

Determinación del sexo en borojón (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares*

Determination of borojo sex (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) through molecular markers

Clara Inés Giraldo **, Lucero Rengifo *, Enrique Aguilar ***,
 Duberney Gaviria *, Álvaro H. Alegría ****

RESUMEN

El borojón (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) una rubiacea endémica de la región Pacífica de Colombia, produce un fruto carnoso con importantes propiedades alimenticias que lo posicionan como un recurso genético promisorio. Se usa para preparar conservas y vino, pero su principal uso es como bebida refrescante. Económicamente representa una fuente de ingresos para algunas poblaciones nativas que comercializan la fruta o sus derivados en el mercado local o en las principales ciudades colombianas. El borojón es una planta dioica y los dos sexos no son fenotípicamente distinguibles antes de la floración (3-4 años después de la siembra), por lo cual la productividad de una plantación no seleccionada es sustancialmente reducida. El objetivo de este estudio fue determinar marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) asociados al sexo de borojón. Con base en la secuencia de uno de estos marcadores ligados al sexo, se diseñó una pareja de iniciadores de 20 y 22 pb para diagnosticar el sexo de las plantas vía reacción en cadena de la polimerasa. Se analizaron plantas con sexo molecularmente identificado por PCR, encontrándose resultados congruentes entre éstas y los AFLP. Esto representa para los agricultores una oportunidad para establecer cultivos de borojón diseñados en cuanto a espacio y productividad esperada, en términos de número de árboles femeninos y masculinos plantados.

Palabras clave: *Borojoa patinoi*, plantas dioicas, AFLP, marcadores ligados al sexo, diagnóstico de sexo.

ABSTRACT

Borojón (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas), a rubiacea indigenous to the Colombian Pacific Region, produces a fleshy fruit having interesting nutritious characteristics making it a promising plant resource. It is used for fresh beverages; preserves and wine can also be obtained. It is an especially important source of income for some of the native population who sell it in local food markets and the main Colombian cities. Borojón is a dioecious plant; the two genders are not phenotypically distinguishable before flowering (3-4 years after planting). A non-selected plantation's productivity thus becomes substantially reduced. This project was aimed at determining gender-linked amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. 20 and 22 bp primers were designed by sequencing one of these gender-linked markers and used for determining the plants' gender via polymerase chain reaction (PCR). Samples examined by PCR and AFLP were compared; the techniques presented no differences when determining plant gender. Determining gender in borojón is an important tool for agriculture because it allows adequate selection and distribution of female and male plants for establishing greater productivity plantations.

Key words: *Borojoa patinoi*, dioecious plant, AFLP, gender-linked marker, gender diagnosis.

* Este artículo corresponde a la presentación oral que obtuvo el primer lugar en la sala de biotecnología agrícola del Segundo Congreso Colombiano de Biotecnología.

** Biólogos. Estudiantes de maestría en biología molecular y biotecnología, Cenbiotep, UTP.

*** Biólogo, Cenbiotep, UTP.

**** Médico. Doctor en bioquímica y biología molecular, Cenbiotep, UTP.

Centro de Biología Molecular y Biotecnología (Cenbiotep), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, La Julita, Pereira-Colombia. Correo electrónico: cenbiotep@utp.edu.co

Recibido: octubre 26 de 2004. **Aceptado:** octubre 29 de 2004

INTRODUCCIÓN

El borojó (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) (Cuatrecasas, 1948) es una especie originaria del departamento del Chocó (Colombia), perteneciente a la familia Rubiaceae. Hace parte de los ecosistemas de vega de río a lo largo del Pacífico colombiano encontrándose ampliamente cultivada desde Bahía Solano (Chocó) hasta el río Naya (límites de Valle y Cauca). Actualmente está diseminada en todo el territorio colombiano, incluyendo la Amazonia, la zona cafetera y el Magdalena Medio, ya que se adapta desde los 0 a los 500 msnm. Sin embargo, los sitios de producción comercial de la fruta se encuentran en el Chocó (zona del Atrato, Lloró y Bajo San Juan) y el Valle del Cauca (región del Bajo Anchicayá y el Bajo Calima, y Buenaventura) con un rendimiento que va de 5 a 12 frutos árbol/año durante los primeros 5 años, y de 12 a 30 frutos árbol/año para el resto del periodo de utilidad (Mosquera y Arenas, 1995; Constantino *et al.*, 2000).

