A... .....-.....T GGT.....
#RI_19B .....-A... .....-.....T GGT.....
#RI_37   .T.C.-A... .....T A-.....C G.T...A
#RI_19   .T.C.-A... .....T A-.....C G.T...A
#RI_17B  ..TN.-A... ..N.....-.....GC G.T...A
#RS_16   .....-A... .....-.....C GGT...A
#RS_9    .....-A... .....-.....C GGA...A
#RS_1    .....-A... .....-.....C GGT...A
#RS_37   .....-A... .G.....-.....C GGT...A
#RS_11   .....-A... .....T.....--.....C G.T...A
#RI_17   ...T.GA... .....-.....C ..T.....
#RI_50   .....-N..T .....T .....-.....C G.T...A
#RI_49   .....-N..T .....C.- .....-.....C G.T...A
#RI_10   .....-A... .G.....-.....C GGT...A
#RI_11   .....-A... .....-.....C G.T...A
#RI_46   .TT..-A... .....-...A.....C G.A...A
#RI_4    .T...-A... .....-.....C ..T...A
#RI_44   .T...-A... .....T .....-.....TG.C ..T...A
#RI_26   .T.C.-A... .....T .A.....C G.T...A
```