



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**DETECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA  
ANDROESTERILIDAD GÉNICA EN *CYNARA CARDUNCULUS* L.**

**Lic. ALDANA ZAYAS**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS**

**DIRECTORA: Dra. VANINA CRAVERO**

**CO- DIRECTORA: Dra. EUGENIA MARTIN**

**2020**

**DETECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA ANDROESTERILIDAD  
GÉNICA EN *CYNARA CARDUNCULUS* L.**

Aldana Zayas

Licenciada en Genética – Universidad de Morón

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias (IICAR-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias UNR, durante el período comprendido entre abril de 2015 y septiembre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Vanina Cravero y la co-dirección de la Dra. Eugenia Martin.

Nombre y firma del Doctorando: Lic. Aldana Zayas

Nombre y firma de la Directora: Dra. Vanina Cravero

Nombre y firma de la Co-Directora: Dra. Eugenia Martin

Defendida:.....de 20\_\_.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Vanina Cravero, mi directora, por brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado en su grupo de investigación, guiarme y asistirme con sus conocimientos en el desarrollo de la presente tesis. A mi codirectora, la Dra. Eugenia Martin, por su empatía, compañerismo, por confiar en mí e incentivarme constantemente a perfeccionarme en mi profesión.

Al Dr. Fernando López Anido por su buena predisposición para colaborar y enseñarme en cuanto a las tareas a campo. A la Dra. Marta Bianchi, por su calidez y contención tanto en el ámbito profesional como humano.

Ai Professori Sergio Lanteri ed Ezio Portis, per avermi dato la possibilità di fare il periodo di stage nel DISAFA. A Cinzia, Alberto e Matteo per la grande disponibilità e per tutto quanto hanno fatto per me durante il periodo di stage.

A los integrantes de la Cátedra de Física de la Fac. de Ciencias Agrarias (UNR) por abrirme las puertas a la docencia y acompañarme en el desarrollo de mi tesis doctoral.

A todos mis compañeros de la Sala de Posgrado: Tatiana, Mechi, Flor Moresco, Flor Pozzi, Melisa, Dana, Ana Paula, Lucía, Vladimir, Federico, por todas las sugerencias, aportes y el grato ambiente de trabajo compartido diariamente.

A mi familia y a mis seres queridos especialmente, por acompañarme y ser un sostén incondicional en cada una de las etapas de mi vida.

A mis amigos del colegio, de la facultad, de la vida, a mis "Plumerillos"...a todos muchísimas gracias por ser parte de mi vida y compartir este momento conmigo.

## **DEDICATORIA**

**A mis abuelos, Lia y Dardo...**

## TRABAJOS PUBLICADOS

- Zayas, Aldana; Martin, Eugenia; Bianchi, Marta; López Anido, Fernando; Cravero, Vanina. "Elucidating the genetic male sterility in *Cynara cardunculus* L. through a BSA approach. Identification of associated molecular markers." *Euphytica* (2020) 216: 8. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2531-1>

## PRESENTACIONES A JORNADAS Y CONGRESOS

- Zayas, Aldana; Martin, Eugenia; Bianchi, Marta; López Anido, Fernando; Cravero, Vanina. (2019) "Cuantificación y análisis de viabilidad de granos de polen en plantas fértiles y androestériles de *Cynara cardunculus* L. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de Sociedad de Biología de Rosario 2019. Rosario, Argentina
- Zayas, Aldana; Cravero, Vanina; Martin, Eugenia. (2018) "Characterization of SRAP sequence associated to agronomic traits in globe artichoke." XXII International Congress of Genetics. Foz do Iguaçu, Brasil.
- Zayas, Aldana; Martin, Eugenia, Cravero, Vanina. (2017) "Herramientas biotecnológicas aplicadas al mejoramiento de *Cynara cardunculus* L." XXXV Reunión científica anual Sociedad de Biología de Cuyo (disertante). Merlo, Argentina.
- Zayas, Aldana; López Anido, Fernando; Martin, Eugenia; Cravero, Vanina. (2017) "Desarrollo de una población segregante para el carácter androesterilidad en *Cynara cardunculus* L." XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario 2017. Zavalla, Argentina.
- Zayas, Aldana; Bianchi, Marta; Martin, Eugenia; Cravero, Vanina. (2017) "Cuantificación de granos de polen en plantas fértiles y androestériles de *Cynara cardunculus* L." II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2017. Casilda, Argentina.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	i
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	1
1. Género <i>Cynara</i> .....	1
1.1. <i>Cynara cardunculus</i> L.....	1
1.1.1 El cardo silvestre .....	3
1.1.2 El cardo cultivado .....	4
1.1.3 El alcaucil .....	5
1.2. Usos e importancia económica de <i>Cynara cardunculus</i> .....	6
1.3. Características botánicas .....	7
2. Vigor híbrido o Heterosis .....	8
3. Androesterilidad .....	9
4. Marcadores moleculares .....	12
4.1. Marcadores moleculares microsatélites (SSR).....	14
4.2. Marcadores moleculares de tipo SRAP (Polimorfismo Amplificado de Secuencias Relacionadas).....	14
5. Análisis de segregantes agrupados (BSA) .....	16
6. Clonación de ADN .....	18
7. Secuenciación de ADN.....	19
HIPÓTESIS .....	21

<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO I: Desarrollo y caracterización fenotípica de una población segregante para el carácter androesterilidad .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>24</b>
<b>1. Materiales y métodos.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Desarrollo de una población segregante para el carácter androesterilidad .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2. Evaluación fenotípica a campo.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3. Conteo de granos de polen por flor .....</b>	<b>28</b>
<b>1.4. Análisis de la viabilidad de los granos de polen .....</b>	<b>30</b>
<b>2. Resultados .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Desarrollo de una población segregante.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2. Identificación fenotípica de individuos fértiles y androestériles en la población F<sub>2</sub> .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO II: Identificación de marcadores moleculares asociados al carácter androesterilidad .....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>37</b>
<b>1. Materiales y métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>1.1. Extracción de ADN.....</b>	<b>38</b>
<b>1.2. Marcadores moleculares de tipo SSR.....</b>	<b>38</b>
<b>1.3. Marcadores moleculares de tipo SRAP .....</b>	<b>39</b>
<b>1.4. Registro (<i>scoring</i>) y análisis de segregación de los marcadores SRAP ....</b>	<b>40</b>
<b>1.5. Identificación de las secuencias de interés.....</b>	<b>41</b>

<b>2. Resultados .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1. Marcadores moleculares SSR.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2. Marcadores moleculares SRAP .....</b>	<b>44</b>
<b>2.3. Secuenciación y análisis de secuencias .....</b>	<b>48</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>86</b>



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**%:** Por ciento.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AFLP:** *Amplified Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados-.

**BSA:** *Bulked Segregant Analysis* – Análisis de segregantes agrupados-.

**CAPS:** *Cleaved Amplify Polimorphic Sequences*- Secuencia polimórfica amplificada y cortada-.

**dNTP:** Desoxirribonucleótido trifosfato.

**FAO:** *Food and Agriculture Organization* - Organización para la Alimentación y la Agricultura-.

**ha:** Hectárea.

**m:** Metro

**MAS:** *Marker Assisted Selection* - Selección asistida por marcadores-.

**MS:** plantas androestériles, sin liberación de polen.

**ORF:** *Open Reading Frame* - Marco abierto de lectura-.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* -Reacción en cadena de la polimerasa-.

**PF:** plantas fértiles con producción abundante de polen.

**PP:** plantas poco polen con producción reducida de polen.

**QTLs:** *Quantitative Trait Loci* - Locus de un carácter cuantitativo-.

**RAPD:** *Random Amplification of Polymorphic DNA*- Fragmentos polimórficos amplificados al azar-.

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción-.

**SCAR:** *Sequence Characterized Amplified Regions*- Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas-.

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*- Polimorfismo de nucleótido único-.

**SRAP:** *Sequence Related Amplified Polymorphism* –Polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas-.

**SSR:** *Simple Sequence Repeat Polymorphism* -microsatélite-.

**STS:** *Sequence Tagged Site*- Sitios con marca de secuencia-.

**t:** tonelada

## RESUMEN

La especie *Cynara cardunculus* L., perteneciente a la familia *Asteraceae*, incluye tres variedades botánicas, completamente inter-fértiles: *scolymus* (alcaucil), *altilis* (cardo cultivado) y *sylvestris* (cardo silvestre). La producción de alcaucil fue tradicionalmente llevada a cabo mediante propagación vegetativa por medio de hijuelos. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una tendencia a la utilización de cultivares propagados mediante semilla, dado que muestran buenos rendimientos y no presentan los problemas fitosanitarios propios de la propagación vegetativa. En este contexto, la producción de semillas híbridas resulta de interés ya que permite explotar el fenómeno de heterosis generando materiales de elevados rendimientos. La emasculación manual es una práctica extremadamente difícil, por lo tanto, es esencial contar con un sistema de androesterilidad que permita una producción eficiente de híbridos. En el género, *Cynara*, sólo se han reportado casos de androesterilidad de tipo génica en el alcaucil; sin embargo, las bases de este fenómeno no han sido establecidas. El objetivo del presente proyecto de tesis fue dilucidar la herencia de la androesterilidad en *Cynara cardunculus* L. combinando la tecnología SRAP (*Sequence related amplified polymorphism*) y la estrategia de análisis de segregantes agrupados (BSA) con el fin de identificar marcadores moleculares asociados al gen *ms*, factibles de ser aplicados en programas de mejoramiento de la especie. Se desarrolló una población segregante para el carácter a partir de un progenitor alcaucil androestéril y un cardo cultivado como progenitor fértil. En la población  $F_2$  estudiada, la segregación del gen se ajustó al modelo de segregación monogénico (3:1), revelando que un único gen (*ms*) en estado de homocigosis recesiva determina la condición de androestéril en esta población. Se encontraron tres marcadores SRAP asociados al gen *ms*. El marcador más cercano (SRAP 7-10.1774) fue estimado a una distancia de 0,5 cM del gen *ms* mientras que los otros (SRAP 4-9-332 y SRAP 4-9.700), a 4,3 cM y 13,9 cM, respectivamente

**ABSTRACT**

*Cynara cardunculus* L., member of the *Asteraceae* family, includes three botanical varieties, fully-inter-fertile: *scolymus* (globe artichoke), *atilis* (cultivated cardoon) and *sylvestris* (wild cardoon). The artichoke production was traditionally carried out through vegetative propagation using offshoots or suckers. However, several new seed propagated cultivars have been developed in recent years, which showed high yield and ruled out phytosanitary problems inherent to vegetative propagation. In this context, hybrid seeds production, which exploits the heterosis phenomenon producing high performance plants, is of global interest. Manual emasculation is extremely difficult; therefore, it is essential to have a male-sterility system to achieve an efficient hybrids production. In *Cynara* genus, genic male sterility was reported only in globe artichoke but the genetic bases of this phenomenon are poorly explored. The objective of this work was to elucidate the inheritance of genetic male sterility in *Cynara cardunculus* L. combining SRAP technology and a BSA approach and to identify molecular markers associated to ms genes, feasible to be applied for MAS in breeding. Segregation of the male sterility in our F<sub>2</sub> population fit to a monogenic segregation model (3:1), revealing that only one gene (ms) is responsible, in homozygous recessive stage, to determine male sterile plants. Three SRAP markers linked to the ms gene were found. The nearest marker (SRAP 7-10.1774) was estimated to be 0.5 cM from the ms gene whereas the others (SRAP 4-9.332 and SRAP 4-9.700) were linked at 4.3 cM and 13.9 cM, respectively.

## INTRODUCCIÓN

### 1. El género *Cynara*

El género *Cynara* perteneciente a la familia de las *Asteraceas* (*Compositae*) (Winklund, 1992), con origen en la región mediterránea, comprende ocho especies y cuatro subespecies. La especie *C. cardunculus* L., la cual es la más importante desde el punto de vista económico, incluye tres variedades botánicas: *scolymus* (alcaucil o alcachofa), *altilis* (cardo cultivado) y *sylvestris* (cardo silvestre). Este último es reconocido como el progenitor silvestre de ambas formas cultivadas de la especie (Rottenberg *et al.*, 1996; Lanteri *et al.*, 2001).

Las diversas formas de *C. cardunculus*, cultivadas y silvestres, son interfértiles y los híbridos generados entre ellas son viables y fértiles (Basnizki y Zohary, 1994). Sin embargo, existen fuertes barreras reproductivas que impiden la polinización cruzada entre estas variedades y las otras especies silvestres del género *Cynara* (Rottenberg y Zohary, 2005). Los cruzamientos de *C. cardunculus* con *C. syriaca*, *C. algarbiensis*, *C. baetica* y *C. humillis*, producen pocas semillas y los híbridos resultantes manifiestan usualmente esterilidad. De esta manera, quedan determinados dos complejos génicos.

El complejo génico primario está constituido por el cardo silvestre (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*) y las dos formas cultivadas: *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (alcaucil o alcachofa) y *Cynara cardunculus* var. *altilis* (cardo comestible). El complejo génico secundario incluye sólo especies silvestres: *C. syriaca* Boisser, *C. cornígera* Lindley, *C. cirenaica* Maire y Weiller, *C. algarbiensis* Coss. ExMariz, *C. baetica* (Spreng.) Pau y *C. humilis* L., las que, como se mencionó, presentan cierto grado de aislamiento reproductivo con las especies del complejo génico primario (Rottenberg y Zohary, 2005).

#### 1.1. *Cynara cardunculus* L.

Tanto las consideraciones fenotípicas (Foury, 1987), como las inferencias basadas en estudios isoenzimáticos (Rottenberg *et al.*, 1996) y marcadores basados en ADN (Lanteri *et al.*, 2004a; Acquadro *et al.*, 2005a; Cravero *et al.*, 2007) corroboran que el alcaucil y el cardo

cultivado están genéticamente relacionados con el cardo silvestre y que las tres variedades botánicas conforman una única especie, *Cynara cardunculus* (Sonnante *et al.*, 2007). Por otra parte, estudios de ADN (Lanteri *et al.*, 2004a; Acquadro *et al.*, 2005a), citogenéticos y basados en isoenzimas (Rottenberg *et al.*, 1996) han confirmado que el cardo silvestre es el ancestro común de ambas formas cultivadas (Sonnante *et al.*, 2007). A partir del cardo silvestre, mediante un proceso de selección divergente, uno para características foliares y otro para características relacionadas con el capítulo, habrían surgido el cardo comestible y el alcaucil, respectivamente (Lanteri *et al.*, 2004a; Portis *et al.*, 2005a). Barbieri (1959) sugirió que los tipos no espinosos de alcaucil evolucionaron a partir de los tipos espinosos, sin embargo, la alta diferenciación genética detectada entre los tipos espinosos y sin espinas no excluye la posibilidad de eventos de domesticación separados (Lanteri *et al.*, 2004b).

*C. cardunculus* es una especie diploide ( $2n=2x=34$ ) con un tamaño medio del genoma estimado por citometría de flujo en 1,07Gb (Marie y Brown, 1993). En el primer y único genoma ensamblado y publicado de la especie ([www.artichokegenome.unito.it](http://www.artichokegenome.unito.it)), en el año 2016, se estimó un tamaño de 1084Mb; siendo cercano al estimado por citometría de flujo. Dentro de las compuestas, también fueron publicados durante el año 2017, los genomas completos *Lactuca sativa* L (lechuga, <http://lgr.genomecenter.ucdavis.edu>; Genome Project ID: PRJNA68025) y *Helianthus annuus* L (girasol, <http://www.sunflowergenome.org>; Genome Project ID: PRJNA64989), con tamaños estimados en 2,7Gb y 3,6Gb respectivamente. Esta gran diferencia en cuanto al tamaño del genoma y por ende también en el contenido de ADN entre *C. cardunculus* y las otras compuestas, especialmente con el girasol, con el cual comparten el mismo número de cromosomas, puede deberse a que los cromosomas de *Cynara cardunculus* son de menor tamaño y presumiblemente contienen el 50% menos de secuencias nucleotídicas repetitivas (Bennett y Leitch, 1997).

Actualmente, es posible encontrar ejemplares de *Cynara cardunculus* entre los 25-64° de latitud en ambos hemisferios. El rango de temperatura para su crecimiento varía entre los 7-38°C, aunque se reportaron casos en los cuales la especie soportó temperaturas de 40°C y por debajo de los -7°C durante periodos de dormancia. En cuanto a las condiciones del suelo, normalmente se observa buen crecimiento en el rango de pH de 5-7,5; salinidad 4-10 dS cm<sup>-1</sup> y 50-150 cm de profundidad (FAO, ECOCROP).

Es una especie herbácea, perenne, con ciclo de desarrollo anual. Los frutos maduran en el verano y posteriormente, la parte aérea de la planta se seca. Sin embargo, los órganos subterráneos (raíz y brotes) permanecen latentes. El crecimiento de la planta durante el primer año, es usualmente lento debido a que, tanto el crecimiento de los órganos aéreos como el de las partes subterráneas se produce exclusivamente a expensas de nuevos fotoasimilados. Las raíces actúan como órgano de almacenamiento de carbohidratos (principalmente inulina) que aseguran el suministro de los componentes necesarios para el rebrote de la planta a principios del otoño cuando las condiciones climáticas son más favorables; en este momento comienza un nuevo ciclo de crecimiento. Los brotes comienzan a crecer a nivel del suelo, para luego dar lugar a las hojas. En este estadio vegetativo, la planta atraviesa el invierno y la primavera. Al igual que en el primer ciclo, la planta florece en la primavera tardía y completa su desarrollo en el verano. El desarrollo de las hojas y el crecimiento completo de la planta, en este segundo ciclo es más rápido debido a que el cultivo se establece durante su primer ciclo y a partir de este segundo ciclo, la mayor parte de los fotoasimilados se destinan al incremento de su biomasa (Gominho *et al.*, 2018).

### 1.1.1 El cardo silvestre

Dentro del género, *C.carcunculus* var. *sylvestris* (Fig.1) es quien presenta la mayor distribución geográfica. Nativo de la zona central-oeste de la región Mediterránea, se extiende desde las Islas Canarias y Madeira hasta regiones del este como Chipre y Turquía (costa del Mar Negro) (Rottenberg y Zohary, 2005). Ha llegado a colonizar áreas de la región Pampeana en América del Sur y más recientemente México y California, así como también vastas áreas de Australia.

Su hábitat está representado por terrenos áridos, profundos y arenosos con una alta exposición al sol (Pignone y Sonnante, 2004), encontrándose generalmente en los bordes de campos y caminos.

Su propagación se lleva a cabo mediante semillas. Análisis genéticos, basados en diversos marcadores moleculares, han evidenciado un alto nivel de diversidad genética tanto entre como dentro de las poblaciones naturales (Portis *et al.*, 2005c; Cravero *et al.*, 2007).



**Fig.1:** Cardo silvestre

### **1.1.2 El cardo cultivado**

Esta variedad botánica se propaga de manera sexual a través de semillas, seleccionadas según características fenotípicas de la planta y se maneja como un cultivo anual. Sus hojas y nervaduras son la parte comestible de la planta (Fig. 2), utilizadas en platos típicos italianos, franceses o españoles. Además, constituye una importante fuente de compuestos polifenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos que actúan como antioxidantes.

Análisis basados en marcadores microsatélites (SSR) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) han demostrado un alto grado de variación genética entre los tipos varietales (Portis *et al.*, 2005b).





**Fig. 2:** Cardo cultivado

### **1.1.3 El alcaucil**

La producción de alcaucil se basó, durante décadas, principalmente en la propagación vegetativa de clones a través de hijuelos, lo cual asegura altos rendimientos de mercado del producto debido a que es posible perpetuar ciertas combinaciones de genes generadas por cruzamientos entre clones que muestran altos niveles de heterosis (Hammer, 1988; Balloux *et al.*, 2003; Calabrese *et al.*, 2019). Sin embargo, en los últimos años se ha observado una tendencia a la utilización de cultivares propagados mediante semillas dado que muestran buenos rendimientos y no presentan los problemas fitosanitarios típicos de la propagación vegetativa.

Originario de la región Mediterránea, fue introducido en Argentina a principio del siglo XVIII por los inmigrantes europeos, donde logró adaptarse a las características tanto climáticas como edáficas locales (García *et al.*, 2005). El mayor núcleo productivo se ubica en la zona de La Plata (Buenos Aires), con 64% de la superficie total del país, siguiéndole en importancia el Cinturón Hortícola de Rosario (Santa Fe) con 14% y, con un valor análogo, la región de Cuyo (San Juan y Mendoza). Además, existen otros núcleos productivos más pequeños en los

cinturones hortícolas de grandes ciudades como Mar del Plata, Córdoba, Tucumán, etc. (García *et al.*, 2017).

## **1.2. Usos e importancia económica de *Cynara cardunculus*.**

La especie ha sido estudiada como materia prima de múltiples usos, desde los convencionales, como cultivo hortícola para la producción de cabeza/capítulos para consumo en fresco o como corazones procesados en el caso del alcaucil o bien como hojas o pencas frescas en el caso del cardo, hasta nuevas aplicaciones industriales como biocombustible (sólido, líquido y gaseoso) a partir de su biomasa o de sus semillas, obtención de celulosa y pulpa de papel, así como también como fuente de productos nutraceuticos o como alimento funcional debido a su alto contenido de compuestos polifenólicos (Ceccarelli *et al.*, 2010; Reolonda Costa *et al.*, 2016). Su gran contenido de material volátil (superior al 75%) confiere una ventaja para la gasificación de la biomasa, y dado que esta gasificación produce un gas con bajo contenido de nitrógeno y alto contenido de hidrógeno, podría ser utilizado como combustible para la producción de energía eléctrica (Encinar *et al.*, 2002). Además, las semillas son ricas en lípidos conteniendo aproximadamente un 24% de aceite con un 5,6% de agua; razón por la cual diferentes estudios tienen como objetivo la producción de biodiesel utilizando el aceite crudo (Foti *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2006; Mancini *et al.*, 2019). Por otra parte, la composición química muestra a la biomasa de *Cynara* como una fuente importante de azúcar pudiendo ser utilizada en la producción de etanol por medio de la fermentación (Ballesteros *et al.*, 2007).

*Cynara cardunculus*, es consumido como un producto dietético y medicinal desde tiempos ancestrales. Por ejemplo, infusiones de las hojas de cardo son comúnmente usadas como diuréticos, coleréticos y efectos hepatoprotectores. Sus propiedades farmacológicas son atribuidas principalmente a los compuestos polifenólicos (ácidos cafeoilquínicos) como son los flavonoides, antocianinas, sesquiterpenos y triterpenos, mientras que sus efectos probióticos y nutricionales se deben a la inulina. En la literatura, se encuentran reportadas numerosas actividades farmacológicas y estudios relacionados a la protección hepática, acción antioxidante, anticancerígena, anti HIV, diurética, antiinflamatoria, antiviral, antimicrobial, etc. (Pandino *et al.*, 2013; Kukić *et al.*, 2008; Falleh *et al.*, 2008; Valentão *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2014 y 2016; Brás *et al.*, 2015; Kuczmannová, 2015).

Particularmente la variedad *scolymus* (alcaucil) contribuye significativamente a la economía de la región Mediterránea, siendo Italia el primer productor con 387.803 toneladas (t), seguido por España con 223.150 t y Egipto con 185.695 t; quedando Argentina en un 4° lugar (FAO data 2017: <http://faostat.fao.org/>). En nuestro país, el alcaucil fue introducido por los inmigrantes europeos (principalmente italianos y españoles) luego de la segunda guerra mundial. Se estima un área cultivada 4.472 ha, con una producción de 108.683 t; siendo el rendimiento promedio de 24,30 t/ha.

### 1.3. Características botánicas

Las plantas pertenecientes a la especie *Cynara cardunculus*, son robustas, ramificadas desde su base y pueden alcanzar los 2 m de altura. Presentan hojas lanceoladas, que crecen desde la base en forma de roseta y mantienen su densidad a lo largo del tallo. Poseen una raíz principal profunda y carnosa. Como en otras especies de la familia *Asteraceae*, las flores se encuentran agrupadas en una inflorescencia denominada capítulo. Los mismos, se encuentran recubiertos por brácteas (65-110 brácteas por capítulo) que se disponen en 5-8 series, siendo las más externas ligeramente triangulares mientras que hacia el interior adoptan una forma oblonga. En el interior, 80-240 flores completas y tubulosas, con corola gamopétala y el limbo profundamente pentapartido, se encuentran subtendidas en un receptáculo carnoso. La corola generalmente presenta un color violeta pálido u oscuro, haciendo a las flores llamativas para los polinizadores. Con menor frecuencia se observan también, algunas inflorescencias de color blanco o blanco con violeta. El fruto es una cipsela (aquenio con ovario ínfero) coronada por un papus plumoso, comúnmente llamada semilla o grano (Gominho *et al.*, 2018).