El borojó hace parte de un pequeño grupo de plantas que florecen y que son sexualmente dimórficas, las plantas dioicas. Los árboles macho, no productores de frutos, no se diferencian fenotípicamente de las hembras antes de la floración; las inflorescencias masculinas son terminales, en racimo, color blanco crema, y las flores femeninas son solitarias, terminales y también color blanco crema (figura 1a y 1b). El fruto es una baya que en sus primeros estadios es verde clara, y al madurar se torna parda rojiza; tiene un mesocarpo carnoso con sabor aromático y muy perfumado, posee propiedades alimenticias por contener aminoácidos esenciales y ser fuente de calcio, hierro, fósforo y vitamina C (figura 1c). Posee metabolitos secundarios de gran interés como modelos químicos para nuevas drogas. Además, posee propiedades que le atribuye la medicina tradicional y popular como diurético, cicatrizante, afrodisíaco y antitumoral (Gentry, 1982, 1988). Teniendo en cuenta esas propiedades, la expectativa de mercadeo alrededor de la fruta de borojó en el ámbito nacional e internacional es prometedora.

Alrededor del 5% de las especies del reino vegetal son dioicas, y muchas de estas plantas son de valor comercial por la producción de frutos, tales como papaya y kiwi, o de semillas como pistacho, nuez moscada y pimienta negra, por lo que se prefieren en altas proporciones en un cultivo (Parasnis *et al.*, 2000; Ainsworth, 2000). Aunque el dioicismo

es una característica que se presenta en muchos grupos taxonómicos, poco se conoce sobre la base genética de este evento de reciente evolución y, a diferencia de los animales donde los cromosomas sexuales han evolucionado independientemente hasta presentar formas heteromórficas, sólo unas pocas especies dioicas contienen cromosomas heteromórficos como *Silene*, *Rumex* y *Humulus* que permitan identificar su sexo citológicamente (Negrutiu *et al.*, 2001; Vyskot y Hobza, 2004).

En muchas especies dioicas el sexo no es revelado sino hasta alcanzar la madurez, cuando aparecen las flores, lo cual puede tomar de meses a años. Este hecho ha generado un interés por desarrollar estrategias de identificación del sexo de plantas a través de marcadores moleculares donde las técnicas basadas en PCR han sido de gran utilidad y han sido explotadas para detectar diferencias entre plantas masculinas y femeninas a nivel molecular. En plantas existen varios marcadores moleculares ligados al sexo generados ya sea a través de estudios de mapeo genético (Spada *et al.*, 1998) o de investigaciones encaminadas a encontrar marcadores ligados al sexo de especies agrónomicamente importantes; por ejemplo, se han usado microsatélites para identificar diferencias específicas de sexo en papaya, *Carica papaya* (Parasnis *et al.*, 1999), AFLP para la identificación de marcadores ligados al sexo de *Dioscorea tokoro* (Terauchi y Kahl, 1999), de espárrago, *Asparagus officinalis* (Reamon-Büttner *et al.*, 1999) y patrones de bandas RAPD ligados al sexo de marihuana *Cannabis sativa* L. (Mandolino *et al.*, 2002), de álamo, *Salix viminalis* L. (Alstrom-Rapaport *et al.*, 1998) de *Atriplex garrettii* (Ruas *et al.*, 1998) y de *Silene latifolia* (Nakao *et al.*, 2002).

En especies como papaya y kiwi el diagnóstico del sexo puede realizarse desde estados tempranos de desarrollo de la planta gracias al diseño de iniciadores de PCR a partir de marcadores moleculares (Parasnis *et al.*, 2000; Deputy *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 1998).

