

- García-Andrés, S., Monci, F., Navas-Castillo, J. y Moriones E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350: 433-442.
- Jeske, H., Lutgemeier, M. y Preiss, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. *EMBO J.* 20: 6158-6167.
- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. y Moriones, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303: 317-326.
- Morilla, G., Antunez, C., Bejarano, E. R., Janssen, D. y Cuadrado, I. M. 2003. A new *Tomato yellow leaf curl virus* strain in southern Spain. *Plant Dis.* 87: 1004.
- Moriones, E. y Navas-Castillo, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71: 123-134.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Saez-Alonso, E. y Moriones, E. (1997) First report of tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Dis.* 81: 1461.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Saez-Alonso, E. y Moriones, E. 1999. Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Dis.* 83: 29-32.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Noris, E., Louro, D., Accotto, G. P. y Moriones, E., 2000. Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus. *J Gen. Virol.* 81: 2797-2801.
- Noris, E., Hidalgo, E., Accotto, G. P. y Moriones, E. 1994. High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolates from the West Mediterranean Basin: the nucleotide sequence of an infectious clones from Spain. *Arch. Virol.* 135: 165-170.
- Padidam, M., Sawyer, S. y Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
- Reina, J., Morilla, G., Bejarano, E., Rodriguez, M. y Janssen, D. 1999. First report of *Capsicum annuum* plants infected by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Dis.* 83: 1176.
- Rybicki, E. P. 1994. A phylogenetic evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Arch. Virol.* 139: 49-77.
- Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Monci, F., Bejarano, E. R., Reina, J., Navas-Castillo, J., Aranda, M. A. y Moriones, E. 2002. High genetic stability of the begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in southern Spain over an 8-year period. *Phytopathology* 92: 842-849.
- Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Díaz, J. A. y Moriones, E. 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89: 1038-1043.

■ Tesis y proyectos ■

Evolución de los sistemas reproductivos y de los mecanismos de determinación sexual en el género *Rumex* (Polygonaceae)

Tesis Doctoral Europea presentada por Rafael Navajas Pérez el día 15 de diciembre de 2005 en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, dirigida por los Doctores Manuel Ángel Garrido Ramos y Manuel Ruíz Rejón.

beSEG 21: 6

Introducción

Los estudios acerca del origen y la evolución de la separación de sexos (condición conocida como dioecia en plantas) y de los cromosomas sexuales, son dos aspectos que tradicionalmente han centrado la atención de la Biología Evolutiva. La mayoría de las especies vegetales son hermafroditas, siendo dioicas tan solo un 7% 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.*, 2003) 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, se ha determinado que 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 monocotiledoneas, donde parece que la ginodioecia es un estadio intermedio mas 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. Ruíz Rejón, 2004), aunque en un número muy reducido de especies (quizá, tan sólo en una docena de ellas). El caso más extendido es la presencia de sistemas XX/XY con un sistema de control genético del sexo basado en la presencia de un cromosoma Y activo. Sin embargo, han sido descritas otras alternativas, tales como especies con sistemas cromosómicos complejos y/o con sistemas de control genético basado en el balance entre juegos autosómicos y cromosomas X (cf. Ruíz Rejón, 2004).

La presencia de cromosomas sexuales heteromórficos está ampliamente extendida en animales, viniendo las principales teorías de su origen y evolución del análisis de los cromosomas X e Y humanos fundamentalmente (Ali y Hasnain, 2002; 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). Para rellenar dicha laguna, en la actualidad se están investigando nuevos sistemas en etapas más tempranas del proceso evolutivo, como son los de peces (Volf y Scharf, 2001; Phillips *et al.*, 2005) y particularmente los de plantas (Charlesworth, 2002), así como los sistemas de neoformación de cromosomas sexuales como el de *Drosophila miranda* (Bachtrog y Charlesworth, 2002), convirtiéndose algunas de estas especies en nuevos modelos interesantes para comprobar dichas hipótesis.

Finalmente, 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 (Negruțiu *et al.*, 2001; Charlesworth, 2002).