La especie es autocompatible y se reproduce de manera sexual a través de los aquenios, aunque puede multiplicarse vegetativamente a partir de las yemas de su base. Su alogamia es promovida por la protandria. La marcha de la antesis en el capítulo comienza desde el exterior hacia el interior de manera centrípeta. La superficie del estigma se encuentra receptiva 2-3 días después de la liberación de polen, por lo cual, si bien la autofecundación no puede darse en una misma flor, si puede ocurrir a nivel del capítulo.

Especialmente, el alcaucil, debido a la alogamia, es altamente heterocigota y sufre una marcada depresión endogámica cuando es forzado a la autofecundación (Cravero *et al.*, 2002). Sin embargo, cruza entre clones o plantas con bajos niveles de endocria han mostrado

elevados niveles de heterosis, superando las progenies en hasta más del 80% la producción de los parentales en algunos cruzamientos (Principe, 1984). El aprovechamiento de esta heterosis se maximiza mediante el desarrollo de semilla híbrida para lo cual resulta indispensable contar con un sistema de androesterilidad (Morison *et al.*, 2000).

## 2. Vigor híbrido o Heterosis

El concepto de vigor híbrido surgió gradualmente durante el siglo XVIII a partir de las observaciones realizadas por J.G. Koelreuter en *Nicotiana*, *Dianthus*, *Verbascum*, *Mirabilis* y *Datura*, confirmadas posteriormente por Darwin en diversos vegetales. Este fenómeno fue bautizado como “heterosis” por George Shull a comienzo del siglo XX y puede definirse como el incremento en el tamaño, vigor y/o productividad de un individuo híbrido respecto de sus progenitores.

Como se mencionó anteriormente, el aprovechamiento de la heterosis se maximiza mediante el desarrollo de materiales híbridos. Para la producción de semilla híbrida, en una especie autocompatible y alógama, es necesario, por un lado, mantener los parentales en condiciones de aislamiento de manera tal de evitar la contaminación con polen exógeno, y, por otra parte, realizar emasculación manual o química del progenitor femenino, a fin de impedir posibles autofecundaciones.

El mejoramiento genético del alcaucil se ha orientado, en los últimos años, a la producción de materiales multiplicables por semillas. Como resultados de estos programas de mejoramiento, un considerable número de nuevos cultivares, variedades OP (*Open-pollinated*) o híbridos, han sido desarrollados y exitosamente introducidos en varios países, ganando popularidad por resultar más homogéneos que las variedades clonales para distintos caracteres de importancia agronómica (coloración, forma, peso y compacidad de los capítulos, entre otros), incrementar el rendimiento, mejorar el estado fitosanitario de las plantas y constituir un sistema de propagación más económico que el vegetativo (Pagnotta *et al.*, 2016; Rey *et al.*, 2016; Saccardo *et al.*, 2013; López Anido *et al.*, 2010).

Dadas las dificultades en la obtención de líneas endocriadas en sentido estricto (homocigotas), debido a que autofecundaciones repetidas producen disminución del vigor y productividad de las plantas, lo que normalmente se denominan híbridos en alcaucil son en

realidad la primera generación filial procedente del cruzamiento de dos tipos parentales con cierto grado de endocría (Runge y Patterson, 2006) y no verdaderas  $F_1$  mendelianas (Calabrese *et al.*, 2019).

Los primeros híbridos de alcaucil fueron utilizados en Israel y Estados Unidos (Basnizki y Zohary, 1987, 1994). Actualmente, en la base de datos europea de plantas cultivadas (<http://ec.europa.eu>), un total de 55 variedades de alcaucil se encuentran registradas, de las cuales 30 son híbridos (Calabrese *et al.*, 2019). Estos materiales son comercializados por diferentes empresas tales como Bayer (Ej.: “*Opal*”, “*Concerto*”, “*Madrigal*”, “*Harmony*”, “*Symphony*”), Agriseeds (Ej.: “*Rinaldo*”, “*Amos*”, “*Napoleon*”), Big Heart Seed (“*Romolo*”), y Semiorto (“*Romolo*” e “*Istar*”) (Rey *et al.*, 2016).

Un evento importante, que facilitó el proceso de obtención de híbridos en alcaucil, evitando la polinización con polen no deseado, fue el descubrimiento de un sistema de androesterilidad.

### 3. Androesterilidad

La androesterilidad o esterilidad masculina en plantas se define como la incapacidad de producir o liberar granos de polen funcionales. Las manifestaciones fenotípicas son muy diversas, desde la ausencia completa de los órganos masculinos, desarrollo anormal de los tejidos esporogénicos (ausencia de meiosis), aborto de los granos de polen en cualquiera de las etapas de desarrollo, ausencia de dehiscencia en los estambres o incapacidad del polen maduro para germinar en un estigma compatible (Budar y Pelletier, 2001). Según su origen, puede clasificarse en tres categorías:

*Androesterilidad nuclear*: también conocida como androesterilidad génica, la cual está regida por genes nucleares y se ha encontrado en más de 175 especies vegetales (Kaul, 1988). Generalmente, se trata de uno o pocos genes (mono u oligogénica) que inhiben el desarrollo normal de las anteras y/o del polen y en su mayoría son de tipo recesivas como es el caso de tomate, cebada, lima, aunque también se han observados algunas de tipo dominante como por ejemplo en repollo y brócoli (Hussain *et al.*, 2018). Además, la expresión de un gen particular puede ser completa, de modo que no se formará polen viable en las flores androestériles; o bien

la expresión del gen puede ser parcial, lo que permite que se formen pequeñas cantidades de polen viable (Kumar, 2013).

*Androesterilidad citoplasmática*: está determinada por genes mitocondriales y se hereda por vía materna, siempre que se disponga de un polinizador. Es la menos común y la descendencia de una planta androestéril, será siempre androestéril. Ej. rábano (Oruga, 1968).

*Androesterilidad núcleo-citoplásmica*: depende de la combinación de la acción de genes ubicados en el núcleo y en organelas citoplasmáticas (mitocondrias y cloroplastos). En estos sistemas, la androesterilidad está controlada por el citoplasma en combinación con genes restauradores de la fertilidad presentes en el núcleo, por lo cual, la descendencia obtenida mediante el cruzamiento de una planta androestéril y una planta fértil, podrá ser androestéril o fértil dependiendo del genotipo que se utilice como progenitor masculino (Kumar, 2013). Este tipo de androesterilidad ha sido reportada en arroz (Guo y Liu, 2009), girasol (Whelan, 1980), maíz (Schnable y Wise, 1998), entre otros.

Desde el punto de vista estructural/funcional, la androesterilidad en plantas puede ser dividida en tres categorías: (i) esterilidad del polen, en la cual no se producen granos de polen o bien su producción es extremadamente escasa y los mismos han perdido su funcionalidad; (ii) androesterilidad estructural, donde los estambres se encuentran malformados, no son funcionales o desaparecieron por completo; y (iii) androesterilidad funcional, donde se producen granos de polen viable que se encuentran en anteras indehiscentes y así su funcionalidad se encuentra impedida (Hussain *et al.*, 2018).

Como se mencionó en el apartado anterior, el uso de la androesterilidad para la producción de semillas híbridas, es de gran importancia ya que evita los inconvenientes generados por la emasculación mecánica o química, las cuales suelen no ser metodologías cien por ciento eficientes. El primer sistema de androesterilidad utilizado para la producción de semilla, fue desarrollado en cebolla (Jones y Clarke, 1943). Posteriormente, se desarrollaron otros en una amplia variedad de cultivos tales como remolacha azucarera, maíz, sorgo, girasol, arroz, colza, zanahoria (Frankel y Galun, 1977). La producción de variedades híbridas en maíz (a partir de la década del '30 en Estados Unidos) y en arroz (desde 1976 en China) es considerado el logro más significativo y exitoso del mejoramiento en el siglo XX. A partir de la introducción de híbridos, el rendimiento de maíz estadounidense aumentó seis veces en el



período comprendido entre 1930-1990 comparado con la *performance* de variedades de polinización abierta (Stuber, 1994). En China, el rendimiento de arroz híbrido superó en un 20-30% al rendimiento de las líneas puras (Li y Yuan, 2000). En ambos casos (en los que rige un sistema de androesterilidad núcleo-citoplasmática), el desarrollo de líneas androestériles y líneas restauradoras de la fertilidad, fue esencial para permitir la producción de semillas híbridas. La androesterilidad génica, proporciona una esterilidad estable y completa y los genes que la gobiernan suelen ser fáciles de transferir (Raja *et al.*, 2018). Además, no requiere líneas mantenedoras y restauradoras para el desarrollo de híbridos, siempre que el cultivo en cuestión permita algún tipo de reproducción alternativo de los materiales androestériles, como ser reproducción vegetativa natural o bien inducida en laboratorio tal como el cultivo *in vitro*.

Dentro de la especie *Cynara cardunculus*, sólo se ha detectado, hasta la fecha, androesterilidad en la variedad botánica *scolymus* (alcaucil), siendo la misma de tipo génica, mientras que ningún tipo de androesterilidad ha sido observada en las variedades *atilis* y *sylvestris* (cardo cultivado y silvestre, respectivamente). El primer registro de androesterilidad en la especie fue reportado por Principe (1984), quien identificó tres individuos androestériles en una familia de hermanos completos generados a partir del cruzamiento de dos progenitores androfértiles. Mediante retrocruzamientos de estas tres plantas hacia su progenitor materno, utilizando este último como dador de polen en las retrocruzas, estableció que esta androesterilidad está regida por un único *locus* que en estado homocigota recesivo produce individuos androestériles, y al cual designó como *ms1*. Más tarde, Basnizki y Zohary (1994 y 1998) informaron otros dos genes que en estado recesivo determinarían dicho carácter, los cuales fueron designados como *ms2* y *ms3*. El gen *ms2* fue encontrado en una progenie originada a partir de la variedad comercial de alcaucil "Cavo", en la cual observaron granos de polen en gran parte no turgentes y casi en su totalidad abortados, fenotipo semejante al observado en los individuos portadores del gen *ms1* reportado por Príncipe (1984). Sin embargo, nunca se realizó una prueba de alelismo que permitiera definir si se trataba del mismo gen o de genes diferentes. Mientras que el gen al cual denominaron *ms3* se identificó en una progenie originada a partir de un individuo perteneciente a la variedad "Tudela", la cual presentaba anteras totalmente estériles. Posteriormente, Stamigna *et al.* (2004) propusieron un modelo digénico con epítasis doble dominante al observar una segregación 15:1 (androfértiles: androestériles) en una población  $F_2$ . Los individuos androestériles serían aquellos con constitución génica homocigota recesiva para los dos *loci* que rigen el carácter. Recientemente

López Anido *et al.* (2016) evaluaron dos generaciones ( $F_2$  y  $BC_2$ ) derivadas del cruzamiento entre una planta de alcaucil androestéril, detectada en la progenie obtenida por autofecundación de la crucea ((MSxReri)x(CadaxRiga)), y la variedad OP (*Open pollination*) de cardo cultivado Blanc Ameliere Semence. En ambas generaciones observaron una segregación del carácter androesterilidad que se ajustaba a la proporción 15:1 correspondiente a la segregación de dos *loci* con epistasis doble dominante, tal como fuera propuesto por Stamigna *et al.* (2004). Sin embargo, al hacer una evaluación más exhaustiva en cuanto a la producción de polen en las plantas de la generación  $BC_2$ , identificaron un grupo de plantas con poca producción de polen, las cuales inicialmente habían sido clasificadas como plantas fértiles (productoras normales de polen). De este modo, considerando este tercer grupo de plantas, determinaron que la segregación observada se ajustaba a una proporción 12:3:1, la cual corresponde a la segregación de dos genes con epistasis simple dominante.

Dentro de la misma familia *Asteraceae*, se reportaron casos similares de androesterilidad regida por genes recesivos. Hayashi *et al.* (2011) identificaron el gen *ms-S* responsable de la androesterilidad en lechuga. Por otra parte, cerca de treinta fuentes de androesterilidad génica fueron aisladas en girasol, diez de las cuales están bajo el control de cinco genes, designados *ms1-ms5* (Vranceanu, 1970). Además, se designaron otros cuatro genes como *ms6-ms9* en una población en la cual la androesterilidad fue inducida por mitomicina C y estreptomicina (Jan y Rutger 1988; Jan 1992). Jan (1992) describió también los genes *ms10* y *ms11*, los cuales fueron mapeados en los grupos de ligamiento 11 y 8 respectivamente (Pérez-Vich *et al.*, 2005); mientras que el gen *ms9* fue mapeado en el grupo de ligamiento 10 del mapa genético de girasol (Chen *et al.*, 2006).

#### 4. Marcadores moleculares

El término marcador molecular hace referencia a porciones del genoma que ocupan una posición determinada dentro de un cromosoma (*locus*) y evidencian variaciones a nivel de la secuencia de ADN entre individuos o entre especies (polimorfismo) que se heredan de manera mendeliana. Son de gran utilidad en estudios de genética evolutiva, poblacional, identificación de variedades, desarrollo de mapas de ligamiento, etc. Diversos marcadores moleculares han sido desarrollados y exitosamente aplicados en genética y actividades de mejoramiento en



diversos cultivos agrícolas. Un marcador molecular ideal debería ser codominante, estar igualmente repartido en todo el genoma, altamente reproducible y con capacidad para detectar un mayor nivel de polimorfismo (Nadeem *et al.*, 2018).

Los estudios moleculares en la especie *C. cardunculus* comenzaron hace unos 20 años. Los estudios iniciales se centraron en la evaluación de la variabilidad genética en las colecciones de germoplasma conformadas tanto por variedades comerciales de alcaucil, así como por variedades locales (*landraces*). Por lo general, estos estudios también incluyeron la evaluación de accesiones de cardos cultivados y cardos silvestres, variedades botánicas pertenecientes a la misma especie. Varios marcadores moleculares como RAPD (Fragmentos polimórficos amplificados al azar) (Lanteri *et al.*, 2001; Sonnante *et al.*, 2002), AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) (Lanteri *et al.*, 2004a; Pagnotta *et al.*, 2004; Portis *et al.*, 2005ayb; Acquadro *et al.*, 2009), SSR (microsatélites) (Acquadro *et al.*, 2003; 2005; Sonnante *et al.*, 2008), SRAP (Polimorfismos amplificados de secuencias relacionadas) (Casadevall *et al.*, 2011; Cravero *et al.*, 2007 y 2019) e Indels (Inserciones o deleciones de nucleótidos) (Scaglione *et al.*, 2009) fueron aplicados en estudios de diversidad genética, conservación de germoplasma y desarrollo de colecciones núcleo.

A fin de conocer la organización del genoma e identificar regiones codificantes de características de interés agronómico, se han llevado a cabo estudios, basados en el uso de técnicas de marcadores moleculares, con el objetivo de desarrollar mapas de ligamiento de la especie. Hasta el momento, se han desarrollado cinco mapas de ligamiento utilizando la estrategia de mapeo *pseudotestcross* y diversas combinaciones de marcadores moleculares (Lanteri *et al.*, 2006, Portis *et al.*, 2009 y 2012, Sonnante *et al.*, 2011, Martin *et al.*, 2013). La mayoría de estos mapas fueron utilizados para identificar y localizar características agronómicas regidas por un simple *locus* o inclusive para la localización de las regiones génicas implicadas en caracteres cuantitativos (QTLs, *locus* de un carácter cuantitativo). Los *loci* codificantes para caracteres simples como espinosidad en capítulo, espinosidad en hoja y coloración del capítulo fueron identificados y mapeados por Lanteri *et al.* (2006), Sonnante *et al.* (2011) y Martin *et al.* (2013). Mientras que QTLs asociados al rendimiento y sus componentes fueron identificados por Portis *et al.* (2014) y Martin *et al.* (2016).

Si bien distintos tipos de marcadores moleculares han sido aplicados en la especie con diversos objetivos, hasta la fecha no se ha reportado la aplicación de este tipo de tecnología

para el estudio de la androesterilidad. Diferentes tipos de marcadores moleculares han sido utilizados para identificar *loci* de androesterilidad génica en otras especies, tales como STS (Sitios con marca de secuencia) en repollo chino (*Brassica rapa*) (Ying *et al.*, 2003), CAPS (Secuencia polimórfica amplificada y cortada) en pimiento picante (*Capsicum annuum*) (Lee *et al.*, 2010), SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas) y CAPS en lechuga (*Lactuca sativa*) (Hayashi *et al.*, 2011) y SNP (Polimorfismo de nucleótido único) en algodón (Feng *et al.*, 2015).

### 4.1. Marcadores moleculares microsatélites (SSR)

Los marcadores microsatélites son segmentos cortos de ADN, con un patrón específico de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem hasta 60 veces que se hallan en el genoma del núcleo y las organelas. Se encuentran distribuidos densa y homogéneamente por todo el genoma, tanto en regiones codificantes como no codificantes, si bien son menos abundantes en los exones (Kalia *et al.*, 2011). Durante la replicación del ADN puede ocurrir un deslizamiento de la ADN polimerasa en la región repetida de la hebra molde que va a originar una expansión o contracción de la región en la nueva hebra replicada, si el error no es corregido.

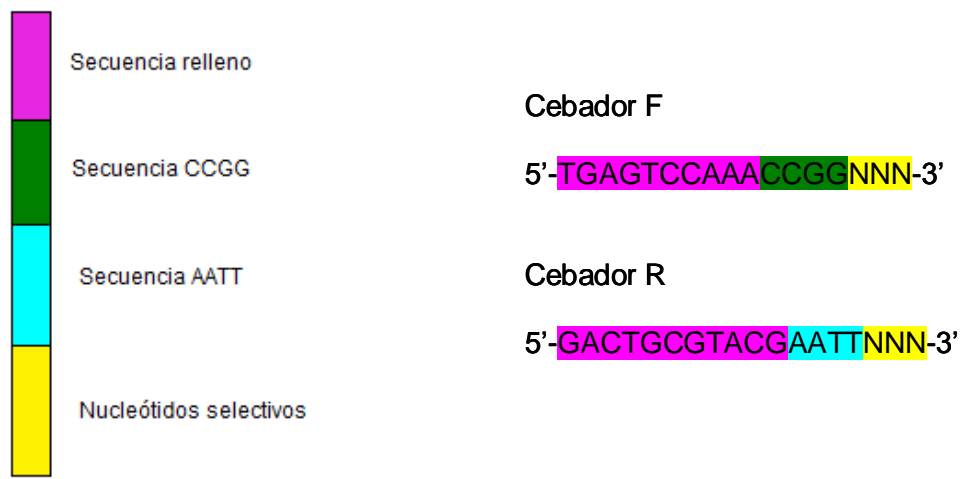
Debido a su variabilidad, codominancia y su relativa facilidad de análisis, los microsatélites son considerados como uno de los marcadores moleculares más poderosos, pero su desarrollo ha sido una de las limitantes para su utilización. En la especie *C. cardunculus* se han desarrollado una cantidad limitada de este tipo de marcadores. Los primeros microsatélites de la especie fueron desarrollados por Acquadro *et al.* (2005 a y b), constituyendo un set de 37 marcadores los cuales fueron aplicados en estudios de diversidad. Posteriormente, 23 nuevos SSR desarrollados por Sonnante *et al.* (2008), se utilizaron para caracterizar una colección de germoplasmas de la especie que incluía las tres variedades botánicas, permitiendo identificar alelos específicos para cada variedad botánica. Más tarde, un set de 61 microsatélites denominados CELMS, desarrollados por Acquadro *et al.* (2009), fueron aplicados en el desarrollo de algunos de los mapas de ligamiento de la especie (Portis *et al.*, 2009 y 2012, Martin *et al.*, 2013).

### 4.2. Marcadores moleculares de tipo SRAP

El Polimorfismo Amplificado de Secuencias Relacionadas (SRAP) es una técnica de marcadores moleculares basados en PCR desarrollada por Li y Quiros (2001). Este sistema

tiene como objetivo la amplificación de fragmentos de lectura abierta (*Open Reading Frames* - ORFs) usando dos cebadores (directo y reverso). Constituyen un sistema simple y eficiente que fue adaptado para varios propósitos como ser: caracterización de germoplasma en distintas especies de coles (Li y Quiros, 2001), algodón (Lin *et al.*, 2003), zapallo (Ferriol *et al.*, 2004), alcaucil (Cravero *et al.*, 2007), arveja (Espósito *et al.*, 2007) y lenteja (Bermejo *et al.*, 2010); para detección de marcadores asociados a un carácter de interés, como el gen BoGLSALK en col silvestre (Li y Quiros, 2001), el gen de resistencia al virus CeMV en apio (Ruiz *et al.*, 2001), genes asociados al color de la cubierta de la semilla en nabo (Rahman *et al.*, 2007) o genes para coloración en capítulo y precocidad en producción en alcaucil (Martin *et al.*, 2008); y para construcción de mapas de ligamiento en coles (Li y Quiros, 2001; Sun *et al.*, 2007), algodón (Lin *et al.*, 2003), alcaucil y cardo silvestre (Martin *et al.*, 2013) y arveja (Guindón *et al.*, 2016).

Los cebadores, tanto directo (F) como reverso (R), consisten en una secuencia de 17 o 18 nucleótidos de longitud. Cada cebador contiene una secuencia central (*core*) de una longitud de 13 -14 bases, donde las primeras 10 u 11 bases a partir del extremo 5' son secuencias "relleno" no específicas, seguidas por la secuencia CCGG en el cebador directo y AATT en el cebador reverso (Fig. 3). La secuencia central es seguida por tres nucleótidos selectivos en el 3' terminal. El diseño de estos cebadores estuvo relacionado con el hallazgo de que el 66% de los motivos ricos en CCGG se localizan dentro de exones en 20 cromosomas artificiales bacterianos (BACs) seleccionados de la base de datos Genbank de *Arabidopsis*. Por tanto, los cebadores directos estarían orientados a la amplificación preferencial de exones, mientras que la secuencia AATT en el cebador reverso tiene como objetivo la amplificación de las secuencias ricas en AT, las cuales se encuentra frecuentemente en intrones, promotores y regiones espaciadoras "*spacers*", donde se suele observar mayor variabilidad. De esta manera, se generan bandas polimórficas basadas tanto en intrones como en exones (Li y Quiros, 2001).



**Fig 3:** Diseño cebadores SRAP.

Dentro de las ventajas de estos marcadores pueden destacarse su simplicidad y confiabilidad, así como también que no son cultivo específico permitiendo que un mismo cebador (o combinación de cebadores) pueda ser utilizado en diversas especies. Además, resultan de bajo costo, principalmente debido a que un cebador directo (F) puede ser combinado con números cebadores reversos (R), de manera tal de generar un gran número de combinaciones posibles a un menor costo que los microsatélites. Por otra parte, esta tecnología no requiere de varias etapas de amplificación ni de restricción como es el caso de los AFLP, disminuyendo aún más su costo (Martin *et al.*, 2012).

## 5. Análisis de segregantes agrupados (BSA)

El análisis de segregantes agrupados (BSA) fue desarrollado por Michelmore *et. al* (1991) con el fin de identificar marcadores moleculares asociados a genes de resistencia al mildiu en lechuga. Consiste en analizar diferencias entre muestras de ADN agrupadas, derivadas de una población segregante originada a partir de un cruzamiento simple. Cada grupo (*Bulk*) contiene individuos seleccionados por presentar fenotipos idénticos para una característica en particular, esperando que para la región genómica determinante de dicha característica (*locus* o región “*target*”) presenten similar genotipo, en un fondo genético aleatorio. Por lo tanto, las muestras de ADN de los dos grupos de individuos de la población

segregante, uno que presenta una forma de la característica y el otro la forma opuesta, difieren genéticamente sólo en la región seleccionada. De este modo, se espera que exista polimorfismo entre ambos grupos cuando se está en presencia de un marcador molecular asociado al carácter de interés mientras que el patrón de bandas para las demás regiones del genoma será similar en ambos grupos. El ligamiento entre el marcador polimórfico y el gen de interés es confirmado y cuantificado mediante el análisis de cada uno de los individuos que conformaron los grupos (*de-bulk*). Los *loci* no ligados mostrarán un bandeo aleatorio, mientras que, en aquellos *loci* ligados al carácter, se observará un bandeo diferencial entre los integrantes de ambos grupos, según el tipo de marcador utilizado (dominante o codominante).