Debido a la importancia económica, al sistema de determinación del sexo y a su genoma pequeño, *Carica papaya* ha sido una especie clave en el estudio de los cromosomas sexuales y su evolución. Con base en mapeo de alta densidad se ha encontrado un alto nivel de polimorfismo en una región genómica que rodea el locus del sexo, lo que sugiere una supresión de la recombinación y una tendencia al

proceso degenerativo del cromosoma Y de papaya en lo que pueden ser los primeros pasos en la evolución del cromosoma sexual (Liu *et al.*, 2004; Vyskot y Hobza, 2004).

En este artículo se reportan dos marcadores moleculares específicos para plantas masculinas de *Borojoa patinoi* C. obtenidos mediante AFLP y la aplicación de la técnica PCR con iniciadores diseñados a partir de la secuencia de uno de los marcadores. Esto permite determinar el sexo de las plantas en edad temprana y establecer cultivos comerciales eficientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN. Se colectaron hojas tiernas de 97 árboles de borjón con presencia de flores y frutos, 51 hembras y 46 machos en tres regiones diferentes de Colombia: La Virginia (Risaralda), Lloró (Chocó) y Sabaletas (Valle del Cauca). El tejido se mantuvo en frío durante el tiempo de muestreo y hasta llegar al laboratorio donde se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso. Las extracciones de ADN se realizaron por el método de Boiteaux *et al.* (1999), con pequeñas modificaciones, como sigue: se maceró el material vegetal con nitrógeno líquido, se incubaron 100 mg de cada muestra con 1,5 mL de buffer de extracción a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos, se completó el volumen a 2 mL con cloroformo: alcohol isoamílico 24 : 1 y se mezcló por inversión. Se repitió la extracción orgánica dos veces más. Se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo, se adicionaron 2/3 del volumen de isopropanol frío, se incubó durante 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó a

10000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 76 % y 10 mM de acetato de amonio; se dejó secar y se resuspendió en 200 μL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Se adicionaron 5 μL de RNasa A (10 mg/mL), se incubó durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se precipitó con 400 μL de etanol absoluto y 20 μL de acetato de sodio 3 M, se dejó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 200 μL de TE.

Análisis por AFLP. Se tomaron tres muestras masculinas y tres femeninas para evaluar las 64 posibles combinaciones de iniciadores contenidos en el estuche comercial "AFLP Analysis System I" (Invitrogen), siguiendo las instrucciones. Los productos de amplificación se observaron en geles de acrilamida al 6% y 7 M de úrea, teñidos con nitrato de plata usando el estuche comercial "Silver Sequence DNA Staining Reagents" (Promega).

Después de identificar los marcadores ligados al sexo, se analizaron 57 muestras (4 procedentes de La Virginia, 17 del Chocó y 36 de Sabaletas), de las cuales 30 eran hembras y 27 eran machos. Para esta evaluación por AFLP se prepararon muestras individuales y "bulks" a partir de los ADN por sexo para hacer un análisis tanto individual como de los dos grupos de ADN. Una vez evaluados y confirmados los marcadores con estas muestras, se repitió el procedimiento completo y por duplicado (desde la extracción de ADN) con otras 40 plantas de un muestreo doble ciego para evaluar la efectividad y confiabilidad de la técnica.



Figura 1. a) Flor femenina de borjón. b) Flor masculina de borjón. c) Fruto de borjón.