Nosotros en este trabajo hemos utilizado como material de estudio distintas especies del género *Rumex* (Polygonaceae). Este grupo de plantas es especialmente interesante porque incluye especies estrechamente emparentadas con sistemas reproductivos muy diversos (hermafroditismo, poligamia, ginodioecia, monoecia, dioecia). Asimismo, presenta especies dioicas con sistemas de cromosomas sexuales en distintos estadios evolutivos, esto es, sin cromosomas sexuales diferenciados, con cromosomas sexuales heteromórficos (XX/XY), con sistemas múltiples de cromosomas sexuales (XX/XY1Y2). Por estas razones, creemos que se trata de un modelo ideal para el estudio del origen y la evolución de los cromosomas sexuales y de la dioecia, con la posibilidad de acceder a estadios intermedios e incipientes del proceso de diferenciación.

Objetivos

La finalidad de la investigación llevada a cabo y puesta en este Resumen es la de contribuir al conocimiento de los sistemas reproductivos vegetales utilizando como material de estudio las distintas especies del género *Rumex*, que como hemos detallado anteriormente suponen un singular modelo de estudio por sus especiales características. Por ello, nos hemos propuesto analizar el proceso que ha seguido la evolución de los sistemas reproductivos, la evolución de los sistemas de determinación sexual y el origen y la evolución de los cromosomas

sexuales en este género. Concretamente, en esta Tesis hemos pretendido 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*, por un lado con fines filogenéticos, y por otro, con el fin de analizar su origen y evolución y utilizarlas como marcadores moleculares del proceso evolutivo de formación y degeneración de los cromosomas sexuales de plantas y de la evolución de la dioecia.

Tercero Iniciar la caracterización citogenética de las especies de *Rumex* con diferentes sistemas de determinación sexual y analizar el patrón evolutivo de sus cromosomas sexuales.

Material y Métodos

En este trabajo hemos analizado un total de 31 especies pertenecientes al género *Rumex*, representantes en su conjunto de todos los sistemas de determinación sexual y todos los niveles cromosómicos existentes en el grupo, así como representantes de todas y cada una de las secciones de cada uno de los cuatro subgéneros en los que se divide el género *Rumex* (ver [16]Tabla 1). Asimismo, hemos utilizado la especie *Fallopia convolvulus* también perteneciente a la familia Polygonaceae, como grupo externo. Mediante experiencias de PCR y empleando cebadores universales (White *et al.*, 1990; Taberlet *et al.*, 1991) hemos aislado y caracterizado los espaciadores intergenéticos de genes ribosómicos (ITS1 e ITS2) como marcadores nucleares, y el intrón del gen cloroplastidial trnL y el espaciador intergénico existente entre este gen y el trnF, como marcadores citoplasmáticos. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para análisis filogenéticos considerando tres criterios de optimización; neighbor-joining (NJ), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML), implementados por los softwares Mega vs2.1 (Kumar *et al.*, 2001) y PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998).

Por otra parte, hemos caracterizado cuatro familias de ADN satélite presentes en distintas especies del género con el objetivo de analizar su evolución y sobre todo, el papel que juegan en la evolución de los cromosomas sexuales.

Por un lado, hemos aislado distintas secuencias monoméricas procedentes de los citados ADNs satélite mediante PCR, utilizando cebadores diseñados específicamente (Shibata *et al.*, 1999a, 1999b, 2000) y hemos llevado a cabo un estudio comparativo del patrón evolutivo de las mismas (incluyendo tasas de mutación y evolución concertada) empleando los softwares Mega vs2.1 (Kumar *et al.*, 2001), DNAsp (Rozas y Rozas, 1999) y satDNA (datos propios).

Adicionalmente, hemos analizado con fines cladísticos la distribución de cada una de estas familias de ADN satélite en el conjunto de especies estudiadas, por medio de técnicas de hibridación tipo Southern-blot (ver Garrido-Ramos *et al.*, 1999) e hibridación *in situ* (ver Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000).