El BSA provee una alternativa rápida y técnicamente simple para la identificación de marcadores asociados a genes específicos. El éxito del acercamiento a la región de interés dependerá de la divergencia de los parentales en esa región. El tamaño mínimo de los grupos será determinado por la frecuencia con la cual *loci* no ligados podrían ser detectados como polimórficos entre los grupos. Esto también depende del tipo de marcador a utilizar (dominante o codominante) y del tipo de población segregante a analizar ( $F_2$ , retrocruzas, etc.). Por ejemplo, para un marcador RAPD dominante segregando en una población  $F_2$ , la probabilidad de que un *bulk* de tamaño “n” individuos presente una banda y el segundo *bulk* del mismo tamaño no la presente será  $2(1-[1/4]^n) \cdot (1/4)^n$  cuando el locus no está ligado al gen de interés. Por lo tanto, no se requiere de un elevado número de individuos para la conformación de cada grupo. La probabilidad de que un locus no esté ligado siendo polimórfico entre *bulks* de 10 individuos de una  $F_2$  es de  $2 \times 10^{-6}$  (Michelmore *et al.*, 1991).

Esta estrategia ha sido utilizada por gran cantidad de investigadores con diversos objetivos, desde caracteres simples (cualitativos) a poligénicos (cuantitativos). Win *et al.* (2017) la utilizaron para el mapeo de QTLs que confieren resistencia al mildiu lanoso en pepino (*Cucumis sativus* L.); mientras que Song *et al.* (2017) usaron la estrategia para identificar dos genes cualitativos que controlan el color del cotiledón de la semilla en soja (*Glycine max*), entre otros. En alcaucil, esta estrategia probó ser una herramienta útil para la identificación de marcadores moleculares asociados a precocidad de producción y color de capítulo (Martin *et al.*, 2008). En relación al carácter androesterilidad, el BSA fue aplicado para la identificación de marcadores asociados al carácter en especies de la familia *Asteraceae* como la lechuga (Hayashi *et al.*, 2011) y el girasol (Gong *et al.*, 2014). En lechuga se compararon mediante

AFLP dos grupos de ADN (fértil y androestéril), lo que permitió el desarrollo de nueve marcadores SCAR y CAPS asociados al gen recesivo responsable de la androesterilidad *ms-S* (Hayashi *et al.* 2011), mientras que en girasol la comparación del grupo fértil vs. androestéril mediante el empleo de microsatélites permitió localizar el gen *ms<sub>6</sub>* en el grupo de ligamiento (LG) 16, el *ms<sub>7</sub>* en el LG 6 y el gen *ms<sub>8</sub>* en el LG 5 del mapa consenso de la especie (Gong *et al.*, 2014).

## 6. Clonación de ADN

Cualquier fragmento de ADN a ser secuenciado debe ser previamente amplificado ya sea por PCR o por clonación en bacterias. En caso de ser amplificado por PCR, la banda de interés debe cortarse del gel de agarosa o acrilamida, re-hidratarse y re-amplificarse con el mismo set de cebadores con los cuales fue amplificado inicialmente. Este proceso, puede generar contaminación y en algunos casos se obtiene una secuencia mixta, mezclada con fragmentos de ADN que no son de interés. Una manera de obtener secuencias más limpias y por lo tanto de mejor calidad, es a través de la clonación del fragmento de interés.

La clonación genética es el proceso en el cual se obtienen copias idénticas de un gen particular mediante el uso de herramientas de biología molecular. El aislamiento de un gen o secuencia de ADN de cualquier especie y su introducción en un vector de proliferación, sin modificación de la secuencia de ADN original, es conocido como clonación molecular. Después del aislamiento, los clones moleculares pueden generar muchas copias de ADN para el análisis de expresión del gen o proteína y también se puede modificar *in vitro* para alterar la expresión y la función de la proteína. El método convencional de clonación incluye el aislamiento del fragmento de ADN de interés, la ligadura de este inserto en un vector de clonación apropiado, la transformación de plásmidos recombinantes dentro de un hospedador adecuado para la propagación y la selección de los hospedadores que contienen el plásmido recombinante. Los métodos de clonación modernos son usados para la producción de proteínas recombinantes, producción de vacunas, terapia génica, tecnología antisentido e ingeniería genética en cultivos agrícolas (Ashwini *et al.*, 2016). La utilización más frecuente de esta técnica con fines prácticos, es por ejemplo, la conversión de marcadores RAPD en SCAR. En orden de incrementar la reproducibilidad y la confiabilidad de los ensayos de PCR, marcadores SCAR han sido desarrollados a partir de fragmentos RAPD clonados (Yang *et al.*, 2013). Los fragmentos de ADN amplificados mediante marcadores RAPD, posteriormente son ligados, clonados y

secuenciados. Luego de convertir los marcadores RAPD en SCAR, la especificidad y estabilidad se puede mejorar mucho, lo que los hace más convenientes y eficientes en la prueba de diferentes alelos (Dnyaneshwar *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Rajesh *et al.*, 2013), ya que pueden identificar una o algunas bandas en lugar de un patrón complejo.

### 7. Secuenciación de ADN

Los primeros métodos para la secuenciación rápida del ADN se desarrollaron entre 1975 y 1977. Sanger *et al.* (1977) crearon el método de secuenciación didesoxi basado en la elongación del ADN, mientras que Maxam y Gilbert (1977) desarrollaron un segundo método basado en la degradación química del ADN. El método de Sanger pudo ser automatizado y se convirtió con rapidez en el procedimiento estándar para la secuenciación de cualquier fragmento purificado de ADN, siendo utilizado para la secuenciación del genoma completo del ser humano (liderada por *International Human Genome Sequencing Consortium and Celera Genomics*) y el cual se continúa utilizando actualmente en los nuevos equipos y plataformas de secuenciación.

El método de secuenciación de ADN de Sanger, o didesoxi, se basa en el proceso de replicación. El fragmento a ser secuenciado se utiliza como molde para formar una serie de moléculas nuevas de ADN. El ADN se sintetiza en presencia 2'-desoxinucleótidos naturales (dNTP) y 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTP) que sirven como terminadores de la síntesis. Así, la reacción de síntesis de ADN termina aleatoriamente cada vez que se agrega un ddNTP a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento, resultando en productos truncados de diferentes longitudes. Los productos son separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y los ddNTP terminadores son utilizados para revelar la secuencia de ADN de la cadena de plantilla (Morozova y Marra, 2008).

Originalmente, estas cuatro reacciones debían realizarse por separado. Sin embargo, avances en la detección por fluorescencia permitieron combinar los cuatro terminadores en una misma reacción marcándolos con diferentes fluoróforos (Smith *et al.*, 1986; Prober *et al.*, 1987). Avances posteriores han reemplazado la electroforesis en el gel original por electroforesis capilar (Cohen *et al.*, 1988) y luego por matrices capilares, permitiendo un aumento en el rendimiento general de la electroforesis (Huang *et al.*, 1992). Además, avances importantes en bioquímica de polímeros, incluido el desarrollo de la poliacrilamidalineal (Ruiz-Martinez *et al.*,

1993) y polidimetilacrilamida (Madabhushi, 1998) han permitido la reutilización de capilares en múltiples corridas electroforéticas, aumentando más aún la eficiencia de secuenciación.

Desde la finalización del proyecto del genoma humano en 2003, las tecnologías de secuenciación del genoma experimentaron un progreso extraordinario, lo que ha llevado a una disminución del costo por megabase y un aumento en el número y la diversidad de genomas secuenciados. Algunos enfoques maximizan el número de bases secuenciadas en la menor cantidad de tiempo, generando una gran cantidad de datos que pueden usarse para comprender fenotipos cada vez más complejos. Alternativamente, otros enfoques ahora apuntan a secuenciar piezas de ADN contiguas más largas, que son esenciales para resolver regiones estructuralmente complejas. Estas tecnologías, denominadas “de nueva generación” (NGS) utilizan diversos abordajes que deben ser tenidos en cuenta a la hora de elegir implementar alguna. El sistema *Illumina* representa la mayor cuota de mercado para instrumentos de secuencia comparada con otras plataformas. El conjunto de instrumentos de *Illumina* para un rango de secuencias de lectura corta abarca desde unidades pequeñas de sobremesa de bajo rendimiento a unidades de mayor tamaño y potencia, instrumentos dedicados a nivel poblacional y secuenciación de genomas completos (WGS). La identificación de dNTP se logra a través de microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) utilizando dos a cuatro canales láser. En la mayoría de las plataformas *Illumina*, cada dNTP es unido a un solo fluoróforo que es específico para ese tipo de base y requiere cuatro canales de imágenes diferentes, mientras que en los sistemas NextSeq y Mini-Seq se utilizan un sistema de dos fluorómetros (Goodwin *et al.*, 2016).



## HIPÓTESIS

Como hipótesis de trabajo se plantea que:

1- La/s región/es genómica/s responsable/s de la androesterilidad en *Cynara cardunculus* L presenta/n polimorfismos factibles de ser identificados mediante la estrategia de BSA y el empleo de marcadores moleculares.

2- Es posible transferir marcadores moleculares de tipo microsatélites asociados a androesterilidad génica en girasol a la especie *C. cardunculus* L.

**OBJETIVO GENERAL**

Establecer un marco genético que permita identificar marcadores moleculares asociados al carácter androesterilidad en *C. cardunculus* L., de manera tal de delinear un adecuada estrategia de mejoramiento de la especie asistida por marcadores (MAS), tendiente al desarrollo de híbridos comerciales.

# **CAPÍTULO I:**

**Desarrollo y caracterización  
fenotípica de una población  
segregante para el carácter  
androesterilidad.**

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar una población segregante para el carácter androesterilidad en *Cynara cardunculus* L.
2. Identificar fenotípicamente individuos androestériles y androfértiles presentes en la generación F<sub>2</sub>.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Desarrollo de una población segregante para el carácter androesterilidad

Se utilizó como progenitor femenino una planta de alcaucil androestéril de un material experimental derivado del cruzamiento (clon androestéril x Reri) x (Cada x Riga) presente en el banco de germoplasma del IICAR-CONICET, definida como tal por no observarse liberación de polen en ninguno de los capítulos producidos durante dos años consecutivos, la cual fue multiplicada vegetativamente mediante hijuelos para obtener cinco (5) individuos idénticos (clon). Como progenitor masculino se utilizó una mezcla de polen de una variedad de cardo comercial (Blanc Ameliore de la semillera Semence). A partir de dicho cruzamiento se obtuvo una población  $F_1$  de 19 individuos, los cuales fueron autofecundados durante diciembre de 2015. Las semillas producidas por cada individuo  $F_1$  se cosecharon individualmente y aquella autofecundación de la cual se obtuvo el mayor número de semillas (~600) se seleccionó para continuar el proceso. De las restantes familias  $F_2$ , 8 fueron descartadas por presentar un bajo número de semillas (<200) mientras que las restantes 10 familias fueron almacenadas como semilla de reserva.

Estas semillas fueron sembradas en bandejas multiceldas en marzo de 2016 (Fig.4) y aquellas plántulas que alcanzaron un desarrollo de 4 hojas verdaderas (350) fueron trasplantadas a campo, en la Sección Horticultura del Campo Experimental J.F. Villarino, con una distancia entre plantas de 80 cm y entre surcos de 1,40 m (Fig.5), junto con los parentales y los 19 individuos de la  $F_1$ .



**Fig. 4:** Plántulas F<sub>2</sub> sembradas en multimacetas.



**Fig. 5:** Plantas F<sub>2</sub> implantadas en la Sección Horticultura del Campo Experimental J.F. Villarino.

### 1.2. Evaluación fenotípica a campo

Días previos a la floración, los capítulos fueron tapados con bolsas de polinización para evitar pérdidas o contaminación de polen (Fig.6). Los 315 individuos pertenecientes a la población F<sub>2</sub> que sobrevivieron al proceso de implantación y alcanzaron un desarrollo normal fueron evaluados visualmente a campo y clasificados como: plantas fértiles (PF), aquellas que presentaron producción normal de polen (Fig.7); plantas con poco polen (PP), por presentar una producción de polen reducida (Fig.8) y plantas androestériles (MS), sin producción de polen (Fig.9). Dicha evaluación fenotípica se llevó a cabo durante noviembre de 2016 – enero de 2017 y se repitió en el período de septiembre a diciembre de 2017. A partir de estas evaluaciones, se seleccionaron 15 individuos de cada grupo (PF, PP, MS), entre aquellos que hayan mantenido

su clasificación en ambos años, para el posterior análisis de BSA. Asimismo, se realizó una prueba de  $\chi^2$  con el fin de verificar si la segregación observada del carácter se ajustaba a una segregación de tipo mendeliana.



**Fig. 6:** Evaluación de producción o no de polen, se observan capítulos tapados con bolsas de polinización para evitar la contaminación de polen exógeno.



**Fig. 7:** Planta fértil en la que se observa abundante liberación de polen.



**Fig. 8:** Planta poco polen en la que se observa escasa liberación de polen.



**Fig. 9:** Planta androestéril en la que no se observa liberación de polen.

### 1.3. Conteo de granos de polen por flor

A fin de comprobar las diferencias visualizadas a campo en cuanto a la producción (liberación) o no de polen por parte de los parentales, se realizó un conteo de los granos de polen por flor en estadio de botón floral. Se evaluaron 3 plantas del clon de alcaucil androestéril utilizado como progenitor femenino, 3 plantas de la variedad de cardo comercial utilizada como progenitor masculino y las 15 plantas de cada grupo (PF, PP, MS) conformado con los individuos de la población  $F_2$ . De cada planta, se extrajeron 10 flores de un mismo capítulo (Fig.10), las cuales se fijaron en una solución de etanol al 70%. Para el conteo de los granos de polen, se disecaron 3 flores por capítulo y se extrajo una antera por flor. Cada antera, fue colocada sobre una de las canaletas que forman la “H” (Fig. 11) de la cámara *improved Neubauer* (Boeco Germany) de 1/10mm de profundidad y con la ayuda de una pinza se liberó el total de los granos de polen sobre un medio acuoso. Mediante observación con lupa Mikova (x20) se realizó el conteo de la totalidad de los granos de polen liberados por cada antera (Fig.12). Se calculó el número de granos de polen por flor multiplicando por cinco el número registrado por antera, dado que cinco es el número total de anteras por flor. Los datos obtenidos fueron sometidos al contraste de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) utilizando el programa estadístico Infogen (Balzarini y Di Renzo, 2004), para establecer la existencia o no de diferencias significativas tanto entre los genotipos parentales como entre los tres grupos definidos. La comparación entre parentales y entre grupos se realizó

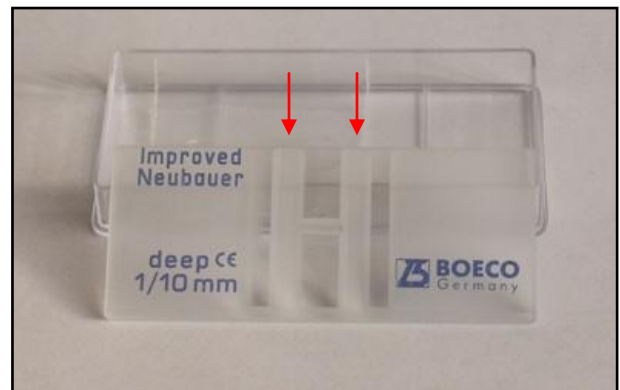


en forma separada dado que las muestras de los progenitores se tomaron en el año 2016 mientras que las de los *bulks* en el año 2017.



**Fig. 10:** Flores en estadio botón floral.

**Fig. 11:** Cámara de Neubauer utilizada. Con flechas rojas se marcan las canaletas donde se colocó una antera y los granos de polen fueron liberados en un medio acuoso.



**Fig. 12:** Liberación de los granos de polen de la antera con la ayuda de una pinza.

### 1.4. Análisis de viabilidad de los granos de polen

Con el objeto de evaluar la viabilidad del polen, se utilizaron tanto técnicas de tinción como de cultivo *in vitro*. Para determinar la viabilidad de polen en condiciones *in vitro*, se probaron dos medios de cultivo:

- Medio 1: medio de cultivo utilizado en los programas de mejoramiento del Centro Internacional de la Papa (CIP), compuesto por 5ml de una solución “madre” de ácido bórico a 200ppm, 20g de sacarosa y 0,2ml de polisorbato 20, conocido comercialmente como *Tween20*, completando 100ml con agua destilada. Se ajustó a un pH de 5,5. Se colocaron 4 gotas del medio de cultivo sobre el interior de la tapa de una placa de Petri y sobre ellas se adicionó pequeñas cantidades de polen con la ayuda de una espátula, esparciéndolo con ligeros movimientos circulares. Se preparó una cámara húmeda colocando papel de filtro humedecido con agua destilada cubriendo el fondo de la placa de Petri y se incubaron a una temperatura de 20 a 24°C durante 24 horas. Para la observación de los granos al microscopio, se colocó una gota de yodo-yoduro de potasio (I-KI) en la tapa de la placa de Petri sobre la que se colocaron los granos.
- Medio 2: medio de cultivo empleado por Araméndiz-Tatis *et al.* (2013) en berenjena, constituido por 100g de sacarosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), 500mg de nitrato de calcio [ $Ca_2(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ], 120mg de sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), 100mg de nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) y 120mg de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), disueltos en 1000 ml de agua destilada. Posteriormente se le agregó 10g de agar y se ajustó a pH 6,0. El medio de cultivo fue vertido en cajas de Petri de vidrio de 9,0cm de diámetro y el polen fresco fue disperso en el medio con la ayuda de un pincel. La temperatura de incubación fue de 25°C durante 24 horas.

Respecto a las técnicas de viabilidad por tinción, se optó por la incubación de polen fresco de cada planta PF y PP con azul de anilina en lactofenol al 1% durante 24 horas (Maneval, 1936); mientras que para las plantas MS se incubaron los granos de polen liberados de las flores fijadas para el conteo. El lactofenol se preparó mezclando 20ml de fenol, 40ml de glicerina, 20ml de agua destilada y 20ml de ácido láctico. A 100ml de esta solución, se le incorporó 1-5ml de solución de anilina azul. Típicamente, los granos coloreados de azul muestran altos niveles de viabilidad mientras que los granos de polen inviables se observan sin

coloración. Bajo la lupa Mikova, se contaron en total 300 granos por planta en tres repeticiones de 100 granos cada una y se calculó el porcentaje de viabilidad como  $(N^{\circ} \text{ granos teñidos} / N^{\circ} \text{ granos totales}) \times 100$ . Paralelamente, y con el fin de corroborar a campo la viabilidad del polen de las plantas PP, el capítulo principal y uno secundario de cada planta PP se aisló mediante bolsas de polinización antes de que se produzca la apertura del mismo. En el momento de liberación de polen, los capítulos fueron autofecundados manualmente con pincel y nuevamente tapados con las bolsas de polinización. Así, dos capítulos de cada una de estas plantas PP, fueron autofecundados durante octubre-noviembre 2018 y cosechados en febrero de 2019 para evaluar la producción de semilla.

## 2. RESULTADOS

### 2.1. Desarrollo de la población de mapeo

A partir del cruzamiento de una planta de alcaucil androestéril perteneciente a una variedad experimental local utilizada como progenitor femenino y una variedad de cardo comercial, como progenitor masculino, se obtuvo una población  $F_1$  de 19 individuos fértiles, los cuales fueron autofecundados durante diciembre de 2015 a fin de obtener una población segregante para el carácter en estudio, lográndose una población  $F_2$  de 315 individuos a partir de una única planta  $F_1$  autofecundada.

### 2.2. Identificación fenotípica de individuos fértiles y androestériles en la población $F_2$

Durante la primera evaluación a campo de la población  $F_2$  (315 individuos), realizada en el año 2016, se identificaron 241 plantas fértiles con producción normal de polen (PF); 39 plantas con producción reducida de polen o poco polen (PP) y 35 plantas androestériles (MS).

La misma evaluación se realizó durante el año 2017, donde se mantuvo un stock de 250 individuos, tras la pérdida de 65 plantas de la población  $F_2$ . Durante esta evaluación se identificaron 195 individuos PF, 23 PP y 32 MS. Solo 6 de las plantas que durante la evaluación del año 2016 fueron clasificadas como PP, en el 2017 se clasificaron como MS. Estas plantas fueron descartadas para la conformación de los *bulks* de ADN. Los individuos clasificados como PF o MS durante el primer año de evaluación, mantuvieron la misma condición durante el segundo año.

Ambas segregaciones (observadas durante 2016 y 2017) fueron analizadas mediante una prueba de  $\chi^2$  a fin de determinar el ajuste a una segregación de tipo mendeliano ya sea considerando un único *locus*, dos o tres *loci* en la determinación del carácter. En ambos años ninguna de las segregaciones observadas se ajustaron a las esperadas, teniendo en cuenta las frecuencias de los tres fenotipos (PF, PP, MS).

En relación al conteo de granos de polen por flor, en la tabla 1 se muestran los valores medios y los desvíos estándares (DE) para cada parental y el valor del estadístico empleado (H). Mientras que en la tabla 2 se muestran los mismos parámetros para los tres grupos conformados en la población  $F_2$  (MS, PP y PF). Se observaron diferencias significativas tanto entre los genotipos parentales como entre los tres grupos ( $p$  value < 0.01). Además, para ambos casos, se muestra la relación polen/óvulo (P/O), determinada dividiendo el número de

granos de polen por flor estimado por el único óvulo que presenta la especie (Tablas 1 y 2, respectivamente).

**Tabla 1:** Análisis estadístico para los genotipos parentales. Se muestran valores promedios (media) para el número de granos de polen, desvío estándar (DE), el valor del estadístico de Kruskal Wallis (H) y la relación polen/óvulo (P/O). Con un P value<0,01 (resaltado en negrita) se indican diferencias significativas entre los valores promedios.

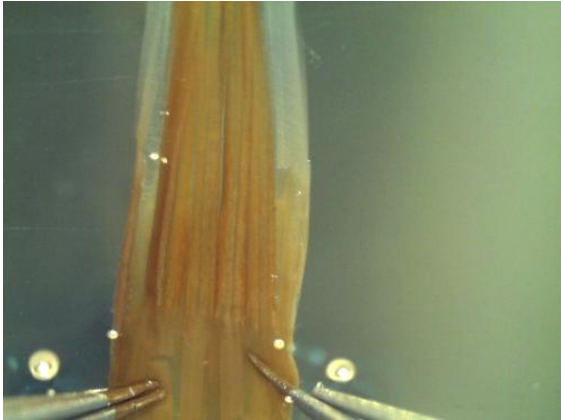
Progenitor	Media	DE	H	P value	P/O
<b>Alcaucil MS</b>	17,78	49,63	14,73	<b>0,0001</b>	17,78/1
<b>Cardo cultivado</b>	5.688,42	2.638,65			5.688/1

**Tabla 2:** Análisis estadístico para los genotipos de los bulks. Se muestran valores promedios (media), desvío estándar (DE), el valor del estadístico de Kruskal Wallis (H) y la relación polen/óvulo (P/O). Con un P value<0,01 (resaltado en negrita) se indican diferencias significativas entre los valores promedios.

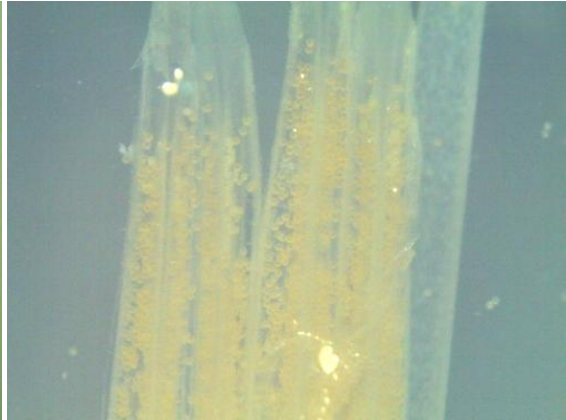
Bulk	Media	DE	H	P value	P/O
<b>MS</b>	2,31	4,20	105,81	<b>0,0001</b>	2,31/1
<b>PP</b>	2.299,56	1.845,39			2.299,56/1
<b>PF</b>	7.049,74	1.688,32			7.049,74/1

La disección de las flores permitió observar un bajo número de granos de polen ( $2,31 \pm 4,20$ ) en las anteras de las plantas androestériles (Fig.13). En contraste, una gran cantidad de granos de polen ( $7.049,74 \pm 1.688,32$ ) se observó en las anteras de las plantas fértiles (Fig.14), mientras que en las plantas poco polen se observó un número intermedio ( $2.299,56 \pm 1.845,39$ ).