Caracterización del marcador y diseño de iniciadores. Se secuenciaron, tanto manualmente como a partir de productos clonados, tres fragmentos ligados al sexo de la combinación EAAC-MCAA. En ambos casos los fragmentos se aislaron a partir del gel de poliacrilamida seco adicionando 10 μ L de TE sobre las bandas, luego se cortaron con una cuchilla nueva y se trituraron sobre un portaobjetos, se incubaron en 30 μ L de TE por 5 minutos en agua hirviendo y se centrifugaron por 2 minutos a 8000 rpm. Se tomaron 5 μ L del sobrenadante para reamplificar los fragmentos. Para la secuenciación manual, el producto de reamplificación se corrió en un gel de acrilamida al 12% el cual se purificó siguiendo el mismo protocolo anterior. Con 10 μ L de este producto se obtuvo la secuencia parcial de un fragmento de aproximadamente 290 pb de longitud, usando el estuche comercial *Silver Sequence DNA Sequencing*. Para clonar fragmentos, el producto de reamplificación se purificó usando columnas Millipore®, de allí se tomaron 3 μ L para clonar en el vector pGEM-T del estuche comercial *pGEM-T Easy Vector* (Promega). Posteriormente se obtuvo la secuencia total del fragmento con el iniciador sentido pUC/M13 del estuche comercial *Silver Sequence DNA Sequencing*. Los resultados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% y 7 M de úrea, teñidos con nitrato de plata.

Con base en la información de la secuencia, y usando el programa Gene Runner, se diseñaron dos iniciadores específicos para la amplificación selectiva por reacción en cadena de la polimerasa de un marcador ligado al sexo en plantas de borjón.

RESULTADOS

Identificación de marcadores ligados al sexo. De las 64 combinaciones de iniciadores AFLP evaluadas por su potencial para servir como marcadores específicos de sexo, las combinaciones EAAC-MCAA y EACC-MCAT detectaron diferencias específicas entre machos y hembras de borjón. Dos de los fragmentos sólo aparecieron en el patrón de bandas de individuos machos, uno por cada combinación. La longitud aproximada de los fragmentos fue de 290 pb (figura 2). La presencia de los marcadores específicos para sexo masculino fue consistente en los dos grupos de ADN formados para machos y hembras; además, la técnica fue altamente reproducible ya que 40 muestras que fueron procesadas por duplicado arrojaron patrones de bandas iguales.

Dentro del grupo de muestras del estudio doble ciego, uno de los resultados de diagnóstico de sexo no fue consistente con la descripción fenotípica. Esto le confiere a la técnica de AFLP para el diagnóstico del sexo de *Borojoa patinoi* una sensibilidad de 94,7 % y una especificidad de 100%.

Secuenciación de marcador y diagnóstico de sexo por PCR. Se obtuvo una secuencia parcial de 210 nucleótidos a partir de secuenciación directa, y una secuencia total de 292 nucleótidos a partir de la secuenciación del fragmento clonado de la combinación E-AAC/M-CAA (figura 3). Con esta secuencia se llevó a cabo una búsqueda general de homología de secuencias en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) encontrándose alineamientos significativos con secuencias específicas del cromosoma X y Y de la planta dioica *Rumex acetosa*. Asimismo, a partir de esta secuencia se diseñaron los iniciadores BM1a y BM1b para PCR.

Una vez estandarizada la reacción de PCR, se amplificaron muestras de 56 plantas adultas y 74 plántulas del vivero de la Universidad Tecnológica de Pereira, cuyo sexo había sido determinado por AFLP. Se obtuvo una sola banda de la longitud esperada (173 pb) en las plantas masculinas y sólo una de las plantas adultas femeninas presentó una banda positiva para PCR (figura 4). Los ADN de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y morera (*Morus alba*) usados como control no presentaron bandas amplificadas.

DISCUSIÓN

En términos de sexo en especies dioicas, es a menudo beneficioso hacer selección sobre un género, como se hace por ejemplo en cultivos de espárrago, kiwi y papaya, en los cuales se prefieren los clones femeninos sobre los masculinos. Sin embargo, en muchas especies perennes es imposible determinar el sexo hasta que el organismo sea reproductivamente maduro, lo que puede tomar de 1 a 20 años de edad y, como reportan Alstrom-Rapaport *et al.* (1998), la incapacidad para determinar el sexo en estados tempranos puede crear problemas en esquemas de mejoramiento, en particular cuando se desea hacer selección de parentales superiores o cuando toda la progenie está compuesta de plantas de sexo desconocido.