Para completar este análisis, hemos llevado a cabo la caracterización citogenética exhaustiva de distintas especies representativas del género, tanto en mitosis como en meiosis (incluyendo el estudio de los complejos sinaptonémicos), empleando técnicas de tinción convencionales y de fluorescencia (ver Cunado y Santos, 1998, Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000).

Resultados y Discusión

Una nueva clasificación del género *Rumex* basada en caracteres moleculares y sus implicaciones evolutivas

Según la actual clasificación del género *Rumex*, basada fundamentalmente en criterios morfológicos, el género se divide en cuatro subgéneros que incluyen especies hermafroditas, polígamas, ginodioicas, monoicas y dioicas. De la distribución de las especies dioicas en distintas secciones y/o subgéneros, cosa que apoya esta sistemática, se deduciría que la aparición de la dioecia y de los distintos sistemas de determinación sexual ha ocurrido varias veces a lo largo de la evolución del género. En contra de esta visión, la nueva filogenia molecular que nosotros hemos obtenido, demuestra un origen común para todas las especies dioicas de Eurasia y América hace entre 15 y 16 millones de años (Figura 1). Nuestra nueva sistemática además, apoya que entre el hermafroditismo y la dioecia existiría un estadio intermedio correspondiente a la ginodioecia. Así, todas las especies polígamas y ginodioicas de Eurasia y África se agrupan en un clado monofilético que parece evolucionar hacia la dioecia como lo demuestra la presencia de la especie *Rumex sagittatus*, una especie dioica incipiente sin cromosomas sexuales diferenciados (Figura 1). Las especies dioicas presentan sistemas de cromosomas sexuales en distintos estadios evolutivos, simples (XX/XY) y complejos (XX/XY1Y2) y distintos sistemas de control genético del sexo. Nuestros resultados demuestran por primera vez la idea, hasta ahora basada en datos teóricos, de que los sistemas de control genético del sexo basados en el balance entre juegos autosómicos y cromosomas X (X/A) son más recientes y derivados de los basados 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, una vez en América y otra vez en Eurasia. 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 con $x=9$.

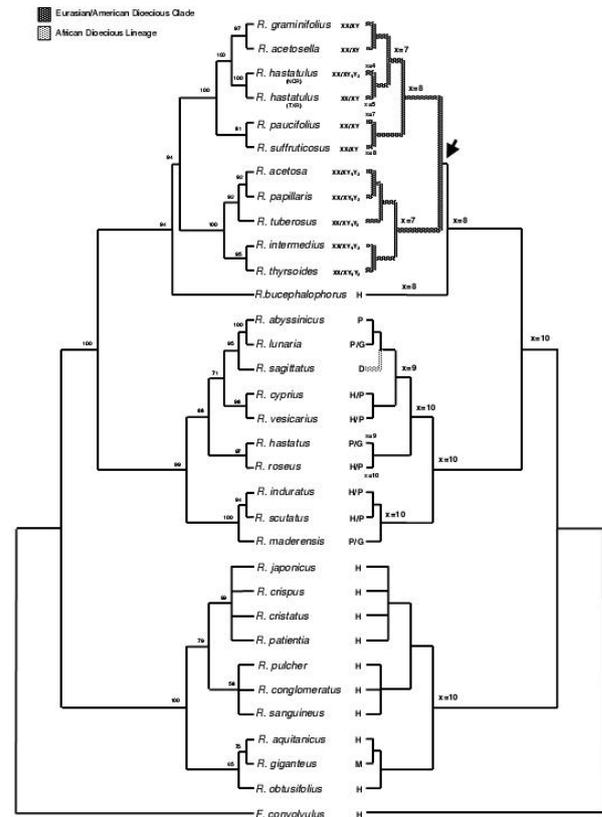


Figura 1. Árbol resumen de la filogenia molecular de *Rumex* (Izqda.) Árbol construido según el criterio de máxima verosimilitud combinando las secuencias nucleares y cloroplastidiales analizadas en esta Memoria (Dcha.) Árbol mostrando la correlación entre la filogenia y la evolución de los sistemas reproductivos (D: dioecia, G: ginodioecia, H: hermafroditismo, M: monoecia P: poligamia) y de los números cromosómicos básicos (tomado de Navajas-Perez *et al.*, 2005b).