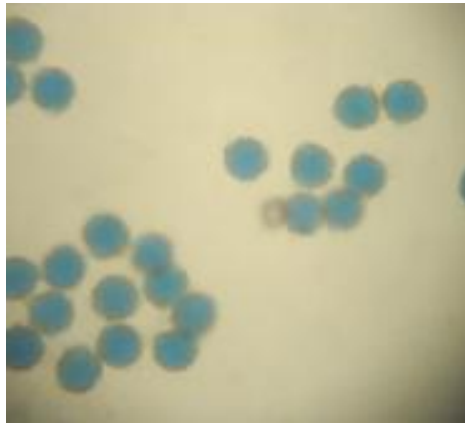
Si bien se probaron distintas condiciones para el cultivo *in vitro* de los granos de polen no se lograron resultados exitosos ya que no se observó desarrollo del tubo polínico en ninguno de los medios de cultivo utilizados. Respecto a la técnica determinación de viabilidad de polen mediante tinción, un 97-99% de los granos de polen de las plantas fértiles se observaron coloreados de azul (Fig.15), mientras que tanto en las plantas poco polen como en las androestériles, el 99% de los granos no se tiñeron (Fig.16), demostrando una baja viabilidad.



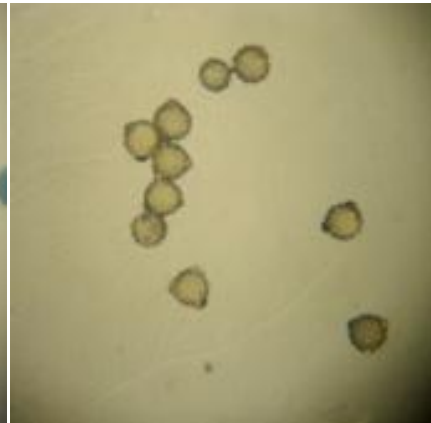
**Fig.13:** Anteras de planta androestéiles.



**Fig.14:** Anteras de una planta fértil.



**Fig.15:** Granos de polen viables, coloreados de azul.



**Fig.16:** Granos de polen no viables, sin teñir.

Luego de las observaciones realizadas bajo lupa (conteo de granos de polen) y el análisis de viabilidad de los granos de polen mediante tinción, las plantas clasificadas como PP fueron consideradas como androestériles, dada la escasa cantidad y prácticamente nula viabilidad del polen producido. Por otra parte, no se observó producción de semillas en ninguno de los capítulos pertenecientes a las plantas PP autofecundadas, corroborando la inviabilidad de dicho polen. De esta manera, considerando solamente dos grupos (PF – MS), se realizó una nueva prueba de  $\chi^2$  considerando sólo estos dos fenotipos. En este caso, las segregaciones observadas en los dos años de evaluación se ajustaron a la esperada para un modelo monogénico dominante (3:1); siendo los valores de 2016: 241 PF : 74 MS ( $\chi^2_{\alpha=0.05}=0.38$ ) mientras que en 2017 se obtuvieron 195 PF : 55 MS ( $\chi^2_{\alpha=0.05}=1.2$ ).

**Tabla 3:** Pruebas de  $\chi^2$  para la segregación mendeliana del tipo 3:1 a la que se ajustó la población en estudio en ambos años. Se muestran valores esperados, observados y el  $\chi^2$  de tabla y calculado para un  $\alpha=0,05$ .

Año de evaluación	PF		MS		$\chi^2$ tabla ( $\alpha=0,05$ )	$\chi^2$ calculado( $\alpha=0,05$ )
	Valor esperado	Valor observado	Valor esperado	Valor observado		
2016	236,25	241	78.75	74	3,81	<b>0,38</b>
2017	187,50	195	62,50	55	3,81	<b>1,20</b>

## **CAPÍTULO II:**

# **Identificación de marcadores moleculares asociados al carácter androesterilidad.**



### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Transferir marcadores moleculares SSR asociados al carácter androesterilidad génica identificados en la especie *Helianthus annuus L* (girasol).
2. Identificar nuevos marcadores moleculares asociados al carácter, mediante la utilización de la estrategia de BSA y la técnica SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*)
3. Determinar las distancias de ligamiento entre el/los marcador/es asociado/s y el/los gen/es que codifica/n el carácter mediante un “*de-bulk*”.
4. Aislar y secuenciar las bandas obtenidas asociadas al carácter en estudio.
5. Comparar las secuencias de dichas bandas con genomas de referencia a fin de realizar análisis genómicos comparativos.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Desarrollo de la población de mapeo

El ADN genómico fue extraído a partir hojas jóvenes de ambos parentales y de los 15 individuos de cada grupo de la población  $F_2$ . Para la extracción fueron utilizados 0,1 g de tejido vegetal, siguiendo el protocolo previsto por el *kit* comercial “*DNeasy plant mini kit*” (QIAGEN). La cuantificación del ADN se llevó a cabo por comparación de las muestras con un marcador de peso molecular de concentración conocida (*Low molecular weight DNA Ladder, New England BioLabs*), mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y posterior tinción con *SYBR-SAFE (Invitrogen)*. A partir de las mismas, se realizaron las diluciones correspondientes para una solución de trabajo de 5 ng/ $\mu$ l. Para la conformación de los grupos de ADN (*bulks*), se tomó 10  $\mu$ l de ADN genómico de cada uno de los 15 individuos por grupo (MS, PF y PP), y se mezclaron en un único tubo por grupo.

### 1.2. Marcadores moleculares de tipo SSR

Dado que el análisis con marcadores de tipo SSR requiere de información previa del genoma y que la especie en estudio no había sido secuenciada al momento de planificar este trabajo de tesis, se realizó un *screening* de iniciadores asociados al carácter androesterilidad génica en la familia *Asteracea*. Se utilizaron cinco marcadores moleculares de tipo SSR identificados hasta la fecha como asociados al carácter en girasol (Chen *et. al.* 2006; Gong *et. al.* 2014). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 4. La reacción de PCR para cada marcador se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo: 15 ng de ADN genómico, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, solución tampón 1X (*buffer*), 2 mM de cloruro de magnesio y 1 U de *Taq* DNA Polimerasa (*Invitrogen*). El protocolo de ciclado fue de: 2 min a 95°C, 10 ciclos de tres pasos: 45 s a 94°C, 45 s a 64°C y 1 min a 72°C, en los siguientes 27 ciclos la temperatura de hibridación descendió a 54°C, finalizando con un paso de elongación de 5 min a 72°C. . Los productos amplificados fueron resueltos por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) a 100W durante un tiempo de 3 horas, previa desnaturalización de los productos a 94°C por 5 min. La visualización de los productos amplificados se realizó mediante tinción con nitrato de plata al 1% según Bassam *et al.* (1991).

**Tabla 4:** Cebadores SSR utilizados en la presente tesis. De izquierda a derecha, se muestra el locus al cual están ligados, el nombre de identificación del marcador SSR, la secuencia de los cebadores directos (F) y reversos (R), la distancia en cM al locus ms, el grupo de ligamiento (GL) donde fueron mapeados y la referencia bibliográfica de cada marcador.

Locus	Marcador	Cebadores	Dist (cM)	GL	Referencia
ms6	ORS807	F: CCGATATTTTGACCGATATTTTGC R: TCTCACCTTCATCTCCTTCC	7,2	16	Gong et al., 2014.
	ORS996	F: CGGTGAGAATAACCTCGGAAGA R: ATCAGTCCTTCAACGCCATTAGT	18,5		Gong et al., 2014.
ms7	ORS608	F: CATGGAAAGCCGAGTTCTCT R: CGTGCGTGATTAACATACCC	2,6	6	Gong et al., 2014.
	ORS1229	F: GAAACAGAGTGAGGCAAACCTTCA R: CAGCGCCGTATCGTATAGAGTAA	9,5		Gong et al., 2014.
ms9	ORS705	F: TCTGCTTCTATGACACGGTTGT R: CACGGTCAACTCCCCTTTA	1,2	10	Chen et al., 2006.

### 1.3. Marcadores moleculares de tipo SRAP

Se utilizaron 72 combinaciones SRAP, generadas a partir de 10 cebadores directos (F) y 10 cebadores reversos (R). Las secuencias de los cebadores SRAP se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Secuencias de cebadores SRAP utilizados.

Cebadores Directos (F)	Cebadores Reversos (R)
<b>Me1:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	<b>Em1:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
<b>Me2:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	<b>Em2:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
<b>Me3:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	<b>Em3:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
<b>Me4:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	<b>Em4:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
<b>Me5:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	<b>Em5:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
<b>Me6:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	<b>Em6:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
<b>Me7:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGTTG-3'	<b>Em7:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'
<b>Me8:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGTGT-3'	<b>Em8:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3'
<b>Me9:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	<b>Em9:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
<b>Me10:</b> 5'-TGAGTCCAAACCGGAC-3'	<b>Em10:</b> 5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'

Cada muestra de amplificación, de volumen final 20  $\mu$ l, consistió en 25 ng de ADN genómico, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, solución tampón 1X (*buffer*), 1,5 mM de cloruro de magnesio y 1 Unidad de *Taq* polimerasa (*Invitrogen*). El protocolo de ciclado fue de: 5 min a 94°C, 5 ciclos de tres pasos: 1 min a 94°C, 1 min a 35°C y 1 min a 72°C, en los siguientes 35 ciclos la temperatura de hibridación se elevó a 50°C, finalizando con un paso de elongación de 10 min a 72°C. Los productos de la amplificación fueron resueltos y visualizados del mismo modo que se detalló para los marcadores SSR. Cada combinación SRAP se evaluó buscando bandas polimórficas entre los parentales y entre los *bulks*. Para cada banda polimórfica identificada, se realizó una nueva amplificación utilizando la misma combinación de cebadores que la generó, pero esta vez, la amplificación de los parentales y de cada uno de los individuos que conforman los grupos (*bulks*) se realizó por separado en tubos independientes (*de-bulk*).

### 1.4. Registro (*scoring*) y análisis de segregación de los marcadores SRAP

Los perfiles generados por los marcadores SRAP fueron considerados como marcadores dominantes (presencia/ausencia de banda) y el *scoring* fue llevado a cabo asignando “1” para la presencia de banda y “0” para su ausencia. Así, cada banda polimórfica fue sometida a dicho análisis, generando una matriz de ceros (0) y unos (1). La matriz generada fue posteriormente codificada de acuerdo a lo indicado en el manual de uso del programa de mapeo JoinMap v4 (Van Ooijen, 2006), para una población  $F_2$ , a fin de realizar los análisis estadísticos posteriores. Los datos fueron sometidos a una prueba de  $\chi^2$  a fin de determinar que marcadores SRAP presentaban segregación de tipo mendeliana. Aquellos marcadores que presentaron un patrón de segregación mendeliano 1:1 ( $\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.05}$ ) o con una ligera desviación ( $\chi^2_{\alpha=0.05} < \chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.01}$ ) se utilizaron para construir un mapa de ligamiento parcial de la región cromosómica circundante al *locus* ms. Los parámetros de mapeo fueron  $LOD_{min}=2.0$ ,  $Rec=0.40$  y la función de Kosambi para determinar las distancias genéticas (Kosambi, 1944). El mapa de ligamiento resultante fue graficado con el software libre MapChartv2.1 (Voorrips, 2002).

Se determinó la frecuencia de recombinación (*r*) entre cada marcador molecular y el *locus* ms, así como también entre aquellos marcadores que fueron mapeados a fin de corroborar el orden de los mismos. El valor de *r* se expresó en porcentaje (%) y se calculó

como: (número de individuos recombinantes/ número de individuos totales) x 100 (Levitus *et al.*, 2010).

### 1.5. Identificación de las secuencias de interés

A partir del análisis de segregación de los marcadores SRAP, se seleccionaron aquellas bandas (marcadores) que fueron identificadas como asociadas al locus de interés. Dichas bandas fueron aisladas de los geles de acrilamida mediante corte con un bisturí estéril, rehidratadas en agua y posteriormente re-amplificadas con el mismo set de cebadores que le dieron origen, utilizando como ADN molde aquel obtenido por re-hidratación de la banda selecta. Los protocolos de amplificación y ciclado fueron los mismos descritos anteriormente para los marcadores SRAP. Las bandas re-amplificadas fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y su tamaño fue estimado mediante la utilización de un marcador de peso molecular (*Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder, Thermo Fisher*). Los fragmentos re-amplificados fueron secuenciados por *Macrogen* Corea.

A partir del mismo análisis, fueron identificados los dos marcadores más cercanos al gen de interés. Se realizó una nueva PCR utilizando el mismo set de cebadores que le dieron origen a cada uno de ellos, pero en este caso se utilizó sólo el ADN de los parentales, y se resolvió en un gel de agarosa al 1% con el fin de recuperar las bandas de interés que fueron identificadas por su peso mediante comparación visual con el marcador de peso molecular (*Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder, Thermo Fisher*). Estas bandas fueron diluidas 1:500 para evitar amplificación de bandas no deseadas y, posteriormente, se procedió a la re-amplificación. El protocolo de ciclado en este caso fue de: 5 min a 94°C, 25 ciclos a 50°C, finalizando con un paso de elongación de 10 min a 72°C. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1,5% para comprobar que la banda deseada haya sido amplificada. Se seleccionaron los productos de PCR en los cuales se observó únicamente la banda de interés y, a partir de éstos, se comenzó con el proceso de clonación de dichas bandas.

Las reacciones de ligación y transformación, se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo descrito para el vector de clonación *pGEM®-T Easy, Promega* (Fig. 17). La reacción de ligación, en la cual se incluye el buffer de ligación, la T4 ADN ligasa y el producto de PCR, se realizó mediante incubación a 4°C durante toda una noche. En total se realizaron dos reacciones de ligación, cada una correspondiente a cada marcador seleccionado. Al día siguiente, se colocaron 2µl de la reacción de ligación en tubos *Eppendorf* de 1,5ml junto con las

células competentes (*E. coli*), se mezclaron cuidadosamente girando la punta del *tip*, sin pipetear y se incubaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  (en hielo) durante 30 minutos. Luego de este periodo, se aplicó un shock térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  (en baño térmico) durante 45 segundos, y posteriormente los tubos *Eppendorf* fueron nuevamente colocados en hielo. A cada tubo se adicionaron  $200\mu\text{l}$  de SOC (medio de caldo super-óptimo con represión por catabolito) y se incubaron en agitación constante a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.

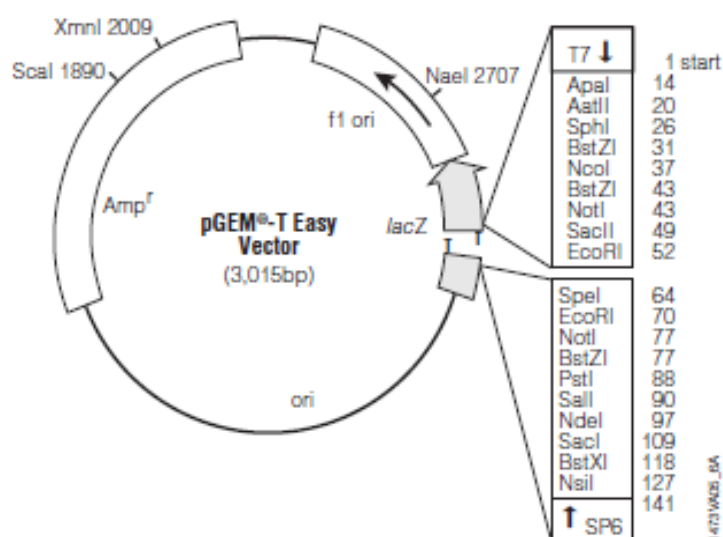


Fig. 17: Mapa del vector de clonación utilizado en el presente trabajo.

Posteriormente, se seleccionaron 20 colonias de las placas de Petri para cada inserto clonado y se realizó una amplificación de las mismas por PCR a fin de corroborar que el tamaño del inserto sea el adecuado. Los fragmentos amplificados fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Se seleccionaron hasta cinco colonias que contenían el inserto de interés (de acuerdo a su tamaño) y se aislaron los vectores de las bacterias siguiendo el protocolo del kit comercial *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit / Spin Protocol* (Omega BIO-TEK).

Para el aislamiento de los vectores, se hicieron crecer cada una de las cinco colonias seleccionadas en un tubo *Falcon* de 15ml conteniendo 5 ml de medio LB líquido + ampicilina

[50ng/μl], a 37°C en agitación constante durante 12-16 horas. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13.500 rpm durante 1 min y se descartó el sobrenadante. En cada tubo se adicionaron 250μl de la solución I/RNase A, mezclando vigorosamente con vortex, hasta la completa resuspensión del pellet. Cada una de las suspensiones fue transferida a tubos *Eppendorf* 1,5 ml, a los que se adicionó 250μl de la solución II provista por el kit, mezclando suavemente por inversión. Posteriormente, se adicionó 350μl de solución III del kit e inmediatamente se invirtieron los tubos varias veces hasta la formación de un precipitado de coloración blanca. Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad (15.000 rpm) durante 10 minutos, hasta observar la formación de pellet compacto. El sobrenadante se colocó cuidadosamente dentro de la columna proporcionada por el kit, en un tubo colector de 2ml. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto, se descartó el filtrado del tubo colector y se reutilizó dicho tubo. Se adicionaron 500μl de HBC solución tampón a cada columna en su tubo colector y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto. Se descartó el filtrado de cada tubo colector y nuevamente se reutilizó el tubo colector. Se agregaron 700μl de solución tampón de lavado, se centrifugó a 15000 rpm durante 1 minuto. Se repitió el paso de lavado una vez más. Por último, se centrifugó la columna sin el tubo colector a máxima velocidad durante 2 minutos y posteriormente se la transfirió a un nuevo tubo *Eppendorf* 1,5ml. Se adicionó 50μl de agua destilada estéril en el centro de la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y posteriormente centrifugó a 15000 rpm por 1 minuto. Finalmente, los productos fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Los productos obtenidos fueron cuantificados en fluorómetro Qubit 2.0 (Qubit™ dsDNA HS Assay Kits Invitrogen) con el fin de que cada muestra que se utilizaría para secuenciación, contuviera, al menos, 500ng de ADN. Las muestras fueron secuenciadas en BMR *Genomics*, Padua (Italia).

El análisis de bioinformática de homología de las secuencias, tanto de aquellas obtenidas a partir de los productos de PCR como aquellas generadas por clonado, se realizó con el programa NCBI BLASTN 2.9.0 (versión libre, Zhang *et al.* 2000). Todas las secuencias obtenidas fueron comparadas con el único genoma de referencia de la especie disponible hasta el momento ([www.artichokegenome.unito.it](http://www.artichokegenome.unito.it)).

## 2. RESULTADOS

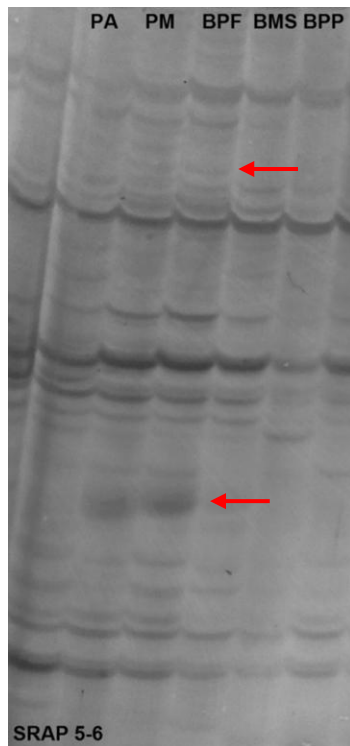
### 2.1. Marcadores moleculares SSR

Se evaluaron 5 marcadores SSR ligados al gen de androesterilidad en girasol y si bien se probaron varias condiciones de amplificación y ciclado para la reacción de PCR, solo se logró la amplificación del marcador ORS 608. Esta combinación de cebadores, se amplificó mediante una PCR tanto en ambos parentales como en todos los individuos conformantes del BSA, sin embargo no se obtuvieron resultados exitosos en la transferencia de dicho marcador, dado que no se observó polimorfismo entre los parentales ni en los individuos segregantes evaluados.

### 2.2. Marcadores moleculares SRAP

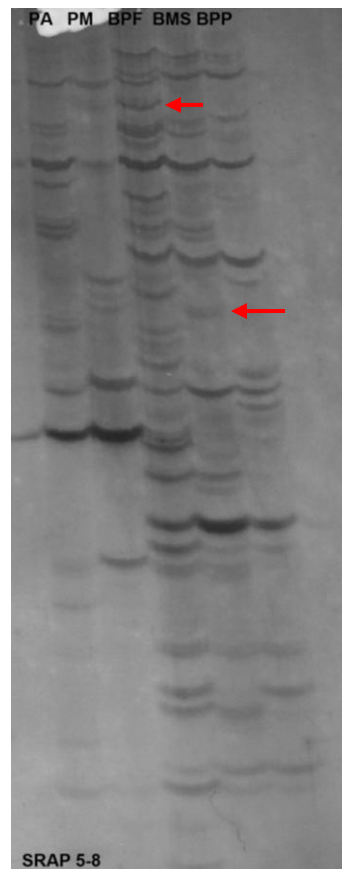
A fines de obtener bandas polimórficas (marcadores) entre los parentales y entre los grupos BSA, fueron evaluadas un total de 72 combinaciones de cebadores SRAP (ver tabla en ANEXO), de las cuales sólo fueron analizadas aquellas combinaciones donde fue posible obtener amplificado y bandeo de lectura inequívoca en todas las muestras (ambos parentales y los grupos BSA, un ejemplo se muestra en las figuras 18 y 19. Estas 14 combinaciones permitieron generar un total de 110 bandas (entre 3 y 25 por combinación), cuyos tamaños oscilaron en el rango de 100 a 2000pb. Trece de las 110 bandas generadas resultaron polimórficas entre los parentales y entre los *bulks* de plantas fértiles y androestériles. Las mismas fueron generadas por ocho combinaciones de cebadores (Me1-Em6, Me1-Em7, Me1-Em8, Me4-Em9, Me5-Em5, Me5-Em6, Me5-Em8, Me7-Em10).



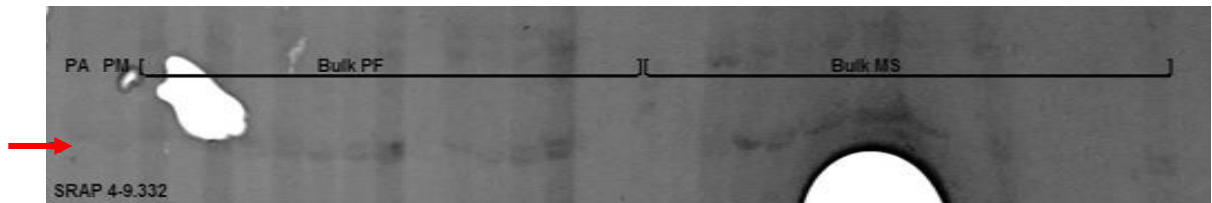


**Fig. 18:** Gel SRAP combinación Me5-Em6 evaluada en parentales y bulks. Con flechas rojas se observan algunas bandas polimórficas. **PA:** parental androestéril, **PM:** parental masculino fértil; **BPF,** Bulk polen fértil; **BMS:** Bulk androestériles; **BPP:** Bulk poco polen.

**Fig. 19:** Gel SRAP combinación Me5-Em8 evaluada en parentales y bulks. Con flechas rojas se observan algunas bandas polimórficas. **PA:** parental androestéril, **PM:** parental masculino fértil; **BPF,** Bulk polen fértil; **BMS:** Bulk androestériles; **BPP:** Bulk poco polen.



Dichas combinaciones seleccionadas se re-amplificaron y se evaluaron tanto en los genotipos parentales como en cada uno de los individuos F<sub>2</sub> que constituyeron los *bulks* fértil PF y androestéril MS. En este análisis *de-bulk* cinco de las trece bandas polimórficas estuvieron asociadas al gen *ms*, ya sea porque se observaron en el progenitor masculino (fértil) y los individuos del *bulk* PF mientras que estaba ausente en el progenitor femenino (androestéril) y en los individuos del *bulk* MS o viceversa (Fig. 20).