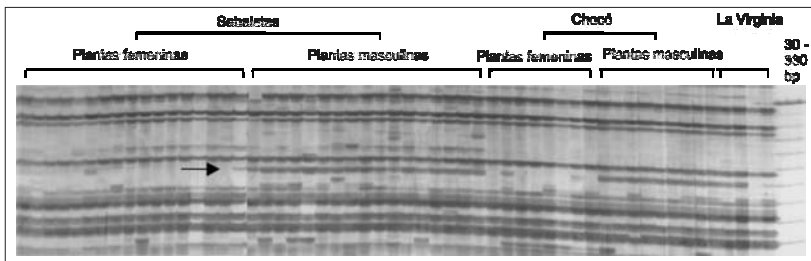


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 6% con el patrón AFLP para la combinación E-AAC/M-CAA. La flecha indica el fragmento presente sólo en plantas macho de borojó.

Una solución a esta condición ha sido el uso de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de sexo en plantas agrónomicamente importantes. En la actualidad se ha avanzado hacia el diseño de Regiones Amplificadas de Secuencia Caracterizada (SCARS) para hacer evaluaciones a gran escala, como lo reportan Gill *et al.* (1998) en kiwi (*Actinidia chinensis*), para identificar el sexo con propósitos de mejoramiento, y Parasnis *et al.* (2000) para identificar el sexo de plántulas de papaya (*Carica papaya*).

Aunque la utilización de técnicas moleculares represente un costo directo para agricultores o propietarios de viveros comerciales, en mayor proporción se pueden reducir costos indirectos como inversión de recursos y tiempo para el mantenimiento de plantas femeninas. Además, al momento de efectuar un trasplante en un cultivo podría mantenerse una relación deseada de hembras y machos. Después de 5 años de edad, una planta hembra de borojó produce 12 a 30 frutos por año, por tanto el incremento en el número de árboles que produzcan frutos por hectárea de tierra puede incrementar directamente la producción de frutos de borojó, haciendo el cultivo más rentable.

Los marcadores moleculares ligados al sexo en *B. patinoi* identificados en este estudio tienen una considerable aplicación práctica. La conversión de AFLP, una técnica costosa, en una mucho más barata como PCR, hace más fácil la aplicación de estos resultados para determinar el sexo de plantas de borojó en estados tempranos de desarrollo y a gran escala. Actualmente se está trabajando en la implementación de un protocolo de extracción de ADN en el que se

usen menos reactivos y materiales buscando la reducción de costos.

Asimismo, tienen una considerable aplicación a nivel de investigación básica porque serán el punto de partida para futuros estudios sobre la base genética del sexo, no sólo en esta especie sino en vegetales en general. La secuencia de 292 nucleótidos de uno de los marcadores presenta una

región de similitud en 30 nucleótidos con una secuencia específica de los cromosomas X y Y de la especie *Rumex acetosa* depositada en el GenBank. Nuestras futuras investigaciones tienen como objetivo clonar los marcadores para extender la secuencia y expresar el gen correspondiente en un vector adecuado que permitirá la caracterización de su posible función en las plantas masculinas.

CONCLUSIONES

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa desarrollada para identificar el sexo de plantas de borojó desde estados tempranos de su desarrollo, es una herramienta efectiva para planificar el cultivo de la fruta y conseguir un mayor rendimiento. Por otra parte, no se sabe si las técnicas tradicionales de manejo de los cultivos, que incluyen eliminación de plantas macho antes de su reproducción y propagación clonal de hembras, tienen algún efecto sobre la diversidad genética de la especie. Usando la PCR para identificar el sexo de las plantas, pueden establecerse cultivos con una relación machos : hembras que no



Figura 3. Gel de poliacrilamida al 6% con la secuencia obtenida a partir del fragmento E-AAC/M-CAA clonado en el vector pGEM-T.