Por último esta filogenia tiene consecuencias importantes desde el punto de vista de la clasificación taxonómica actual del grupo, para la cual proponemos una revisión. En líneas generales, proponemos la inclusión de todas las especies dioicas euroasiáticas y americanas en un único grupo, que a su vez estaría dividido en dos subgrupos considerando especies con sistemas simples (XX/XY) o complejos (XX/XY1Y2). Otros dos grupos estarían formados por las especies ginodioicas, polígamas y hermafroditas con $x=8$ y $x=9$, y las especies hermafroditas estrictas con $x=10$ del subgénero *Rumex*, respectivamente.

Estudio de cuatro familias de ADN satélite en el género *Rumex*: implicaciones evolutivas y cladísticas

En este trabajo, hemos caracterizado cuatro familias de ADN satélite presentes en el género *Rumex*. Tres de ellas se han aislado inicialmente de la especie dioica *Rumex acetosa* (XX/XY1Y2). Dos, la familia RAE180 y la familia RAYSI, representan los principales constituyentes de la heterocromatina de los cromosomas Y. La otra, la familia RAE730, se encuentra acumulada en segmentos heterocromáticos en la pareja autosómica VI. Mediante un estudio del estatus de presencia/ausencia, nosotros hemos utilizado estos satélites como marcadores cladísticos.

ticos. En concreto, la familia RAE180 es compartida por todas las especies dioicas, tanto con sistemas cromosómicos simples como complejos (Figura 2A). Este ADN satélite es interesante ya que en las especies euroasiáticas con sistemas múltiples se encuentra adicionalmente en autosomas, aparte de en cromosomas Y, mientras que en la especie *Rumex suffruticosus*, representante de las especies XX/XY, solo presenta localización autosómica. Esto podría indicar un origen muy antiguo de esta secuencia. Por su parte, las familias RAYSI y RAE730 están presentes solo en el genoma de las especies dioicas euroasiáticas con sistemas cromosómicos múltiples (XX/XY1Y2) (Figura 2B y 2C). Asimismo, hemos analizado por primera vez la familia de ADN satélite RUSI, localizada en regiones subtelo méricas y pericentroméricas que se encuentra acumulada específicamente en las especies estrechamente emparentadas *R. scutatus* y *R. induratus*, ambas hermafroditas (Figura 2). Todos estos datos confirman la filogenia que previamente habíamos obtenido.

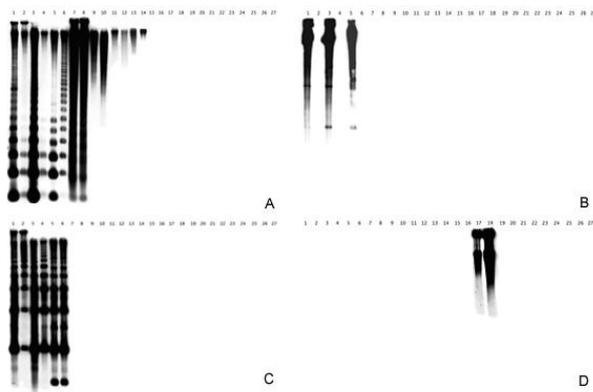


Figura 2. Hibridación tipo Southern-blot sobre ADN genómico de distintas especies del género *Rumex*: (1-2) m.f. *R. acetosa*, (3-4) m.f. *R. papillaris*, (5-6) m.f. *R. intermedius*, (7-8) m.f. *R. suffruticosus*, (9-10) m.f. *R. acetosella*, (11-12, 13-14) m.f. *R. hastatulus* (razas de Texas y North Carolina), (15) *R. bucephalophorus*, (16) *R. maderensis*, (17) *R. scutatus*, (18) *R. induratus*, (19) *R. lunaria*, (20-21) m.f. *R. sagittatus*, (22) *R. roseus*, (23) *R. crispus*, (24)(25) *R. conglomeratus*, (26) *R. obtusifolius* y (27) *R. patientia*, empleando como sonda la unidad monomérica de repetición del: A) satélite RAE180, B) satélite RAYSI, C) satélite RAE730 y D) satélite RUSI.