**Fig. 20:** *De-bulk* combinación Me4-Em9, banda correspondiente al marcador llamado SRAP4-9.332 donde se observa una banda presente en el parental masculino (fértil) y en los individuos del *bulk* fértil; mientras que está ausente en el parental androestéril y en los individuos del *bulk* androestériles (se observan algunos recombinantes).

Las 8 bandas restantes, se descartaron en el *de-bulk* por no presentar polimorfismo consistente entre los parentales y los *bulks* PF y MS. Los marcadores asociados fueron denominados como SRAP, seguido del número de combinación que le dio origen y su peso molecular en pares de bases (pb). El marcador SRAP 7-10.1774, asociado al parental fértil y al *bulk* PF, fue generado por la combinación de cebadores Me7-Em10 y presentó un tamaño aproximado de 1774pb. La banda SRAP 5-8.300, también asociado al parental fértil y *bulk* PF, fue generado por la combinación Me5-Em8 con un tamaño de 300 pb. Los tres marcadores restantes fueron originados por la combinación Me4-Em9 (SRAP 4-9.600, SRAP 4-9.700 y SRAP 4-9.332) con tamaños aproximados de 600, 700 y 332pb, respectivamente. Los marcadores SRAP 4-9.600 y SRAP4-9.700 estuvieron asociados al parental androestéril y al *bulk* MS, mientras que el marcador SRAP 4-9.332 presentó asociación con el parental fértil y el *bulk* PF.

Estos cinco marcadores, fueron sometidos a una prueba de  $\chi^2$  con el fin de comprobar si se ajustaban a una segregación de tipo mendeliana 1:1 (Tabla 6). Los marcadores SRAP 7-10.1774, SRAP 4-9.600 y SRAP 4-9.332 se ajustaron consistentemente a una segregación monogénica ( $\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.05}$ ) mientras que los marcadores SRAP 5-8.300 y SRAP 4-9.700 presentaron una distorsión menor en su segregación ( $\chi^2_{\alpha=0.05} \leq \chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.01}$ ). Las frecuencias de recombinación (r), expresadas en porcentaje, entre cada marcador molecular y el locus *ms*

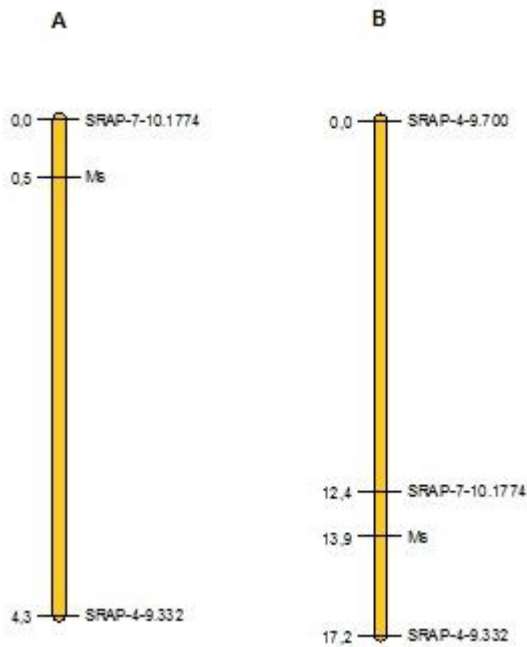
fueron de 3,3% para SRAP 7-10.1774, 10% para SRAP 4-9.332, 16,6% para SRAP 4-9.700, 40% para SRAP 5-8.300 y 43,3% para SRAP 4-9.600.

Tanto los datos fenotípicos como los moleculares fueron utilizados para realizar un análisis de ligamiento sobre la región del locus ms usando el programa JoinMapv4.0, a un  $LOD_{min}= 2$  y un  $Rec= 0.40$ . En primer lugar, solo se incluyeron los datos fenotípicos y los marcadores que no presentaron distorsión de la segregación. De esta manera, el análisis de ligamiento mostró que el locus ms está flanqueado por los marcadores SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332 a 0,5 y 4,3 cM de distancia (Fig.22a). En una segunda instancia, se incluyeron aquellos marcadores que presentaron una menor distorsión, siempre y cuando, al incluirlos, no se modificara la posición de los marcadores fijados anteriormente. En este punto, se observó que el marcador SRAP 4-9.700 se encontró ligado al locus ms a 13.9 cM (Fig.22b). El ligamiento del marcador SRAP 7-10.1774 al locus ms se observó aun utilizando un  $LOD=5.0$ , mientras que los marcadores SRAP 5-8.300 y SRAP 4-9.600 no fueron incluidos en el mapa de ligamiento. Por último, se realizó un análisis de ligamiento de a pares determinando la distancia entre los 3 marcadores moleculares mapeados a partir de su frecuencia de recombinación (tabla 7). Se observó que la mayor distancia entre marcadores fue entre SRAP 4-9.700 y SRAP 4-9.332 (30 cM), mientras que la menor distancia se presentó entre SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332 (6,6 cM). Por su parte la distancia entre los marcadores SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.700 fue de 10 cM.

**Tabla 6:** Análisis estadístico de los marcadores SRAP asociados al locus ms. Nombre el marcador, combinación de cebadores que lo generó, tamaño estimado del mismo (pb), fenotipo al que se asocia, número de individuos en el que fue probado, número de individuos donde se detectó su presencia (Valor Observado), prueba de  $\chi^2$ , frecuencia de recombinación en porcentaje (%r), distancia al locus ms (cM) estimado a partir del análisis de mapeo.

Marcador SRAP	Combinación de cebadores	Tamaño (pb)	Fenotipo asociado	n	Valor Obs.	$\chi^2$ (p=0.05)	%r	cM
SRAP 7-0.1774	Me7-Em10	1774	Fértil	30	11	1.0	3,3	0.5
SRAP 5-8.300	Me5-Em8	300	Fértil	30	6	5.4*	40	-
SRAP 4-9.600	Me4-Em9	600	MS	30	10	1.6	43,3	-
SRAP 4-9.700	Me4-Em9	700	MS	30	7	4.3*	16,6	13.9
SRAP 4-9.332	Me4-Em9	332	Fértil	30	10	1.6	10	4.3

\*Marcadores que muestran una leve distorsión ( $\chi^2_{\alpha=0.05} < \chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.01}$ ).



**Fig. 22a:** Mapa de ligamiento genético del locus (ms) y los dos marcadores SRAP flanqueantes que no presentaron distorsión en su segregación.

**Fig. 22b:** Mapa de ligamiento de la misma región incluyendo en el análisis al marcador SRAP 4-9.700 (distorsionado).

Las distancias de mapeo se muestran en cM sobre la línea vertical izquierda.

**Tabla 7:** Análisis de ligamiento de a pares entre los marcadores mapeados. Nombre de los marcadores comparados, número de individuos recombinantes observados (Ind. Rec.), frecuencia de recombinación en porcentaje (%r), distancia entre marcadores (cM) estimada a partir del %r.

Par de marcadores	SRAP 7-10.1174 SRAP 4-9.700	SRAP 7-10.1774 SRAP 4-9.332	SRAP 4-9.700 SRAP 4-9.332
<b>Ind. Rec.</b>	3	2	9
<b>%r</b>	10	6,6	30
<b>Dist. (cM)</b>	10	6,6	30

### 2.3. Secuenciación y análisis de secuencias

Los cinco marcadores de interés (SRAP 7-10.1774, SRAP 5-8.300, SRAP 4-9.600, SRAP 4-9.700 y SRAP 4-9.332), fueron recuperados del gel de poliacrilamida, re-amplificados, con el mismo par de cebadores que le dio origen y secuenciados. Dichas secuencias se analizaron con la herramienta bioinformática BLAST con el objetivo de identificar funciones putativas en el reino vegetal.

El resultado del alineamiento reveló que el marcador SRAP 4-9.700 presenta una alta identidad de secuencia con dos accesiones que corresponden a un mismo transportador de sulfato 4.1 en *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (Accession no. XM\_025137078.1 y XM\_025114421.1) (Fig.23a y b). La secuencias presentaron un porcentaje de similitud del 100% para la accesión XM\_a25137078.1, mientras que para XM\_025114421.1 fue del 87% con 8 *gaps*, correspondiendo a alineamientos desde la base 2132 hasta la 2202 (70 bases alineadas) y desde la base 160 hasta la 1960 (1800 bases alineadas), respectivamente. Homología con el mismo transportador de sulfato pero de otras especies tales como lechuga (similitud de 89%) y girasol (similitud del 94%) fueron también observadas al realizar el alineamiento de la secuencia SRAP 4-9.700 (Figura 24 y 25).

Mientras que las restantes cuatro secuencias no presentaron alineamiento dentro del género así como tampoco en el taxón de las angiospermas.

**PREDICTED: Cynara cardunculus var. scolymus sulfate transporter 4.1, chloroplastic mRNA**

Sequence ID: [XM\\_025137078.1](#) Length: 2202 Number of Matches: 1

Range 1: 2132 to 2202 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
132 bits(71)	6e-30	71/71(100%)	0/71(0%)	Plus/Plus
Query 14	AAGCAAAAGGTAGATTTCAATCTAGTGTTTGAAGTTATTATGCTTTCAACCGTGAGTCAT	7		
Sbjct 2132	AAGCAAAAGGTAGATTTCAATCTAGTGTTTGAAGTTATTATGCTTTCAACCGTGAGTCAT	2		
Query 74	GTGAAAACACA	84		
Sbjct 2192	GTGAAAACACA	2202		

**Fig. 23a:** Alineamiento BLAST del marcador SRAP 4-9.700 con mayor porcentaje de homología de secuencia.

**PREDICTED: Cynara cardunculus var. scolymus sulfate transporter 4.1, chloroplastic-l mRNA**

Sequence ID: [XM\\_025114421.1](#) Length: 2384 Number of Matches: 1

Range 1: 160 to 1916 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1982 bits(1073)	0.0	1534/1763(87%)	8/1763(0%)	Plus/Plus
Query 93	TTTGTCCGGATGGAGAGCGAAATTGCAGGGGATGAAGATGATTGATTGGATTGAGGCCTT	1		
Sbjct 160	TTT-TCGAGATGGAGAACGAAGATGAAGCGGATGAAAACGGTTGATTGGATTGATTCTT	2		
Query 153	TCTCCCTTGTTCACGTTGGATTCGTACCTACAATTGGCGTGAATATCTCCAGCCTGACAT	2		
Sbjct 219	CCTCCCTTGTTCACGTTGGATTCGTACTTATAATTGGCATGAAAATCTCCAGCCTGACCT	2		
Query 213	GGTTTCCGGTATCACTGTTGGTATCATGCTCGTGCCACAGTCTATGTCATATGCAAAGCT	2		
Sbjct 279	CATCTCCGGCGTCACAGTCGGGATCATGCTCGTTCCTCAGTCTATGTCATATGCAAAGCT	3		
Query 273	AGCTGGACTTCAACCAATATATGGACTTTATACTGGATTAGTGCCTATATTTGTGTATGC	3		
Sbjct 339	TGCTGGACTTCAACCAATATATGGACTTTATACTGGATTAGTTCCTGTATTGTGTATTC	3		

Fig. 23b: Alineamiento BLAST del marcador SRAP 4-9.700 con 87% de homología de secuencia.

**PREDICTED: Lactuca sativa sulfate transporter 4.1, chloroplastic-like (LOC111888961)**

Sequence ID: [XM\\_023885092.1](#) Length: 2331 Number of Matches: 1

Range 1: 186 to 2184 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2507 bits(1357)	0.0	1789/2000(89%)	20/2000(1%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAGGACGCCGACGAATCGTACGGTAAAAGTCATCCCGTTTCAACATTCGTATACTAGC	6		
Sbjct 186	ATGAGGACGCCAACGAATCGAATCGTAAAGTCATACCGTTTCAACACTCGTATACTGGC	2		
Query 61	GGAGA---TACGACGCCGGCCACGTGTTTCGTCTTC---TT---TGTCGGGATGGAGAGCG	1		
Sbjct 246	GGAGATAGTACTACACGGCGACATCTTCGTCTTCCTCTTCGATGTCGAGATGGAGTGCG	3		
Query 112	AAATTGCAGGGGATGAAGATGATTGATTGGATTGAGGCCTTTCTCCCTTGTTCACGTTGG	1		
Sbjct 306	AAGTTGAATCGGATGAAGATGATTGATTGGATTGAGCTTTTCTCCCTTGTTCACGTTGG	3		
Query 172	ATTCGTACCTACAATTGGCGTGAATATCTCCAGCCTGACATGGTTTCCGGTATCACTGTT	2		
Sbjct 366	ATTCGGACATACAATTGGCGGAGAATATCTCCAGCCTGATCTAGTCTCCGGTGTACCCGTC	4		

Fig. 24: Alineamiento BLAST del marcador SRAP 4-9.700 con 94% de homología de secuencia con el mismo transportador de sulfato en Girasol.



**PREDICTED: Helianthus annuus sulfate transporter 4.1, chloroplastic-like (LOC11087:**

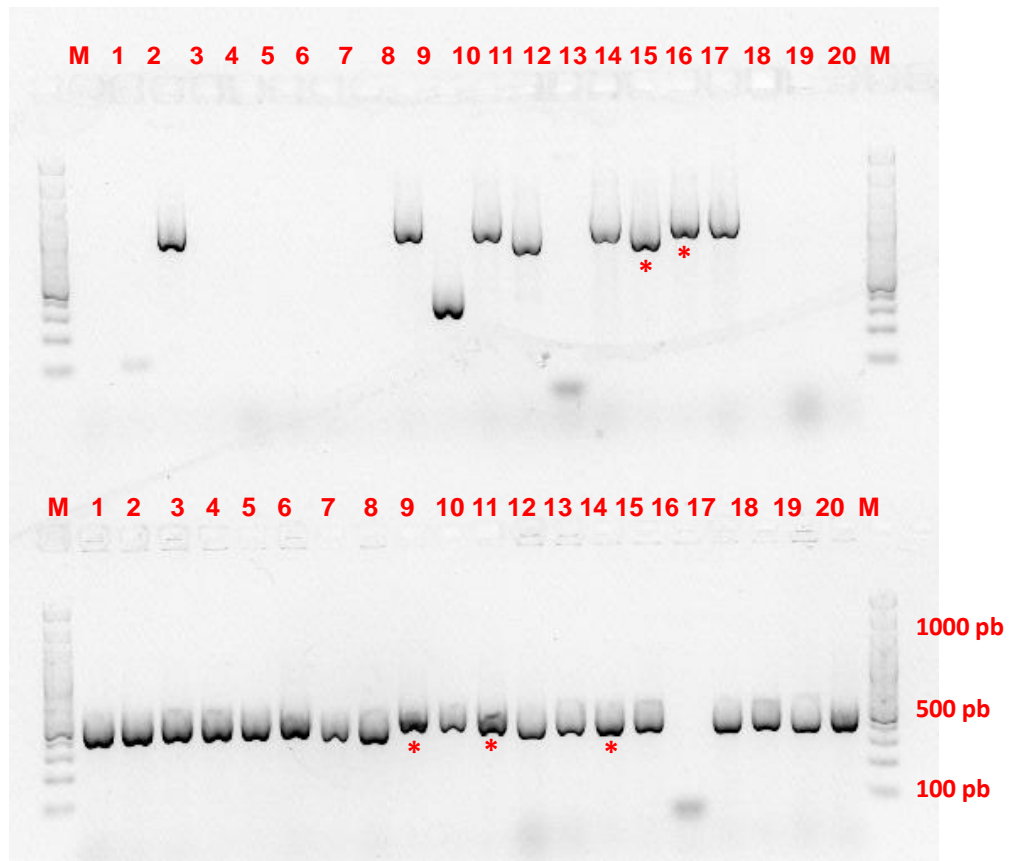
Sequence ID: [XM\\_022121349.1](#) Length: 2561 Number of Matches: 1

Range 1: 285 to 2344 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2302 bits(1246)	0.0	1804/2077(87%)	24/2077(1%)	Plus/Plus
Query 1		ATGAGGACGCCGACGAATCGTACGGTAAAAGTCATCCCGTTTCAACATTCGTATACTAGC		6
Sbjct 285		ATGAGGACGCCGACGAATCGTACGGTCAGAATCATTCCGTTTCAACTCGTACAGCACC		3
Query 61		GGAGATACGACGCCGCCACGTGTTTCGTCTTCTTTGTCTGGGATGGAGAGCGAAATTGCAG		1
Sbjct 345		GGTG--GCGA-TAC-G--AC--G-CCG--TT-GTTGTCGAGATGGCGGGAGAAATTGGAG		3
Query 121		GGGATGAAGATGATTGATTGGATTGAGGCCCTTCTCCCTTGTTTACGTTGGATTTCGTACC		1
Sbjct 393		CGGATGAAGGTGATTGACTGGATTGAGATGTTTGTACCTTGCTCACGGTGGATTTCGGACC		4
Query 181		TACAATTGGCGTGAATATCTCCAGCCTGACATGGTTTCCGGTATCACTGTTGGTATCATG		2
Sbjct 453		TACAATTGGCGCAATATCTTCAACCGGACTTAGTTTCCGGTGTACCGTCCGGAATTATG		5

**Fig. 25:** Alineamiento BLAST del marcador SRAP 4-9.700 con 89% de homología de secuencia con el mismo transportador de sulfato en Lechuga.

Por otro lado, los productos de PCR correspondientes a los marcadores más cercanos al *loci* de interés, SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332 fueron seleccionados y clonados exitosamente mediante un vector biológico. En la figura 26, se puede observar el gel de agarosa al 1,5% en el cual se corroboró la correcta inserción del ADN exógeno en el genoma del plásmido. En la parte superior de dicha figura, se muestran los productos de PCR de aquellas colonias que contenían el inserto de 1774 pb correspondiente al marcador SRAP 7-10.1774, mientras que en la parte inferior se observan aquellas que contenían el fragmento de 332 pb correspondiente al marcador SRAP 4-9.332. Con un asterisco rojo (\*) se señalan las colonias seleccionadas, de acuerdo a su peso molecular para la purificación de los plásmidos y posterior secuenciación del fragmento de ADN de interés.



**Fig. 26:** Chequeo de clonación. (\*) Colonias seleccionadas para purificación y secuenciación.

La figura 27 muestra el gel de agarosa al 1% como testeo de la correcta purificación de los plásmidos, los dos primeros \* de izquierda a derecha corresponden a los que contienen el inserto de 1774 pb y los tres siguientes corresponden a los que contienen el fragmento de 332 pb.



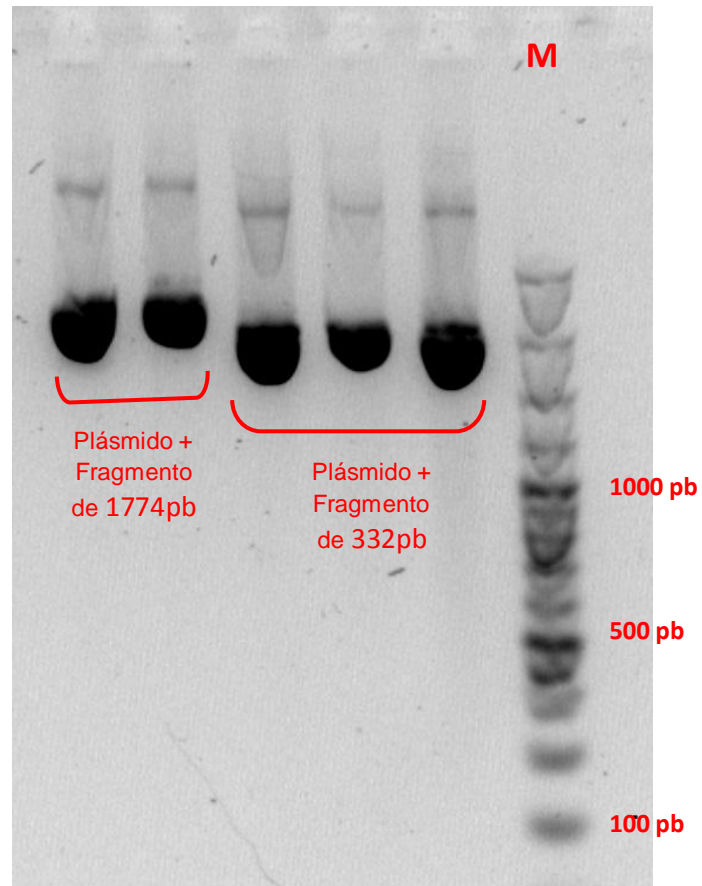


Fig. 27: Purificación de los plásmidos.

Una vez purificados los plásmidos de acuerdo al protocolo previamente descrito en materiales y métodos, las muestras fueron enviadas al servicio de secuenciación de *BMR Genomics*, Padua (Italia).

Los datos de las secuencias obtenidas, se sometieron a análisis bioinformático. Las secuencias fueron inicialmente analizadas mediante pruebas de calidad utilizando el programa *Chromas 2.6.6* (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>), de manera tal de eliminar errores en la asignación de bases o bien fragmentos de secuencias correspondientes al vector de clonación.

La secuencia del inserto correspondiente al marcador SRAP 7-10.1774 de 1774 pb obtenido mediante el set de cebadores SRAP Me7-Em10, no presentó homología dentro del género al ser analizado con BLAST. Cuando la secuencia se comparó con el genoma de

referencia de la especie ([www.artichokegenome.unito.it](http://www.artichokegenome.unito.it)), se observó homología con un gen ubicado en el grupo de ligamiento 13 que contiene un dominio CHORD (*Cysteine and Histidine-Rich Domain*) aunque la función de la proteína que codifica es aún desconocida.

Por otro lado, la secuencia obtenida a partir del marcador SRAP 4-9.332 de 332 pb, generada por la combinación SRAP Me4-Em9, tanto al buscar homología dentro del género mediante la herramienta BLAST como con el genoma de referencia, presentó una alta similitud de secuencia (mayor al 90%) con una proteína poligalacturonasa ubicada en el grupo de ligamiento 4 y 15 del genoma de referencia de la especie (Fig.29).

**PREDICTED: *Cynara cardunculus* var. *scolymus* probable polygalacturonase At3g15720 mRNA**

Sequence ID: [XM\\_025109246.1](#) Length: 1239 Number of Matches: 2

Range 1: 724 to 835 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
202 bits(109)	1e-50	111/112(99%)	0/112(0%)	Plus/Plus
Query 257	AGTGTGGGAAGCCTTGGAAGAAATGGCAAAACAGACATTGTACGTAATGTTACAGTTATC	31		
Sbjct 724	AGTGTGGGAAGCCTTGGAAGAAATGGCAAAACAGATATTGTACGTAATGTTACAGTTATC	78		
Query 317	AACACCACGTTACCGCCACTCAAAATGGAGCTCGAGTCAAACCGTACCGG	368		
Sbjct 784	AACACCACGTTACCGCCACTCAAAATGGAGCTCGAGTCAAACCGTACCGG	835		

**Fig. 29:** Alineamiento BLAST del marcador SRAP 4-9.332.

## DISCUSIÓN

Comprender los diferentes mecanismos de esterilidad masculina, ha sido de gran interés tanto para investigadores como para mejoradores de una amplia variedad de cultivos. Este interés radica en la necesidad de contar con un sistema de androesterilidad efectivo para la generación de materiales híbridos, especialmente en especies moniocas, autocompatibles, disminuyendo así los costos de producción de semillas y la posibilidad de explotar la heterosis cuando la especie en cuestión así lo permite (Naresh *et al.*, 2018).

Si bien la androesterilidad génica en alcaucil ha sido reportada anteriormente, considerando un único locus (Principe, 1984; Basnizky y Zohary, 1994 y 1998) o dos *loci* (Stamigna *et al.*, 2004; López Anido *et al.*, 2016) que en estado recesivo rigen la manifestación del carácter, el conocimiento actual en cuanto a la bases genéticas de dicho fenómeno y la localización de la/s región/es génica/s responsable/s de la androesterilidad en el genoma de la especie es aún desconocido.