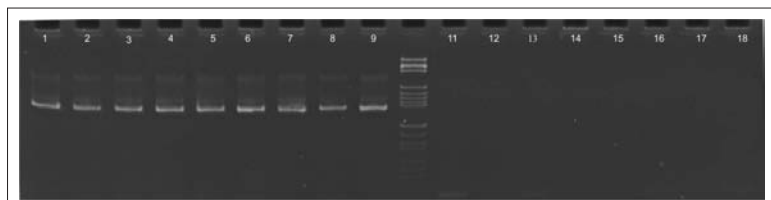


Figura 4. Gel de acrilamida al 12% con productos de amplificación de PCR usando los iniciadores BM1a y BM1b. Los carriles 1 a 9 contienen ADN de plantas macho. Los carriles 11 a 18 contienen ADN de plantas hembra.

afecte la diversidad genética del borjón y que represente ganancia económica para los productores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas"-Colciencias, y a la Universidad Tecnológica de Pereira por la financiación de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.; Lipman, D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ainsworth, Ch. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany.* 86: 211-221.
- Alstrom-Rapaport, C.; Lascoux, M.; Wang, Y.; Roberts, G.; Tuskan, G. 1998. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). *J. Hered.* 89: 44-49.
- Boiteaux, L.; Fonseca, M.; Simon, P. 1999. Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124(1): 32-38.
- Constantino, L.; Alzate, A.; Ospina, R. 2000. Inventario de recursos genéticos del Bajo Anchicayá, Pacífico vallecaucano. Fundación Herencia Verde. Santiago de Cali.
- Cuatrecasas, J. 1948. El borjón, un nuevo género de Rubiaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales.* VII (28).
- Deputy, J.; Ming, R.; Ma, H.; Liu, Z.; Fitch, M.; Wang, M.; Manshardt, R.; Stiles, J. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 107-111.
- Gentry, A. H. 1982. Phytogeography patterns as evidence for a Chocó refuge. P. 112-136. In G. T. Prance, ed., *Biological diversifications in the tropic.* Columbia University Press, New York, USA.
- Gentry, A.H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Ann. Missouri Botanical Garden.* 75: 1-34.
- Gill, G.; Harvey, R.; Gardner, R.; Fraser, L. 1998. Development of sex-linked PCR marker for gender identification in Actinidia. *Theor. Appl. Genet.* 97: 439-445.
- Liu, Z.; Moore, P.; Ma, H.; Ackerman, C.; Ragiba, M.; Yu, Q.; Pearl, H.; Kim, M.; Charlton, J.; Stiles, J.; Zee, F.; Paterson, A.; Ming, R. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature.* 427: 348-352.
- Mandolino, G.; Carboni, A.; Bagatta, M.; Moliterni, C.; Ranalli, P. 2002. Occurrence and frequency of putatively Y chromosome linked DNA markers in *Cannabis sativa* L. *Euphytica.* 126: 211-218.
- Mosquera, J.; Arenas, E. 1995. El borjón. Cultivo agroforestal del Chocó, fundamentos para el desarrollo sostenible. Codechocó.
- 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.
- Negrutiu, I.; Vyskot, B.; Barbacar, N.; Georgiev, S.; Moneger, F. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiol.* 127: 1418-1424.
- Parasnis, A.; Ramakrishna, W.; Chowdari, K.; Gupta, V.; Ranjekar, P. 1999. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1047-1052.
- Parasnis, A.; Gupta, V.; Tamhankar, S.; Ranjekar, P. 2000. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Mol. Breed.* 6: 337-344.
- Reamon-Buttner, S.; Schmidt, T.; Jung, C. 1999. AFLPs represent highly repetitive sequences in *Asparagus officinalis* L. *Chrom. Res.* 7: 297-304.
- Ruas, C.; Fairbanks, D.; Evans, P.; Stutz, H.; Andersen, W.; Ruas, P. 1998. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). *Amer. J. Botany.* 85: 162-167.
- Spada, A.; Caporali, E.; Marziani, G.; Portaluppi, P.; Restivo, F.; Tassi, F.; Falavigna. 1998. A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrate RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1083-1089.
- Terauchi, R.; Kahl, G. 1999. Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome.* 42: 752-762.
- Vyskot, B.; Hobza, R. 2004. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends Genet.* 20(9): 432-438.