A continuación, hemos analizado la secuencia de estas familias de ADN satélite, para comprender como 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. Esto pone de manifiesto en cierta medida, la relación evolutiva entre los cromosomas sexuales de *Rumex* y de los segmentos heterocromáticos, dos regiones muy particulares del genoma. Las otras dos familias no han mostrado relación de parentesco entre si, ni con RAYSI ni con RAE730.

Pero, además, la comparación de las secuencias de estos ADNs satélite entre especies emparentadas, nos ha permitido analizar la dinámica evolutiva de los mismos. Así, hemos establecido que las familias de ADN satélite relacionadas con los cromosomas Y, que no recombinan entre si, RAE180 y RAYSI, presentan unas tasas de cam-

bio y de evolución concertada con valores que son aproximadamente la mitad de los que presenta otro satélite distribuido en un locus autosómico, RAE730. Es destacable que RAYSI (exclusiva de cromosomas Y) y RAE730 (exclusiva de autosomas), 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 como esto afecta a la dinámica evolutiva de los ADNs que portan. Se presentan hipótesis evolutivas de como ha ocurrido el proceso de aparición y expansión de dichas subfamilias de ADN satélite.

Caracterización citogenética de algunas especies interesantes del género *Rumex*, haciendo especial énfasis en los distintos sistemas de cromosomas sexuales

Por último, hemos analizado citogenéticamente 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/XY1Y2. 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 homologa, 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 (Figura 3). 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 (Figura 4). Por otro lado, hemos analizado especies como *R. acetosella* y *R. suffruticosus*, con sistemas de cromosomas sexuales simples, XX/XY. 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 homologa 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.

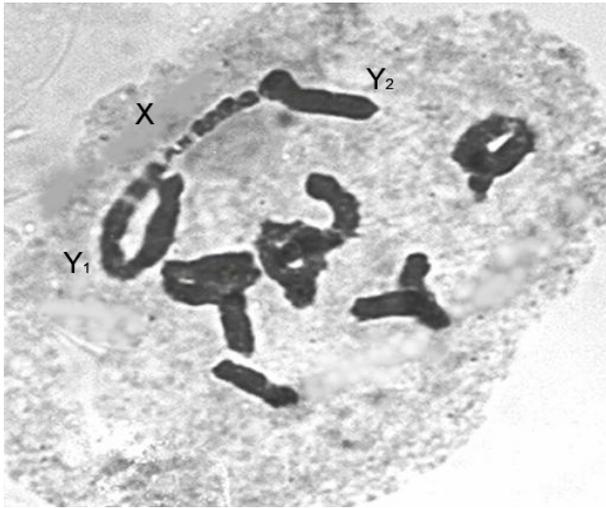


Figura 3. Diplotene de un macho de *R. acetosa*, donde se aprecia la formación del trivalente sexual.

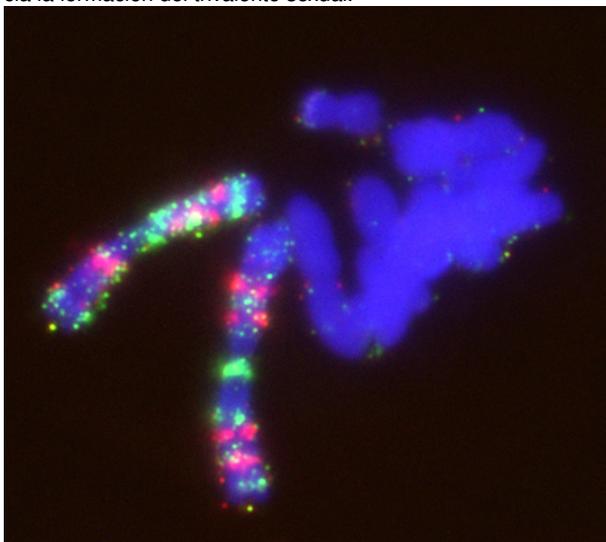


Figura 4. Hibridación *in situ* fluorescente doble usando como sondas las unidades de repetición RAE180 (verde) y RAYS1 (rojo) sobre cromosomas metafásicos de *R. papillaris*.