A través de sucesivos años de evaluación de las accesiones presentes en el banco de germoplasma del programa de mejoramiento genético de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), se detectaron individuos pertenecientes a diversas accesiones de alcaucil que mostraron aborto de los granos de polen o anteras estériles. Si bien la frecuencia de dichos individuos observada a campo en dos poblaciones ( $F_2$  y  $BC_2$ ) derivadas del cruzamiento inicial entre un individuo androestéril y otro androfértil presentes en dicho banco de germoplasma, permitió a López Anido *et al.* (2016), establecer que dos *loci* con epistasis simple recesiva eran los responsables de la expresión del carácter, la fuente de androesterilidad no había sido evaluada exhaustivamente hasta el momento.

Con el objetivo de establecer un marco genético que permita la identificación de marcadores moleculares asociados a la androesterilidad génica en *C. cardunculus* L., de manera tal de delinear una adecuada estrategia de mejoramiento de la especie asistida por marcadores (MAS), tendiente a la obtención de individuos androestériles, se procedió al desarrollo de una población segregante para el carácter en estudio, la cual fue caracterizada fenotípica y genéticamente mediante distintas herramientas de evaluación.

Dicha población segregante fue obtenida a partir del cruzamiento entre un clon de alcaucil identificado como androestéril y una variedad comercial de cardo cultivado, ambas accesiones pertenecientes al banco de germoplasma institucional. La elección de estos progenitores se basó en las premisas de que, hasta la fecha, solo se ha reportado androesterilidad de tipo génica en la variedad *scolymus* y que la expresión de este carácter está determinada por gene/s recesivo/s (Principe, 1984; Basnizky y Zohary, 1998; Stamigna *et al.*, 2004; López Anido *et al.*, 2016). Por tanto, es de esperar que, en el progenitor cardo (androfértil) dicho/s gen/es se encuentren en estado homocigota dominante mientras que la variedad de alcaucil (androestéril) sería portadora de los genes en estado recesivo. De esta forma, en la generación F<sub>2</sub> debería obtenerse una segregación correspondiente a la de un “monohíbrido” o “dihíbrido”, según se trate de uno o dos genes.

Los individuos de la población segregante obtenida fueron evaluados fenotípicamente a campo en cuanto a su producción de polen, durante dos años consecutivos a fin de minimizar la influencia ambiental que puede presentarse en dicho carácter (Nishiyama, 1984; Hamaoka, *et al.*, 1991; Raja *et al.*, 2019), estableciéndose tres grupos constituidos por 1) individuos con producción normal de polen (PF), 2) individuos con menor o poca producción de polen (PP) y 3) individuos sin producción de polen (MS).

A fin de que los grupos no sean conformados por mera observación a campo, se procedió a establecer un protocolo de cuantificación de los granos de polen. El conteo de granos de polen en esta especie resulta complejo, especialmente en lo que respecta a la disección de las flores dado el pequeño tamaño de las mismas. Todos los estudios previos referidos al estudio de la androesterilidad y producción de polen en alcaucil solo fueron realizados mediante evaluaciones visuales a campo (Principe 1984, López Anido *et al.*, 2016), siendo el presente trabajo el primer reporte de cuantificación de granos de polen en la especie. Este conteo permitió observar diferencias significativas en cuanto al número de granos de polen tanto entre los parentales como entre los tres grupos definidos en la F<sub>2</sub>, lo que permitió corroborar la correcta conformación de los grupos. En las plantas hermafroditas con flores bisexuales (o perfectas) el número promedio de granos de polen por flor y la relación P/O tienen una correspondencia directa con el sistema reproductivo y consecuentemente también en la formación de semillas (Burd, 1994). Esta relación refleja la probabilidad de que suficientes granos de polen presentes en cada estigma asegure una producción máxima de semillas

(Cruden, 1977). Para las plantas con poco polen (2.299,56/1) y las plantas androestériles (2,31/1) observadas en esta tesis, la relación P/O sería insuficiente para permitir la formación de semilla por autofecundación.

La evaluación de la viabilidad de los granos de polen mediante tinción ha sido aplicada en la especie por diferentes autores. Stamigna *et al.* (2004) y Bianco *et al.* (2011), mediante tinción con acetocarmín, observaron que en las plantas consideradas androestériles, los pocos granos de polen producidos permanecían sin teñir, mientras que en las plantas fértiles se observaba un porcentaje de tinción superior al 97% de los granos. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo de tesis donde el 97-99% de los granos de polen de plantas fértiles fueron teñidos mediante azul de anilina al 1%. Asimismo, ambos trabajos también reportan un menor tamaño (diámetro) de los granos de polen inviables. Si bien el tamaño de los granos de polen no fue evaluado en el presente trabajo, fue posible observar el tamaño marcadamente menor de los granos no teñidos (estériles) en comparación con los fértiles.

Estudios de conteo de polen y viabilidad por tinción han sido realizados también en otras especies de la familia *Asteraceae*, como es el caso del girasol para evaluar la androesterilidad inducida por herbicidas (Ochogavía *et al.*, 2018). Estos autores utilizaron similares técnicas de conteo y análisis de viabilidad por tinción a las descritas en la presente tesis y observaron un significativo decrecimiento en la producción de polen en un genotipo de resistencia intermedia a IMI (herbicidas sulfonilureae imidazolinona). Por otra parte, análisis de viabilidad por tinción han sido utilizados en malezas al evaluar una población natural de *Brassica rapa* en la se encontraron híbridos con resistencia a herbicidas por estar cercanos a un cultivo de *B. napus* resistente a la imidazolinona (Ureta *et al.*, 2017). Dichos autores evaluaron viabilidad de polen con diferentes tinciones propuestas por Alexander (1980) y observaron que las plantas encontradas como fuera de tipo mostraron una viabilidad reducida del polen, con una media de 68,6% y valores mínimos cercanos a 30%. Por el contrario, el polen de plantas normales era completamente viable, así como el polen de *B. rapa* y *B. napus* que mostraron 100% de viabilidad. Un análisis semejante para clasificar plantas androestériles y fértiles evaluando la forma y la viabilidad de granos de polen, fue llevada a cabo por Joshi (2002) al trabajar con líneas de arroz portadoras de androesterilidad núcleo-citoplasmática mediante tinción de los granos de polen con solución al 1% de iodo-ioduro de potasio (I-IK). En este caso, los granos de

polen fueron clasificados como: estéril marchito sin teñir, estéril esférico sin teñir, parcialmente redondo teñido estéril y teñido redondo fértil, en función de su forma, tamaño y extensión de la tinción, estableciendo así, un sistema de categorización de polen simple y práctico para caracterizar germoplasmas.

En relación al análisis de viabilidad *in vitro*, no se logró poner a punto un medio de cultivo adecuado durante el desarrollo de la presente tesis. De acuerdo a Kearns e Inouye (1993) la germinación *in vitro* de especies pertenecientes a la familia *Asteraceae* requieren muchas veces de medios de cultivo complejos ya que presentan granos de polen trinucleados, lo que complejiza la puesta a punto de esta técnica. Para complementar este análisis, finalmente, las plantas con poca producción de polen fueron aisladas y autofecundadas a campo en 2018, a fin de determinar si bajo condiciones forzadas era posible la obtención de semillas, sin embargo, al momento del corte de los capítulos (Febrero/Marzo 2019), no se observó producción de semillas o vestigios de las mismas en ninguna de estas plantas.

Teniendo en cuenta la inviabilidad de los escasos granos polen producidos, determinada tanto mediante tinción como por la no producción de semillas por parte de las plantas PP, las mismas fueron consideradas como un único grupo junto con las plantas androestériles. De esta manera, la segregación de las plantas fértiles/androestériles, en ambos años de evaluación, se ajusta a la esperada para un único gen, 3:1 (241 PF : 74 MS,  $\chi^2 = 0,382$ ; 195 PF : 55 MS,  $\chi^2 = 1,2$  para 2016 y 2017, respectivamente), lo cual indicaría que solo un gen sería el responsable de la expresión del carácter androesterilidad en nuestra población de estudio.

Esta segregación se ajusta a la descrita por Principe (1984), quienes postularon que la androesterilidad estaría regida por un único gen (*ms*), el cual, en estado de homocigosis recesiva determina la esterilidad masculina. Basnizky y Zohary (1994 y 1998), reportaron otros dos genes (*ms<sub>2</sub>* y *ms<sub>3</sub>*) que en estado homocigota recesivo determinaban la androesterilidad en distintas poblaciones con una segregación 3:1 para cada uno de ellos. De acuerdo a lo postulado por dichos autores, llamamos a este gen *ms*. Por su parte, Stamigna *et al.* (2004), analizando a campo 44 plantas de una población *F<sub>2</sub>* obtenida a partir de cruzamientos entre clones MS franceses y cultivares fértiles del tipo Romanesco y Violeta de Provenza, observaron una segregación del tipo 15:1 correspondiente a dos genes con espistasis doble dominante. Este tipo de segregación 15:1 no se ajusta a la observada en nuestra población de trabajo.

López Anido *et al.* (2016), realizaron un análisis visual a campo de la progenie de una BC<sub>2</sub> obtenida mediante el cruzamiento de una planta de alcaucil androesteril y una variedad de cardo cultivado, observando una segregación 12:3:1 la cual se ajusta a la hipótesis de la existencia de dos genes con epistasis simple dominante. Estas observaciones fueron realizadas en un único ciclo de cultivo, lo cual podría introducir alguna variación de tipo ambiental que no fue considerada. En el presente trabajo, tal como se mencionó previamente, las evaluaciones se realizaron en dos años consecutivos con el fin de evitar esos posibles efectos ambientales. Por otra parte, si en el mencionado trabajo de López Anido *et al.* (2016), las plantas poco polen hubieran sido consideradas MS, la segregación se hubiera ajustado a una de tipo monogénica 3:1, tal como fue observada en el presente trabajo de tesis.

De acuerdo a los resultados observados en la presente tesis el análisis del número de granos de polen por flor y la determinación de la viabilidad *in vivo* de los granos de polen, replicado en un gran número de plantas dentro de la población y comparados con las plantas progenitoras, constituyen un parámetro reproductivo útil para la identificación con respaldo cuanti y cualitativo de los fenotipos “fértiles” y “androestériles”, previo a la floración de las plantas. Sin embargo, se requiere equipamiento acorde y un alto entrenamiento en la disección de las flores, debido principalmente a su pequeño tamaño. Además, las observaciones en cuanto a la producción de granos de polen y su viabilidad, recién puede realizarse al final del ciclo del cultivo de alcaucil, luego de transcurrido prácticamente un año desde su implantación a campo, lo que implica mantener un gran número de plantas en lotes de cultivo durante un largo período de tiempo hasta poder ser evaluadas y seleccionadas por el carácter androesterilidad. Una alternativa a la evaluación fenotípica es la evaluación genotípica mediante la utilización de marcadores moleculares asociados al carácter de interés a fin de identificar individuos portadores de dicho carácter en etapas tempranas de su desarrollo, lo que se denomina selección asistida por marcadores (MAS) (Olmos, 2016). Este tipo de selección ha sido ampliamente aplicada en el fitomejoramiento desde hace más de 30 años, cuando la aplicación de los marcadores moleculares se volvió una herramienta de rutina en la evaluación de la variabilidad del germoplasma, el desarrollo de mapas de ligamientos y la identificación de los genes o regiones genómicas (QTL) que determinan un carácter de interés agronómico. Así, la aplicación de diversos tipos de marcadores moleculares y la selección asistida han permitido mejorar numerosos parámetros tales como el rendimiento, la calidad y la tolerancia a diversos estreses bióticos y abióticos en los cultivos. Si bien se han desarrollado varios tipos de



marcadores moleculares y se usan de manera rutinaria en el fitomejoramiento, la mayoría de estos sistemas de marcadores están restringidos en sus aplicaciones debido a la limitación de su disponibilidad y al alto costo de los análisis realizados a gran escala (He *et al.*, 2014). No obstante, una serie de diferentes tipos de marcadores asociados a *loci* de androesterilidad génica han sido reportados en numerosas especies (Ying *et al.* 2003; Chen *et al.*, 2006; Lee *et al.* 2010; Hayashi *et al.* 2011; Gong *et al.*, 2014; Feng *et al.* 2015).

El desarrollo de marcadores moleculares SSR específicos para una especie requiere conocimiento previo del genoma, así como también resulta costoso e insume mucho tiempo, y si bien, numerosos marcadores de este tipo han sido desarrollados para *C. cardunculus* (Acquadro *et al.*, 2003; 2005ayb; 2009; Scaglione *et al.*, 2009), trabajos previos en la especie utilizando estos marcadores en variedades locales han demostrado un bajo nivel de polimorfismo. Asimismo, un gran número de estos marcadores no pudieron ser amplificados en estos materiales locales (Casadevall *et al.* 2011; Martin *et al.* 2012). Martin *et al.*, en 2012, probaron 279 de estos microsatélites disponibles y solo 77 resultaron polimórficos (27,6%) entre los parentales alcaucil y cardo silvestre y la población segregante desarrollada para la realización de un mapa de ligamiento de la especie. Por otro lado, ninguno de los marcadores SSR disponibles ha sido reportado como asociado al carácter androesterilidad en la especie. Por lo tanto, en el presente trabajo se optó, en primera instancia, por intentar transferir marcadores SSR asociados a androesterilidad génica en Girasol, los cuales habían sido previamente reportados por Chen *et al.* (2006) y Gong *et al.* (2014). La selección de marcadores asociados al carácter en cuestión en la especie *Helianthus annuus*, se basó principalmente en la cercanía evolutiva de ambos genomas, son parte de la misma familia botánica y presentan igual número cromosómico. En total se probaron cinco marcadores microsatélites asociados a la androesterilidad génica en girasol, en ambos parentales y un grupo de 15 individuos PF y 15 individuos MS de la población segregante. Se realizaron diferentes modificaciones en los protocolos de amplificación y ciclado reportados por los autores a fin de obtener resultados satisfactorios, sin embargo, solo uno de los cinco microsatélites, ORS608, pudo ser amplificado y evaluado en todos materiales. Si bien el marcador ORS608, se encuentra en el grupo de ligamiento 6 del mapa de girasol a 2,6 cM del locus ms7 de androesterilidad, en nuestro material de estudio se observó como monomórfico, presentando una única banda tanto en el parental fértil como en el androestéril y en todos los individuos de la F<sub>2</sub> evaluados (independientemente del grupo de pertenencia), por lo que no fue factible utilizar



dicho marcador para la identificación del locus de androesterilidad presente en nuestra población. La imposibilidad de transferencia de estos marcadores de una especie a la otra puede tener diversas causas. Por un lado, la no amplificación de los marcadores ORS 807, ORS996, ORS1229 y ORS705 puede deberse a que las secuencias de los cebadores de estos marcadores no sean complementarias a las secuencias flanqueantes de los genes de androesterilidad presentes en *Cynara cardunculus* y, por lo tanto, no se produce amplificación del marcador. La transferibilidad de este tipo de marcadores provenientes de girasol fue evaluada previamente por García Moreno *et al.* (2008), al probar un set 117 ORS en seis líneas de cártamo. Como resultados de dicha evaluación solo 19 ORS pudieron ser transferidos a cártamo, o sea solo 16,2% del total de los marcadores testeados presentó amplificación del fragmento y este era específico. Por otra parte, el éxito en la transferencia de marcadores SSR entre especies está inversamente relacionado con la distancia evolutiva entre las dos especies en cuestión, como así también depende del tamaño de los genomas, si el genoma de la especie objetivo es pequeño en comparación con la fuente la posibilidad de transferencia es menor (Barbará *et al.*, 2007). En este caso, pese a las similitudes entre los genomas de ambas especies (*Cynara cardunculus* y *Helianthus annuus*) en cuanto al número cromosómico, el tamaño estimado del genoma de *Cynara cardunculus* es de 1.084 Mb (Scaglione *et al.*, 2016), mientras que el de girasol es 3,6 Gb (<http://www.sunflowergenome.org>; Genome Project ID: PRJNA64989), diferencia que se debería a que este último posee aproximadamente el doble de secuencias nucleotídicas repetitivas (Bennett y Leitch, 1997).

El éxito de amplificación de marcadores entre especies dentro de un mismo género suele ser mayor que el que se obtiene entre especies pertenecientes a diferentes géneros (García Moreno *et al.*, 2008). Peakall *et al.* (1998) reportó que un rango de amplificaciones exitosas de 3-13% fue observada entre distintos géneros dentro de la familia *Fabaceae*, mientras que las amplificaciones exitosas fueron del 65% cuando se probó la transferencia entre materiales dentro del mismo género. En este trabajo, el bajo poder de transferencia de los marcadores SSR podría deberse a que, si bien, ambas especies pertenecen a la misma familia, corresponden a distintos géneros. Otros factores determinantes serían, las diferencias del tamaño del genoma citadas previamente y a la poca cantidad de marcadores SSR disponibles para ser probados.

Los marcadores SRAP se presentan como una alternativa para la evaluación molecular de un gran número de individuos en poco tiempo, están orientados a regiones codificantes del genoma, son multibanda y no necesitan información previa del genoma para su aplicación, lo que los hace un sistema de marcadores relativamente económico y factibles de ser utilizados en una amplia variedad de especies y propósitos (Martin *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2007; Ferriol *et al.*, 2004; Li y Quiros, 2001).

Desde su desarrollo, estos marcadores han sido aplicados en una gran variedad de especies vegetales para estimar niveles de diversidad genética (Aneja *et al.*, 2012; Bermejo *et al.*, 2014), identificación de genes (Martin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011b) y construcción de mapas de ligamiento (Lin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Guindón *et al.*, 2016). Dentro de la especie *Cynara cardunculus*, los marcadores SRAP resultaron una herramienta útil para detectar diversidad genética, clasificar accesiones y desarrollar colecciones núcleo (Cravero *et al.*, 2007 y 2019) así como también para la construcción de mapas de ligamiento e identificación de QTLs de importancia agronómica como rendimiento en capítulos y producción de biomasa (Martin *et al.*, 2013 y 2016 a y b).

A fin de identificar eficientemente marcadores SRAP asociados a la androesterilidad, se procedió a combinar dicha técnica de marcadores con la estrategia BSA, la cual fue diseñada esencialmente para identificar rápidamente regiones genómicas responsables de un carácter de interés. Esta estrategia puede utilizarse sobre cualquier población de la cual puedan tomarse dos muestras contrastantes, es decir, conformadas por individuos con fenotipos significativamente distintos para un carácter de interés, mientras que el resto de los caracteres varíen al azar. Las muestras se pueden tomar a partir de diferentes tipos de poblaciones (i) segregantes, derivadas de cruzamientos bi o multiparentales y (ii) variantes de cualquier población de una especie incluidos aquellos con acervos genéticos diversos (Zou *et al.*, 2016). Originalmente, esta estrategia fue diseñada para evaluar caracteres controlados por genes de efecto mayor y baja influencia ambiental, sin embargo, también se ha utilizado con éxito para identificar genes menores e inclusive QTLs (Bernier *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010; Tuberosa *et al.*, 2002; Venuprasad *et al.*, 2009; Vikram *et al.*, 2011; Xu y Crouch, 2008; Xu *et al.*, 2008).

Numerosos trabajos combinando la estrategia BSA con distintos tipos de marcadores moleculares, han permitido la identificación de marcadores asociados a androesterilidad en diversos cultivos. Gong *et al.* (2014), analizaron en girasol, marcadores SSR en dos *bulks* de

DNA formados por diez plantas MF y MS, respectivamente. El análisis les permitió identificar y localizar el gen de androesterilidad  $ms_7$  en el grupo de ligamiento 6 y el gen  $ms_8$  en el grupo de ligamiento 5 del mapa de la especie. De manera similar, Hayashi *et al.* (2011), trabajando en lechuga, compararon dos *bulks* (fértil y androestéril), constituidos por el ADN de ocho plantas cada uno de ellos, utilizando marcadores AFLP. Los resultados obtenidos les permitieron desarrollar nueve SCAR y CAPS asociados al gen recesivo de androesterilidad ( $ms-S$ ). Estudios similares, han sido descritos en algodón (Raja *et al.*, 2018), pimiento (Aulakh *et al.*, 2016) y repollo chino (Ying *et al.*, 2003), entre otros.

Por su parte, la estrategia BSA en combinación con marcadores SRAP ha permitido la identificación de marcadores asociados a la androesterilidad en especies tales como *B. oleracea* (Zhang *et al.*, 2011a).

En la especie *C. cardunculus*, BSA y SRAP fueron utilizados en forma combinada para la identificación de marcadores asociados a precocidad y coloración del capítulo (Martin *et al.*, 2008). El presente trabajo es el primer reporte de la combinación de ambas técnicas para la identificación de marcadores moleculares asociados a los genes  $ms$  en la especie.

Como resultado del análisis de 14 de las 72 combinaciones SRAP probadas en ambos parentales y los *bulks* de ADN, se pudo observar que el número de bandas por combinación de cebadores (3 - 25) así como el tamaño de las bandas (100 - 2000pb), fue similar a lo reportado por Martin *et al.* (2013), utilizando el mismo tipo de marcadores en una población segregante desarrollada a partir de la cruce entre dos variedades bótanicas de *C. cardunculus* (*scolymus* y *sylvestris*). Por otro lado, la estrategia BSA nos permitió detectar trece bandas polimórficas entre los parentales y *bulks*, que respondía al patrón esperado (presente en el parental y *bulk* fértil y ausente en el parental y *bulk* androestéril o viceversa). Sin embargo, al realizar el análisis de los individuos por separado (*de-bulk*) solo cinco de estos marcadores mostraron asociación al gen  $ms$ . Pese a que en el presente trabajo se incluyó un número mayor de individuos que el mínimo recomendado por la bibliografía (Michelmore *et al.*, 1991) para la conformación de cada *bulk* (10 individuos) con el objetivo de ser estrictos en la detección de bandas ligadas al gen de interés, más del 50% de las bandas detectadas por BSA fueron falsos positivos, es decir, *loci* no ligados al carácter que son detectados como polimórficos entre los *bulks*. Si bien la frecuencia con la cual se detectan falsos positivos aumenta cuando el número de marcadores aumenta, para tamaños de *bulks* de 10 o más individuos, aun con una gran cantidad de marcadores, la

probabilidad de falsos positivos debería ser baja (Mackay y Caligari, 2000). Asumimos que el alto porcentaje de falsos positivos encontrados en este trabajo, puede deberse al tipo de población utilizada, que como ya fue mencionado no se trata de una  $F_2$  mendeliana en sentido estricto, sino que se comporta como tal solo para el carácter en estudio y, por lo tanto, es posible que se produzca segregación en otros caracteres que no fueron considerados en la presente tesis, lo cual se evidencia en el patrón de polimorfismo observado de los marcadores SRAP.

Otros estudios en los que se utilizaron marcadores SRAP en combinación con la estrategia BSA han reportado la utilización de un gran número inicial de combinaciones de cebadores para finalmente identificar algún marcador asociado al carácter bajo estudio, e inclusive un alto porcentaje de falsos positivos pese a incluir en el análisis un número mayor de individuos en los distintos *bulks*. En berenjena, Mutlu *et al.* (2008) etiquetaron un gen de resistencia al marchitamiento de *Fusarium* usando marcadores SRAP, SRAP-RGA (Análogo del gen de resistencia), RAPD y SCAR. Utilizaron 2316 combinaciones de cebadores para identificar marcadores moleculares vinculados al gen de resistencia, de los cuales dos marcadores SRAP estaban estrechamente vinculados al gen de resistencia. Los marcadores SRAP se convirtieron en marcadores SCAR y se usaron en la selección asistida por marcadores de la resistencia al marchitamiento por *Fusarium* en berenjena. Zhang *et al.* (2011a) usaron marcadores SRAP y SSR para identificar el gen asociado a androesterilidad en *B. oleracea*. Realizaron análisis BSA con marcadores SRAP y SSR. Al examinar los polimorfismos entre *bulks* fértiles y *bulks* estériles con 26.417 pares de cebadores SRAP, identificaron 14 marcadores SRAP que estaban vinculados al gen de esterilidad masculino MS-cd1. Después de secuenciar los fragmentos SRAP, tres de estos marcadores que estaban estrechamente relacionados con el gen MS-cd1, se convirtieron en marcadores SCAR.