Esta Tesis Doctoral, abre la interesante perspectiva, por otro lado, de estudiar posibles especies dioicas sin cromosomas sexuales diferenciados, que podrían suponer una etapa aún más incipiente del proceso evolutivo de formación de cromosomas sexuales.

Bibliografía citada en este Resumen

- Ali, S. Hasnain, S.E. (2002). Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene* 283(1-2):1-10.
- Bachtrog, D. y Charlesworth, B. (2002). Reduced adaptation of a non-recombining neo-Y chromosome. *Nature* 416:323-326.
- Charlesworth, D. (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88:94-101.
- Desfeux, C., Maurice, S., Henry, J.P., Lejeune, B. y Gouyon, P.H. (1996). Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc. R Soc. Lond. B* 263:409-414.
- Garrido-Ramos MA, de la Herran R, Ruiz Rejon M, Ruiz Rejon C (1999) A subtelomeric satellite DNA family isolated from the genome of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome* 42:442-446.
- Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B. & Nei, M. (2001). MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

- Moore, R.C. (2004). Autosomes behaving badly. *Heredity* 93(2):126-127.
- Negruțiu, I., Vyskot, B., Barbacar, N., Georgiev, S. y Moneger, F. (2001). Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* 127:1418-1424.
- Phillips, R.B., Morasch, M.R., Park, L.K., Naish, K.A. y Devlin, R.H. (2005). Identification of the sex chromosome pair in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): lack of conservation of the sex linkage group with chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Genome Res.* 111(2):166-170.
- Renner, S.S. y Won, H. (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.
- Ross, M.T., Grafham, D.V., Coffey, A.J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, C., Bird, C.P., Frankish, A., Lovell, F.L., Howe, K.L., Ashurst, J.L., Fulton, R.S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M.C., Hurler, M.E., Andrews, T.D., *et al.* (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434:325-337.
- Rozas, J. & Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.
- Ruiz-Rejon, M. (2004) Sex chromosomes in plants. In: *Encyclopedia of plant and crop science*. Vol IV, Dekker Agropedia. Marcel Dekker, New York, pp 1148-1151.
- Schwarzach, T., Heslop-Harrison, J.S. (2000). *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK. Sinters, A.E. y Soltis, D.E. (2003). Phylogenetic relationship in *Ribes* (Grossulariaceae) inferred from ITS sequence data. *Taxon* 52:51-66.
- 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.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.P., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Rozen, S. y Page, D.C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825-837.
- 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.
- Vamosi, J.C., Otto, S.P. y Barrett, S.C. (2003). Phylogenetic analysis of the ecological correlates of dioecy in angiosperms. *J Evol Biol.* 16(5):1006-1018.
- Volf, J.N. y Scharlt, M. (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111(1-3):101-110.
- Weiblen, G.D., Oyama, R.K. y Donoghue, M.J. (2000). Phylogenetic analysis of dioecy in monocotyledons. *Am. Nat.* 155:46-58.
- 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.

Publicaciones generadas por esta Tesis Doctoral

- Navajas-Perez, R., de la Herran, R., Gonzalez Lopez, G., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz-Rejon, C., Ruiz-Rejon, 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-Perez, R., de la Herran, R., Jamilena, M., Loza-

no, R., Ruiz-Rejon, C., Ruiz-Rejon, 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. (artículo comentado en Faculty of 1000 Biology)

- Navajas-Perez, R., Schwarzacher, T, de la Herran, R., Ruiz-Rejon, C., Ruiz-Rejon, M y 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)doi:10.1016/j.gene.2005.10.013.

Más información en <http://www.ugr.es/~rnavajas>