De los cinco marcadores SRAP asociados al carácter androesterilidad en este trabajo de tesis, los marcadores SRAP 7-10.1774, SRAP 4-9.600 y SRAP 4-9.332 se ajustaron a una segregación de tipo mendeliana 3:1 ( $\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.05}$ ), mientras que los marcadores SRAP 5-8.300 y SRAP 4-9.700 mostraron una ligera desviación en su segregación ( $\chi^2_{\alpha=0.05} \leq \chi^2 \leq \chi^2_{\alpha=0.01}$ ). El porcentaje de *loci* con segregación distorsionada observado por Lanteri *et al.* (2006) en una población segregante generada a partir del cruzamiento entre dos tipos varietales de alcaucil fue de aproximadamente un 10%. Por su parte, Portis *et al.* (2009) observaron un valor del

orden del 13% en una población generada entre una variedad de alcaucil y una de cardo cultivado, mientras Martin *et al.* (2013), en una población segregante generada por el cruzamiento de una variedad de alcaucil con un genotipo de cardo silvestre, obtuvieron un 27% de *loci* con segregación distorsionada, de los cuales la mayoría (~33%) correspondían a marcadores SRAP. En la presente tesis, al analizar la segregación de marcadores asociados al carácter en estudio y no en todo el genoma, el porcentaje de marcadores distorsionados fue nulo y solo dos presentaron una segregación levemente distorsionada. Cervera *et al.* (2001) observaron que partes importantes de los grupos de ligamiento pueden ser excluidas durante el desarrollo de mapas al eliminar los *loci* distorsionados del análisis, sugiriendo incluir *loci* distorsionados hasta un valor del 5% de manera de reducir la probabilidad de generar falsos ligamientos. Por su parte, Doucleff *et al.* (2004) observaron que segmentos grandes de dos grupos de ligamiento se perdían cuando eran excluidos del análisis los marcadores con una distorsión <1%, por lo que la inclusión de marcadores altamente distorsionados en los análisis de ligamiento puede ser beneficioso en algunos estudios de mapeo (Fishman *et al.*, 2001). En la presente tesis, fueron incluidos inicialmente en el análisis de ligamiento aquellos marcadores que no presentaron distorsión en su segregación y, posteriormente, se incluyeron aquellos con una distorsión menor, previa fijación del orden de los primeros. A un LOD mínimo de 2.0 y Rec = 0.40, tres marcadores fueron asociados al carácter androesterilidad (SRAP 4-9.700, SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332) en el análisis de ligamiento llevado a cabo con el programa JoinMap v.4. A fin de corroborar el correcto orden de los marcadores en el mapa de ligamiento obtenido por el programa de mapeo, se procedió a realizar un análisis de a pares, determinando la distancia entre los mismos mediante el cálculo de la frecuencia de recombinación entre dichos marcadores. Los valores obtenidos reflejaron que el orden de los marcadores se corresponde con el obtenido por el programa informático, sin embargo, las distancias en cM obtenidas fueron diferentes. Si bien la distancia a lo largo de un mapa de ligamiento se mide en términos de la frecuencia de recombinación ( $r$ ) entre marcadores genéticos (Paterson, 1996), se requieren funciones de mapeo para convertir fracciones de recombinación en cM debido a que la frecuencia de recombinación y la frecuencia de entrecruzamientos no están relacionadas linealmente (Hartl y Jones, 2001; Kearsey y Pooni, 1996). Cuando las distancias de mapa son pequeñas (<10 cM), en general la distancia del mapa es igual a la frecuencia de recombinación. Sin embargo, esta relación no se aplica a distancias mayores de 10 cM (Hartl y Jones, 2001), es así que surgen las funciones de mapeo. Una de las funciones de mapeo más comúnmente utilizada es la de Kosambi, que corrige el fenómeno de interferencia causado por el efecto del

doble entrecruzamiento al realizar el cálculo de la distancia. Si bien las distancias entre los marcadores fueron mayores en el análisis de ligamiento de a pares, se demostró que la ubicación de los marcadores con respecto al gen *ms* es la misma que la calculada por el programa informático. Consideramos que las distancias obtenidas mediante la función de Kosambi, son una estimación más aproximada debido a la corrección por interferencia que se realiza en el cálculo de las mismas. Por otro lado, estas distancias no están directamente relacionadas con la distancia física del ADN entre los marcadores genéticos, sino que dependen del tamaño del genoma de la especie (Paterson, 1996). Así, los marcadores más próximos y flanqueantes del locus *ms* fueron SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332, a 0,5 y 3,8 cM, respectivamente. Mientras que el marcador SRAP 4-9.700, incluido luego de fijar el orden de los otros dos marcadores, se localizó a 13,9 cM del locus de androesterilidad. Los marcadores SRAP 5-8.300 y SRAP 4-9.600, si bien presentaron segregación mendeliana o ligeramente distorsionada, no fueron incluidos en el mapa de la región circundante al locus *ms* obtenido con el programa JoinMap, debido a que presentaron un porcentaje de recombinación mayor o igual al 40%. Por otro lado, el hecho de que dos marcadores presenten una asociación no aleatoria entre alelos (frecuencia de recombinación menor al 50%), no tiene que estar necesariamente correlacionado con un carácter en particular. Es posible detectar genes que no segreguen independientemente no solo entre *loci* cercanos, sino también entre *loci* distantes, aun localizados en diferentes cromosomas como resultado de fuerzas tales como selección, sistemas de apareamiento, estructura poblacional, entre otros (Soto-Cerda y Cloutier 2012). La falta de asociación de estos marcadores en el análisis de ligamiento puede deberse a que, si bien presentan una frecuencia de recombinación inferior al 50%, al encontrarse distantes al locus *ms*, falten marcadores intermedios que hagan de nexo entre ambos, por lo cual es factible que al incorporar nuevos marcadores en la región de interés estos marcadores puedan finalmente ser incluidos.

A fin de realizar análisis genómicos comparativos, las cinco bandas correspondientes a cada uno de los marcadores SRAP identificados fueron aisladas del gel, re-amplificadas con el mismo par de cebadores que le dieron origen y secuenciadas. El análisis de las secuencias obtenidas, incluyó la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos nucleotídica de NCBI. Como resultado de los alineamientos se pudo observar que el marcador SRAP 4-9.700 presenta elevada homología (superior al 90%) con dos accesiones que corresponden a un mismo transportador de sulfato 4.1 en *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (Accession no.

XM\_025137078.1 y XM\_025114421.1). Es conocido que el sulfuro es un macro nutriente esencial para el crecimiento de la planta, cumpliendo roles especialmente importantes en la regulación redox y el metabolismo de productos secundarios (Saito, 2000). Actualmente, numerosos genes codificantes de transportadores de sulfatos han sido identificados y clonados, así como también secuencias relacionadas han sido anotadas en las bases de datos nucleotídicas. Wang *et al.* (2006) aislaron y caracterizaron la secuencia del gen RSultr3.2A, el cual codificaría un transportador de sulfato putativo en rábano (*Raphanus sativus* L). Este gen está ausente en el citoplasma androestéril de la variedad “9802A” de rábano, mientras que en el restaurador de la fertilidad “9802H” se encuentra presente, por lo cual podría estar vinculado con la androesterilidad en esta especie, aunque su función en *C. cardunculus* es desconocida. Si bien la accesión XM\_025114421.1 presentó 1800 bases alineadas, se encontraron 8 *gaps*. Dichos *gaps* o huecos podrían tratarse de separaciones añadidas artificialmente a una secuencia para maximizar su alineamiento con otra o podrían representar posibles mutaciones, inserciones o deleciones que han causado divergencia entre las secuencias comparadas. Dado que este fragmento constituye parte de la región codificante del gen, sería de interés analizar si esas sustituciones generan cambios en la secuencia de aminoácidos y/o en la estructura de la proteína codificada, teniendo un efecto en la vía de producción o desarrollo de polen. Los restantes cuatro marcadores no presentaron secuencias homólogas pese a que los fragmentos re-amplificados fueron purificados previamente a su secuenciación. Dado que los productos de PCR pueden contener mezclas de productos no específicos junto a la secuencia de interés, alternativamente pueden ser aislados y clonados mediante un vector a fin de mejorar la calidad de las secuencias obtenidas por secuenciación del ADN.

Es por ello que se seleccionaron las dos bandas correspondientes a los marcadores más cercanos al gen *ms* (SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332) y de las cuales no se habían obtenido resultados positivos al ser secuenciadas directamente las re-amplificaciones de PCR. Las bandas correspondientes a dichos marcadores, fueron re-amplificadas y clonadas, posteriormente fueron secuenciadas y los datos obtenidos analizados en búsqueda de secuencias homólogas tanto con la base de datos nucleotídica de NCBI y con el genoma de referencia de alcaucil recientemente disponible ([www.artichokegenome.unito.it](http://www.artichokegenome.unito.it)).

El alineamiento de la secuencia correspondiente al SRAP 7-10.1774, no presentó homología dentro del género al ser analizado con BLAST, sin embargo, al ser comparado con el



genoma de referencia de la especie, mostró homología con un gen ubicado en el grupo de ligamiento 13 del mapa de referencia de la especie (Portis *et al.*, 2009), el cual contiene un dominio CHORD (*Cysteine and Histidine-Rich Domain*) de función desconocida. Este tipo de dominio incluye aproximadamente 60 dominios proteicos, dispuestos generalmente en tándem, presentes en casi todos los eucariotas y con funciones muy diversas, desde la detección de la presión cardíaca al mantenimiento de la diploidía en hongos y son distintas especificidades de interacción proteína-proteína (Heise *et al.*, 2007). En plantas, este tipo de dominio se encuentra implicado en la inmunidad y la resistencia a diversas enfermedades (Kaur y Subramanian, 2018).

El resultado del alineamiento para el marcador SRAP 4-9.332 reveló que éste presenta elevada homología (superior al 90%) con la región correspondiente a la proteína poligalacturonasa en *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* localizada en los grupos de ligamiento 4 y 15 del mapa de referencia de la especie (Portis *et al.*, 2009). Las poligalacturonasas pertenecen a una de las mayores familias de las hidrolasas (Torki *et al.*, 2000; Markovic y Janecek, 2001) cuyas actividades están relacionadas con una amplia gama de procesos en el desarrollo de las plantas (Hadfiel y Bennett, 1998), entre ellos, la dehiscencia de las anteras. La actividad de las poligalacturonasas se observó en la zona de dehiscencia de anteras de especies tales como maíz, tabaco, colza y *Arabidopsis* (Dubald *et al.*, 1993; Sander *et al.*, 2001). Además, en tomate, una mutación simple en el gen Ps-2 codificante para una poligalacturonasa es responsable de anteras no dehiscentes (Gorguet *et al.*, 2009).

Como se ha explicado a lo largo de este trabajo, la producción de alcaucil, en las últimas dos décadas, ha experimentado una tendencia hacia los cultivares propagados por semilla mostrando elevados rendimientos y evitando los problemas fitosanitarios propios de la propagación vegetativa (López Anido *et al.*, 2010; García *et al.*, 2006). Si bien la especie presenta protandria y la autopolinización a nivel de flor es casi imposible, sí puede darse a nivel de capítulo debido a que la floración es de tipo centripeta. Por otra parte, la emasculación manual es laboriosa y no se conocen métodos químicos lo suficientemente efectivos que impidan la autofecundación a nivel de flor. Esta situación hace indispensable contar con un sistema de esterilidad masculina efectivo que permita hacer más eficiente el proceso de la generación de materiales híbridos disminuyendo así los costos de producción de semillas y posibilitando la explotación del fenómeno de heterosis. Los marcadores moleculares



desarrollados en este trabajo, son el primer acercamiento en la identificación de la región codificante para la androesterilidad y su aplicación para identificar plantas MS en estadios tempranos de desarrollo, asistiendo a los programas de mejoramiento de la especie. Además, estos marcadores permiten el *screening* de una población de gran tamaño en poco tiempo para identificar individuos androestériles y acelerar en gran medida la incorporación del gen de la androesterilidad en los programas de mejoramiento. Por otra parte, el conocimiento de las secuencias de estos marcadores SRAP, nos permitiría diseñar marcadores específicos de manera tal de facilitar aún más la identificación de individuos androestériles. Si bien los marcadores encontrados no se encuentran sobre el gen *ms*, como perspectiva, se plantea continuar con técnicas de secuenciación masiva, tales como BSA-seq (secuenciamiento de los parentales y *bulks*) descrita por Schneeberger y Weigel (2011), con el objetivo de encontrar marcadores más cercanos o inclusive dentro del gen *ms* del tipo SNPs (polimorfismos de un solo nucleótidos).

## CONCLUSIONES

- Se desarrolló una población segregante para el carácter androesterilidad en alcaucil.
- Fue posible identificar individuos androestériles y androfértiles fenotípicamente a campo en la generación F<sub>2</sub>, así como también confirmar esta clasificación mediante conteo de granos de polen por flor y análisis de viabilidad de los mismos.
- Si bien se probaron distintas condiciones de amplificación, no se logró transferir marcadores moleculares asociados al carácter androesterilidad identificados en *Helianthus annuus L.* (girasol).
- Se identificaron cinco marcadores moleculares asociados al carácter, mediante la utilización de la técnica SRAP en combinación con la estrategia de BSA, de los cuales tres pudieron ser mapeados. El marcador más cercano, SRAP 7-10.1774, se estimó a 0,5 cM del gen *ms*; mientras que los otros (SRAP 4-9.600 y SRAP 4-9.332) se detectaron a 4,3 cM y 13,9 cM, respectivamente.
- El aislamiento y secuenciación de las cinco bandas obtenidas asociadas al carácter en estudio permitió encontrar homología en una de las secuencias (SRAP 4-9.700) con un transportador de sulfato 4.1 en *Cynara cardunculus var. scolymus*.
- A partir de la clonación y secuenciación de los dos marcadores más cercanos al gen *ms* (SRAP 7-10.1774 y SRAP 4-9.332), fue posible determinar que el marcador SRAP 7-10.1774 presenta homología con un gen que contiene un dominio CHORD aunque la función de la proteína que codifica es aún desconocida; mientras que el marcador SRAP 4-9.332 presenta homología con una poligalacturonasa, en la que fue identificada una mutación puntal causante de androesterilidad en tomate.

## BIBLIOGRAFIA

**Acquadro, A., Portis, E., y Lanteri, S. (2003).** Isolation of microsatellite loci in artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 37-39.

**Acquadro, A., Portis, E., Lee, D., Donini, P., y Lanteri, S. (2005a).** Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. *Genome*, 48:217-225.

**Acquadro, A., Portis, E., Albertini, E., y Lanteri, S. (2005b).** M-AFLP-based protocol for microsatellite loci isolation in *Cynara cardunculus* L.(Asteraceae). *Molecular Ecology Notes*, 5(2), 272-274.

**Acquadro, A., Lanteri, S., Scaglione, D., Arens, P., Vosman, B., y Portis, E. (2009).** Genetic mapping and annotation of genomic microsatellites isolated from globe artichoke. *Theoretical and applied genetics*, 118(8), 1573-1587.

**Alexander, M. P. (1980).** A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, 55(1), 13–18.

**Aneja, B., Yadav, N. R., Chawla, V., y Yadav, R. C. (2012).** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular breeding*, 30(4), 1635-1648.

**Araméndiz-Tatis, H., Cardona-Ayala, C., y Jarma-Orozco, A. (2013).** Efficiency of two methods for eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. Lila criolla) pollen viability evaluation. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), 351-358.

**Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., y Sathishkumar, R. (2016).** Advances in molecular cloning. *Molecular Biology*, 50(1), 1-6.

**Aulakh, P. S., Dhaliwal, M. S., Jindal, S. K., Schafleitner, R., y Singh, K. (2016).** Mapping of male sterility gene *ms10* in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant breeding*, 135(4), 531-535.

**Ballesteros, M., José Negro, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., Sáez, F., y Oliva, J. (2007).** Fractionation of *Cynara cardunculus* (cardoon) biomass by dilute-acid pretreatment. *Appl. Bionics Biomech*, 137-140.

- Balloux, F., Lehmann, L. y De Meeûs, T. (2003).** The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164:1635–1644.
- Balzarini, M., y Di Rienzo, J. (2004).** Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. *Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.*
- Barbara, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., y Lexer, C. (2007).** Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16(18), 3759-3767.
- Barbieri, R. (1959).** Osservazioni sulla biologia del carciofo “Spinoso Sardo” (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.). *Studi di Sassari Annali Facoltà di Agraria*, 19-36.
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., y Gresshoff, P. M. (1991).** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 196(1), 80-83.
- Basnizki, Y., y Zohary, D. (1987).** A seed-planted cultivar of globe artichoke. *HortScience*.
- Basnizki, J., y Zohary, D. (1994).** Breeding of seed-planted artichoke. *Plant Breeding Reviews*, 253-269.
- Basnizki, Y., y Zohary, D. (1998).** Hybrid Seeds of Globe Artichoke for Seed Planting and Method of Producing Same. European Patent Application, Application Number 98106908.1, Bulletin 1998/43.
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., y Gresshoff, P. M. (1991).** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 196(1), 80-83.
- Bennett, M. y Leitch. (1997).** Nuclear DNA amounts in angiosperms 583 new estimates. *Annals of Botany*, 80: 169-196.
- Bermejo, C., Cravero, V. P., Anido, F. L., y Cointry, E. L. (2010).** Agronomic and molecular evaluation of recombinant inbred lines (RILs) of lentil. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2(9), 280-285.
- Bernier, J., Kumar, A., Ramaiah, V., Spaner, D. y Atlin, G. (2007).** A large effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. *Crop Sci.* 47, 507–516.

**Bianco, C., Saccardo, F., Olimpieri, I., Mazzucato, A., y Crinò, P. (2011).** Floral biology in male sterile clones of globe artichoke [*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) Hegi]. *Acta Hort.* 942, ISHS 2011: 159-164.

**Brás, T., Guerreiro, O., Duarte, M., y Neves, L. (2015).** Impact of extraction parameters and concentration by nanofiltration on the recovery of phenolic compounds from *Cynara cardunculus* var. *altilis*: assessment of antioxidant activity. *Ind. Crop. Crop.* , 137–142.

**Budar, F., y Pelletier, G. (2001).** Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 324(6), 543-550.

**Burd, M.(1994).** Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60, 83-139.

**Calabrese, N., Cravero, V. y Pagnotta, M. (2019).** *Cynara cardunculus* propagation. In the “the globe artichoke genome”. In:Portis E, Lanteri S (eds) *Compendium plant genomes*.Springer, Berlin. ISBN 978-3-030-20011-4

**Casadevall, R., Martin, E., y Cravero, V. (2011).** Simple sequence repeat (SSR) vs. sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for" *Cynara cardunculus*" characterization. *Spanish journal of agricultural research*, (2), 453-459.

**Ceccarelli, N., Curadi, M., Piero, P., Martelloni, L., Sbrana, C., y Giovannetti, M. (2010).** Globe artichoke as a functional food. *Mediterr J Nutr Metab* , 3:197-201.

**Cervera, M. T., Storme, V., Ivens, B., Gusmao, J., Liu, B. H., Hostyn, V., Van Slicken, J., Van Montagu, M. y Boerjan, W. (2001).** Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P-nigra* and *P-trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*, 158:787-809.

**Chen, J., Hu, J., Vick, B. A., y Jan, C. C. (2006).** Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. *Theoretical and applied genetics*, 113(1), 122-127.

- Cohen, A., Najarian, A., Paulus, A., Guttman, A., Smith, J., y Karger, B. (1988).** Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 85: 9660-9663.
- Cravero, V., López Anido, F., y Cointry, E. (2002).** Efecto de una generación de endocría sobre caracteres vegetativos y productivos en dos estructuras familiares de alcaucil. *Horticultura Brasileira* , 20(3):459-464.
- Cravero, V., Martin, E., y Cointry, E. (2007).** Genetic Diversity in *Cynara cardunculus* determined by Sequence-related Amplified Polymorphism markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 132(2):1-5.
- Cravero, V., Crippa, I., Martin, M. y Cointry, E. (2019).** Development of a *Cynara cardunculus* L. core-collection in order to optimize germoplasm conservation. *AgriScientia*: 36:25-38.
- Cruden, R. W. (1977).** Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1), 32-46.
- Dnyaneshwar, W., Preeti, C., Kalpana, J., y Bhushan, P. (2006).** Development and Application of RAPD-SCAR Marker for Identification of *Phyllanthus emblica* L INN. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2313-2316.
- Doucleff, M., Jin, Y., Gao, F., Riaz, S., Krivanek, A. y Walker, M. (2004).** A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1178-1187.
- Dubald, M., Barakate, A., Mandaron, P., y Mache, R. (1993).** The ubiquitous presence of exopolygalacturonase in maize suggests a fundamental cellular function for this enzyme. *Plant J*, 4: 781-791.
- Encinar, J., González, J., y González, J. (2002).** Steam gasification of *Cynara cardunculus* L.: *Fuel Process Technol* , 75:27-43.
- Esposito, M. A., Martin, E. A., Cravero, V. P., y Cointry, E. (2007).** Characterization of pea accessions by SRAP's markers. *Scientia horticulturae*, 113(4), 329-335.

- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., y Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Feng, X., Keim, D., Wanjugi, H., Coulibaly, I., Fu, Y., Schwarz, J., ... y Cho, S. (2015).** Development of molecular markers for genetic male sterility in *Gossypium hirsutum*. *Molecular breeding*, 35(6), 141.
- Fernández, J., Curt, M. D., y Aguado, P. L. (2006).** Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Ind. Crop. Prod.* , 222-229.
- Ferriol, M., Pico, B., de Cordova, P. F., y Nuez, F. (2004).** Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Science*, 44(2), 653-664.
- Fishman, L., Kelly, A. J., Morgan, E. y Willis, J. H. (2001).** A genetic map in the *Mimulus guttatus* species complex reveals transmission ratio distortion due to heterospecific interactions. *Genetics*, 159:1701-1716.
- Foti, S., Mauromicale, G., Raccuia, S., Fallico, B., Fanella, F., y Maccarone, F. (1999).** Possible alternative utilization of *Cynara* spp.: I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain. *Ind. Crop. Prod.* , 219-228.
- Foury, C. (1987).** Quelques aspects du développement de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) issu de semences; analyse plus particulière de la floraison en conditions naturelles. *Tesis doctoral* , 189. París: VI University Orsay.
- Frankel, F., y Galun, E. (1977).** *Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Fu T. y Tu J. (2002).** Present situation and prospects on the research and utilization of hybrid rapeseed. *Analects of Crop Breeding China*Agricultural University Press, Beijing, pp 235–250.
- García, S.M., Firpo, I.T., Cointry, E.L., López Anido, F.S. y Cravero, V. 2005.** Artichoke situation in Argentina. En: *Proceeding IVth International Congress on Artichoke*. Acta Hort. 681:195-200.

- García, S.M., Cointry, E.L., López Anido, F.S., FIRPO I.T., Cravero V. y Muñoz, S. (2006).** Nueva generación de alcaucil multiplicable por semilla. *Horticultura Argentina*, 25(59):152.
- García-Moreno, M. J., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., y Pérez-Vich, B. (2008).** Transferability of sunflower microsatellite markers to safflower. In *Proceedings of the 7th International Safflower Conference, Wagga Wagga, New South Wales* (pp. 3-6).
- Gominho, J., Curt, M. D., Lourenço, A., Fernández, J., y Pereira, H. (2018).** *Cynara cardunculus* L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30. *Biomass and Bioenergy* , 257-275.
- Gong, L., Li, C., Capatana, A., Feng, J., Qi, L., Seiler, G. J., y Jan, C. C. (2014).** Molecular mapping of three nuclear male sterility mutant genes in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular breeding*, 34(1), 159-166.
- Goodwin, S., McPherson, J., y McCombie, R. (2016).** Coming of age: ten years of next generation. *Nature reviews* , 17: 333-351.
- Gorguet, B., Schipper, D., van Lammeren, A., Visser, R. G., y van Heusden, A. W. (2009).** ps-2, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene. *Theoretical and applied genetics*, 118(6), 1199-1209.
- Guindón, M. F., Martin, E., Zayas, A., Cointry, E., y Cravero, V. (2016).** Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16(3), 182-188.
- Guo, J., y Liu, Y. (2009).** The genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice. *Chinese Science Bulletin*, 54(14), 2404-2409.
- Hadfiel, K., y Bennett, A. (1998).** Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol* , 117: 337-343.
- Hamaoka, Y., Fujita, Y., y Iwai, S. (1991).** Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiologia plantarum*, 82(1), 67-72.



**Hammer, K. (1988).** Preadaptations and the domestication of crops and weeds. *Biologische Zentralblatt* 107:631–636.

**Hartl, D., y Jones, E. (2001).** Introduction to molecular genetics and genomics. *Genetics: analysis of genes and genomes, 5th edn.* Jones & Bartlett, Mississauga, ON, Canada, 1-35.

**Hayashi, M., Ujiie, A., Serizawa, H., Sassa, H., Kakui, H., Oda, T., y Koba, T. (2011).** Development of SCAR and CAPS markers linked to a recessive male sterility gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica*, 180(3), 429-436.

**He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z. X., Liu, H., y Li, Z. (2014).** Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in plant science*, 5, 484.

**Heise, C. T., Le Duff, C. S., Boter, M., Casais, C., Airey, J. E., Leech, A. P., ... y Kleanthous, C. (2007).** Biochemical characterization of Rar1 cysteine- and histidine-rich domains (CHORDs): A novel class of zinc-dependent protein–protein interaction modules. *Biochemistry*, 46(6), 1612-1623.

**Huang, X., Quesada, M., y Mathies, M. (1992).** DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal. Chem.*, 64: 2149-2154.

**Hussain, S. M., Hussain, K., Farwah, S., Rizvi, S., Rashid, M., Saleem, S., ... y Rashid, H. (2018).** Male sterility in vegetable crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 3390-3393.

**Jan, C. C. (1992).** Inheritance and allelism of mitomycin C- and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop science*, 32(2), 317-320.

**Jan, C. C., y Rutger, J. N. (1988).** Mitomycin C- and streptomycin-induced male sterility in cultivated sunflower. *Crop science*, 28(5), 792-795.

**Jones, H., y Clarke, A. (1943).** Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 189–194.

**Joshi, B. K. (2002).** Pollen categories in some cytoplasmic-genetic male sterile lines of rice. *Journal of Institute of Science and Technology*, 12, 89-94.

- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., y Dhawan, A. K. (2011).** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.
- Kaul, M.L.H. (1988).** Male Sterility in Higher Plants. *Berlin: Springer-Verlag*.
- Kaur, G., y Subramanian, S. (2018).** Evolutionary relationship between the cysteine and histidine rich domains (CHORDs) and Btk-type zinc fingers. *Bioinformatics*, 34(12), 1981-1985.
- Kearns, C. A., y Inouye, D. W. (1993).** *Techniques for pollination biologists*. University press of Colorado.
- Kearsey, M. J., y Pooni, H. S. (1996).** Selfing and full-sib mating. In *The genetical analysis of quantitative traits* (pp. 53-76). Springer US.
- Kosambi, D. (1944).** The estimation of map distances from recombination values., *Ann. Eugen.*, 12:172-175.
- Kruskal, W. H., y Wallis, W. A. (1952).** Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Kuczmannová, A. G. (2015).** Agrimonia eupatoria L. and Cynara cardunculus L. water infusions: phenolic profile and comparison of antioxidant activities. *Molecules* , 20538–20550.
- Kukić, J. P., Popović, S., Petrović, P., Mucaji, A., Ćirić, D., Stojković, M. y Soković, M. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activity of Cynara cardunculus extracts. *Food Chem* , 861-868.
- Kumar, S. (2013).** Male sterility in vegetables. *Olericulture-fundamental of vegetable production*, 1, 431-439.
- Lanteri, S., Di Leo, I., Ledda, L., Mammeli, M., y Portis, E. (2001).** RAPD variation within and among populations of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), cv “Spinoso sardo”. *Plant Breeding*, 120:243-247.
- Lanteri, S., Saba, E., Cadinu, M., Mallica, G. M., Baghino, L., y Portis, E. (2004a).** Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke. *Theoretical and Applied Genetics* , 108:1534-1544.

- Lanteri, S., Acquadro, A., Saba, E. y Portis, E. (2004b).** Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79:863-870.
- Lanteri, S., Acquadro, A., Comino, C., Mauro, R., Mauromicale, G., y Portis, E. (2006).** A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8), 1532-1542.
- Lee, J., Yoon, J. B., Han, J. H., Lee, W. P., Kim, S. H., y Park, H. G. (2010).** Three AFLP markers tightly linked to the genic male sterility *ms 3* gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and conversion to a CAPS marker. *Euphytica*, 173(1), 55-61.
- Levings, C. S. (1990).** The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. *Science*, 250(4983), 942-947.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (2010).** Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*.
- Li, G., y Quiros, C. F. (2001).** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and applied genetics*, 103(2-3), 455-461.
- Li, J., y Yuan, M. (2000).** Hybrid rice: genetics, breeding, and seed production. *Plant Breeding Rev.* 17, 15-158.
- Li, S. F., Tang, S. J., y Cai, W. Q. (2010).** RAPD-SCAR markers for genetically improved NEW GIFT Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus* L.) and their application in strain identification. *Zool Res*, 31(2), 147-153.
- Lin, Z., Zhang, X., Nie, Y., He, D., y Wu, M. (2003).** Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chinese Science Bulletin*, 48(19), 2064-2068.
- López Anido, F. , Cravero, V. P., Martín, E. A., Crippa, I., y Cointry, E. L. (2010).** Differential expression of the genetic variance in F2 populations of reciprocal crosses of artichoke. *Spanish journal of agricultural research*, (3), 679-685.

- López Anido, F. S., Martín, E. A., García, S. M., y Cointry, E. L. (2016).** Successful transferring of male sterility from globe artichoke into cultivated cardoon. In *IX International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives 1147* (pp. 163-166).
- Mackay, I. J., y Caligari, P. D. S. (2000).** Efficiencies of F<sub>2</sub> and backcross generations for bulked segregant analysis using dominant markers. *Crop science*, 40(3), 626-630.
- Madabhushi, R. (1998).** Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions. *Electrophoresis*, 19: 224-230.
- Mancini, M., Volpe, M. L., Gatti, B., Malik, Y., Moreno, A. C., Leskovar, D., y Cravero, V. (2019).** Characterization of cardoon accessions as feedstock for biodiesel production. *Fuel*, 235, 1287-1293.
- Maneval, W. E. (1936).** Lacto-phenol preparations. *Stain technology*, 11(1), 9-11.
- Marie, D., y Brown, S. C. (1993).** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 41-51.
- Markovic, O., y Janecek, S. (2001).** Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng*, 14: 615-631.
- Martin, E., Cravero, V., Espósito, M. A., López, A., Milanesi, L., y Cointry, E. (2008).** Identification of markers linked to agronomic traits in globe artichoke. *Australian Journal of Crop Science*, 1(2), 43-46.
- Martin, E. (2012).** Tesis doctoral: "Construcción de un mapa de ligamiento en *Cynara cardunculus* L. basado en marcadores moleculares y localización de genes de interés agronómico". Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.
- Martin, E., Cravero, V., Portis, E., Scaglione, D., Acquaviva, E., y Cointry, E. (2013).** New genetic maps for globe artichoke and wild cardoon and their alignment with an SSR-based consensus map. *Molecular breeding*, 32(1), 177-187.
- Martin, E. A., Cravero, V. P., Anido, F. S. L., y Cointry, E. L. (2016a).** QTLs detection and mapping for yield-related traits in globe artichoke. *Scientia horticultrae*, 202, 156-164.

**Martin, E.A., Cravero, V.P. y Cointry, E.L. (2016b).** Quantitative trait loci (QTLs) related to biomass production in *Cynara cardunculus* L. *Acta Hort.* 1147, 189-196

**Maxam, A. M., y Gilbert, W. (1977).** A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.

**Michelmore, R. W., Paran, I., y Kesseli, R. V. (1991).** Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88(21), 9828-9832.

**Morison, N., Vaissière, B., Martin, F., Pécaut, P., y Cambon, G. (2000).** Pollinisation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) en production de semences hybrides sous abris grillagés. *Apidologie* , 31:115-128.

**Morozova, O., y Marra, M. A. (2008).** Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92(5), 255-264.

**Mutlu, N., Boyacı, F. H., Göçmen, M., y Abak, K. (2008).** Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(8), 1303.

**Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... y Özkan, H. (2018).** DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.

**Naresh, P., Lin, S. W., Lin, C. Y., Wang, Y. W., Schafleitner, R., Kilian, A., y Kumar, S. (2018).** Molecular markers associated to two non-allelic genic male sterility genes in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in plant science*, 9.

**Nishiyama, I. (1984).** Climatic influence on pollen formation and fertilization. *Biology of rice*, 153, 171.

**Ochogavía, A. C., Novello, M. A., Bianchi, M. B., Picardi, L. A., y Nestares, G. M. (2018).** Partial male sterility in imisun sunflower: imazapyr treatment in advanced vegetative stages decreases pollen yield and alters ahas gene expression. *Crop Science*, 58(5), 1877-1889.

**Olmos, S. (2016).** Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. *Agrotecnia*, (12), 23-31.

**Ogura, H. (1968).** Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem Fac Agr Kagoshima Univ* 6:39–78

**Pagnotta, M. A., Cardarelli, M. T., Rey Muñoz, N. A., Tucci, M., y Saccardo, F. (2004).** Assessment of genetic variation in artichoke of 'Romanesco' type by molecular markers. *Acta Hort*, 660, 99-104.

**Pagnotta, M.A., Rey, N.A., Mondini, L., Aringoli, R., Jordan, R. y Saccardo, F. (2016).** Assessment of artichoke hybrids under USA and Italian conditions and the heritability of some important traits. *Acta Hort* 1147:257–264.

**Pandino, G., Lombardo, S., y Mauromicale, G. (2013).** Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Ind. Crop. Prod.* , 44-49.

**Paterson, A. (1996).** Making genetic maps. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, 23- 39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press; Austin, Texas.

**Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M., y Rafalski, A. (1998).** Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular biology and evolution*, 15(10), 1275-1287.

**Perez-Vich, B., Berry, S. T., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., Gandhi, S., Freeman, C., ... y Leon, A. J. (2005).** Molecular mapping of nuclear male sterility genes in sunflower. *Crop science*, 45(5), 1851-1857.

**Pignone, D. y Sonnante, G. (2004).** Wild artichokes of south Italy: did the story begin here? *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 577– 580.

**Portis, E., Acquadro, A., Comino, C., Mauromicale, G., Saba, E., y Lanteri, S. (2005a).** Genetic structure of island populations of wild cardoon [*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori] detected by AFLPs and SSRs. *Plant Science* , 169:199-210.

- Portis, E., Barchi, L., Acquadro, A., Macua, J., y Lanteri, S. (2005b).** Genetic diversity assessment in cultivated cardoon by AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellite markers. *Plant Breeding*, 124:299-304.
- Portis, E., Mauromicale, G., Barchi, L., Mauro, R., y Lanteri, S. (2005c).** Population structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke germplasm from Sicily Island. *Plant Science*, 168(6), 1591-1598.
- Portis, E., Mauromicale, G., Mauro, R., Acquadro, A., Scaglione, D., y Lanteri, S. (2009).** Construction of a reference molecular linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). *Theoretical and Applied Genetics*, 120(1), 59-70.
- Portis, E., Scaglione, D., Acquadro, A., Mauromicale, G., Mauro, R., Knapp, S. J., y Lanteri, S. (2012).** Genetic mapping and identification of QTL for earliness in the globe artichoke/cultivated cardoon complex. *BMC Research Notes*, 5(1), 252.
- Portis, E., Mauro, R. P., Barchi, L., Acquadro, A., Mauromicale, G., y Lanteri, S. (2014).** Mapping yield-associated QTL in globe artichoke. *Molecular breeding*, 34(2), 615-630.
- Principe, J. (1984).** Male-sterility in artichoke. *HortSci*, 19-864.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., ... y Baumeister, K. (1987).** A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238(4825), 336-341.
- Rahman, M., McVetty, P. B., y Li, G. (2007).** Development of SRAP, SNP and Multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(8), 1101-1107.
- Raja, D., Kumar, M. S., Devi, P. R., Loganathan, S., Ramya, K., Kannan, N., y Subramanian, V. (2018).** Identification of molecular markers associated with genic male sterility in tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through bulk segregant analysis using a cotton SNP 63K array. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54(4), 154-160.
- Raja, M. M., Vijayalakshmi, G., Naik, M. L., Basha, P. O., Sergeant, K., Hausman, J. F., y Khan, P. S. S. V. (2019).** Pollen development and function under heat stress: from effects to responses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(4), 47.



- Rajesh, M. K., Jerard, B. A., Preethi, P., Thomas, R. J., Fayas, T. P., Rachana, K. E., y Karun, A. (2013).** Development of a RAPD-derived SCAR marker associated with tall-type palm trait in coconut. *Scientia Horticulturae*, 150, 312-316.
- Ramos, P., Santos, S., Guerra, A., Guerreiro, O., Freire, C., Rocha, S., y otros. (2014).** Phenolic composition and antioxidant activity of different morphological parts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC). *Ind. Crop. Prod.* , 460-471.
- Ramos, P., Guerra, A., Guerreiro, O., Santos, S., Oliverira, H., Freire, C., y otros. (2016).** Antiproliferative effects of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC) lipophilic extracts. *Int. J. Mol. Sci.* , 63.
- Reolon da Costa, A., Ferrari Grando, M., y Cravero, V. (2016).** Alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori): Alimento funcional e fonte de compostos promotores da saúde. *Fitos Eletrônica* , 10:526-538.
- Rey, N.A., Jordan, R., Saccardo, F. y Pagnotta, M.A. (2016).** A successful strategy to obtain artichoke hybrids. *Acta Hortic.* 1147, 357-368
- Rottenberg, A., y Zohary, D. (2005).** Wild genetic resources of cultivated artichoke. *Acta Horticulturae* , 681:307-311.
- Rottenberg, A., Zohary, D., y Nevo, E. (1996).** Isozyme relationships between cultivated artichoke and the wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution* , 43:59-62.
- Ruiz, J. J., Pico, B., Li, G., D'Antonio, V., Falk, B., y Quiros, C. F. (2001).** Identification of markers linked to a celery mosaic virus resistance gene in celery. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(4), 432-435.
- Ruiz-Martinez, M., Berka, J., Belenkii, A., Foret, F., Miller , A., y Karger , B. (1993).** DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* , 65: 2851-2858.
- Runge, M.S. y Patterson, C. (2006).** Principles of molecular medicine. *Humana Press*, 58 p. ISBN 978-1-58829-202-5.



**Saccardo, F., Jordan, R., Jordan, A., Crino, P., Micozzi, F., Lo B, C., Temperini, A., Rey, N. y Pagnotta, M.A. (2013).** Innovative strategy to obtain F1 Hybrids of Globe Artichoke. *Acta Hort (ISHS)* 983:159–179.

**Saito, K. (2000).** Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 188-195.

**Sander, L., Child, R., Ulvskov, P., Albrechtsen, M., y Borkhardt, B. (2001).** Analysis of a dehiscence zone endo-polygalacturonase in oilseed rape (*Brassica napus*) and *Arabidopsis thaliana*: evidence for roles in cell separation in dehiscence and abscission zones, and in stylar tissues during pollen tube growth. *Plant Mol Biol*, 46: 469-479.

**Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

**Scaglione, D., Acquadro, A., Portis, E., Taylor, C. A., Lanteri, S., y Knapp, S. J. (2009).** Ontology and diversity of transcript-associated microsatellites mined from a globe artichoke EST database. *BMC genomics*, 10(1), 454.

**Scaglione, D., Reyes-Chin-Wo, S., Acquadro, A., Froenicke, L., Portis, E., Beitel, C., ... y Faccioli, P. (2016).** The genome sequence of the outbreeding globe artichoke constructed de novo incorporating a phase-aware low-pass sequencing strategy of F<sub>1</sub> progeny. *Scientific Reports*, 6, 19427.

**Schnable, P. S., y Wise, R. P. (1998).** The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in plant science*, 3(5), 175-180.

**Schneeberger, K., y Weigel, D. (2011).** Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies. *Trends in plant science*, 16(5), 282-288.

**Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., ... y Hood, L. E. (1986).** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674-679.

**Song, J., Li, Z., Liu, Z., Guo, Y., y Qiu, L. J. (2017).** Next-generation sequencing from bulked-segregant analysis accelerates the simultaneous identification of two qualitative genes in soybean. *Frontiers in plant science*, 8, 919.

- Sonnante, G., De Paolis, A., Lattanzio, V., y Perrino, P. (2002).** Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49(3), 247-252.
- Sonnante, G., Carluccio, A., Vilatersana, A., y Pignone, D. (2007).** On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genet Resour Crop Evol*, 54:483-495.
- Sonnante, G., Carluccio, A. V., De Paolis, A., y Pignone, D. (2008).** Identification of artichoke SSR markers: molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(7), 1029-1046.
- Sonnante, G., Gatto, A., Morgese, A., Montemurro, F., Sarli, G., Blanco, E., y Pignone, D. (2011).** Genetic map of artichoke x wild cardoon: toward a consensus map for *Cynara cardunculus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(7), 1215.
- Soto-Cerda, B. J., y Cloutier, S. (2012).** Association mapping in plant genomes. *Genetic Diversity in Plants*, 29-54.
- Stamigna, C., Micozzi, F., Pandozy, G., Crino, P., y Saccardo, F. (2004).** Produzione di ibridi F<sub>1</sub> di carciofo mediante impiego di cloni maschiosterili. *Italus Hortus* 11, 29–33.
- Stuber, C. (1994).** Heterosis in plant breeding. *Plant Breeding Rev.* 12, 227-251.
- Sun, Y., Wang, J., Crouch, J.H. y Xu, Y. (2010).** Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Mol. Breed*, 26, 493–511.
- Sun, Z., Wang, Z., Tu, J., Zhang, J., Yu, F., McVetty, P. B., y Li, G. (2007).** An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(8), 1305-1317.
- Torki, M., Mandaron, P., Mache, R., y Falconet, D. (2000).** Characterization of a ubiquitous expressed gene family encoding polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 242:427-436.

- Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M.C., Landi, P., Maccaferri, M. y Conti, S. (2002).** Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann. Bot.*89, 941–963.
- Ureta, M. S., Carbonell, F. T., Pandolfo, C., Presotto, A. D., Cantamutto, M. A., y Poverene, M. (2017).** IMI resistance associated to crop-weed hybridization in a natural Brassica rapa population: characterization and fate. *Environmental monitoring and assessment*, 189(3), 101.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., y Bastos, M. L. (2002).** Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4989-4993.
- Van Ooijen y J.W., 2006.** JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Venuprasad, R., Dalid, C.O., Valle, M.D., Zhao, D., Espiritu, M., Cruz, M.T.S., Amante, M. y otros (2009).** Identification and characterization of large-effect quantitative trait loci for grain yield under lowland drought stress in rice using bulk-segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 120, 177–190.
- Vikram, P., Swamy, B., Dixit, S., Ahmed, H., Cruz, M.T.S., Singh, A. y Kumar, A. (2011).** DTY1.1 a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. *BMC Genet.* 12, 89.
- Voorrips, R.E., 2002.** MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity*, 93(1):77-78.
- Vranceanu, V. 1970.** Advances in sunflower breeding in Romania. p. Xing, Q.H., Z.G. Ru, C.J. Zhou, X. Xue, C.Y. Liang, D.E. Yang, 136–148. *In* Int. Sunflower Assoc. (ed.) Proc. 4th Int. Sunflower D.M. Jin, and B. Wang. 2003. Genetic analysis, molecular tagging Conf., Memphis, TN. 23–25 June 1970.
- Wang, Z. W., Xiang, C. P., y Mei, S. Y. (2006).** Cloning and characterization of a novel sulfate transporter gene from radish (*Raphanus sativus* L.). Short Communication. *DNA Sequence*, 17(3), 237-241.

- Wang J., Yao J. y Li W. (2008).** Construction of a molecular map for melon (*Cucumis melo* L.) based on SRAP. *Front. Agric. China*.
- Whelan, E. D. (1980).** A new source of cytoplasmic male sterility in sunflower. *Euphytica*, 29(1), 33-46.
- Win, K. T., Vegas, J., Zhang, C., Song, K., y Lee, S. (2017).** QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber via bulked segregant analysis using next-generation sequencing and conventional methods. *Theoretical and applied genetics*, 130(1), 199-211.
- Winklund, A. (1992).** The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *Bot. J. Linn. Soc* , 109:75-123.
- Xu, Y. y Crouch, J.H. (2008).** Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Sci.* 48, 391–407.
- Xu, Y., Wang, J. y Crouch, J. (2008).** Selective genotyping and pooled DNA analysis: an innovative use of an old concept. In *Recognizing Past Achievement, Meeting Future Needs. Proceedings of the 5th International Crop Science Congress, April 13–18, 2008, Jeju, Korea.* Published on CDROM.
- Yang, L., Fu, S., Khan, M. A., Zeng, W., y Fu, J. (2013).** Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for *Dimocarpus longan* variety authentication. *SpringerPlus*, 2(1), 501.
- Ying, M., Dreyer, F., Cai, D., y Jung, C. (2003).** Molecular markers for genic male sterility in Chinese cabbage. *Euphytica*, 132(2), 227-234.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., y Miller, W. (2000).** “A greedy algorithm for aligning DNA sequences”, *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14
- Zhang, X., Wu, J., Zhang, H., , Y., Guo, A., y Wang, X. (2011a).** Fine mapping of a male sterility gene MS-cd1 in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet.* , 123, 231-8.
- Zhang, F., Chen, S., Chen, F., Fang, W., Chen, y., Li, F. (2011b).** SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). *Mol. Breeding*, 27:11-23.

**Zou, C., Wang, P., y Xu, Y. (2016).** Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant biotechnology journal*, 14(10), 1941-1955.

## ANEXO

Tabla 1: 72 combinaciones SRAP evaluadas.

<b>Combinación</b>	<b><i>Primer Foward</i></b>	<b><i>Primer Reverse</i></b>
<b>1</b>	Me1	Em1
<b>2</b>	Me1	Em2
<b>3</b>	Me1	Em3
<b>4</b>	Me1	Em4
<b>5</b>	Me1	Em5
<b>6</b>	Me1	Em6
<b>7</b>	Me1	Em7
<b>8</b>	Me1	Em8
<b>9</b>	Me1	Em9
<b>10</b>	Me1	Em10
<b>11</b>	Me2	Em1
<b>12</b>	Me2	Em2
<b>13</b>	Me2	Em3
<b>14</b>	Me2	Em4
<b>15</b>	Me2	Em5
<b>16</b>	Me2	Em6
<b>17</b>	Me2	Em7
<b>18</b>	Me2	Em8
<b>19</b>	Me2	Em9
<b>20</b>	Me2	Em10
<b>21</b>	Me3	Em1
<b>22</b>	Me3	Em2
<b>23</b>	Me3	Em3

<b>24</b>	Me3	Em4
<b>25</b>	Me3	Em5
<b>26</b>	Me3	Em6
<b>27</b>	Me3	Em7
<b>28</b>	Me3	Em8
<b>29</b>	Me3	Em9
<b>30</b>	Me3	Em10
<b>31</b>	Me4	Em1
<b>32</b>	Me4	Em2
<b>33</b>	Me4	Em3
<b>34</b>	Me4	Em4
<b>35</b>	Me4	Em5
<b>36</b>	Me4	Em6
<b>37</b>	Me4	Em7
<b>38</b>	Me4	Em8
<b>39</b>	Me4	Em9
<b>40</b>	Me4	Em10
<b>41</b>	Me5	Em1
<b>42</b>	Me5	Em2
<b>43</b>	Me5	Em3
<b>44</b>	Me5	Em4
<b>45</b>	Me5	Em5
<b>46</b>	Me5	Em6
<b>47</b>	Me5	Em7
<b>48</b>	Me5	Em8
<b>49</b>	Me5	Em9

<b>50</b>	Me5	Em10
<b>51</b>	Me6	Em1
<b>52</b>	Me6	Em2
<b>53</b>	Me6	Em3
<b>54</b>	Me6	Em4
<b>55</b>	Me6	Em5
<b>56</b>	Me6	Em6
<b>57</b>	Me6	Em7
<b>58</b>	Me6	Em8
<b>59</b>	Me6	Em9
<b>60</b>	Me6	Em10
<b>61</b>	Me7	Em1
<b>62</b>	Me7	Em2
<b>63</b>	Me7	Em3
<b>64</b>	Me7	Em4
<b>65</b>	Me7	Em5
<b>66</b>	Me7	Em6
<b>67</b>	Me7	Em7
<b>68</b>	Me7	Em8
<b>69</b>	Me7	Em9
<b>70</b>	Me7	Em10
<b>71</b>	Me8	Em1
<b>72</b>	Me8	Em2