

## **TESIS DOCTORAL**

### **ANÁLISIS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS Y METODOLÓGICOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS RESPONSABLES DEL SABOR Y LAS PROPIEDADES FUNCIONALES EN CEBOLLA Y OTRAS ESPECIES COMESTIBLES DE ALIÁCEAS**

Presentada al **Programa de Postgrado en Biología (PROBIOL)** de la Universidad  
Nacional de Cuyo.

Mendoza, 2015

**Tesista: Ing. Agrónoma Hebe Vanesa Beretta**

**Director de Tesis: Dr. Ing. Agrónomo Pablo Federico Cavagnaro**

**Co-Director: Dr. Ing. Agrónomo Claudio Rómulo Galmarini**

**Lugar de trabajo:** Facultad de Ciencias Agrarias – UNCuyo. EEA INTA La Consulta,  
Mendoza.

## **Agradecimientos:**

Agradezco especialmente a mi familia Fabricio y Angelina, por su contención y paciencia.

También a mis padres y hermanos que siempre me motivaron a seguir avanzando. Gracias por creer siempre en mí y brindarme su ayuda y apoyo incondicional en todo momento.

A mis compañeras tesistas Florencia Bannoud, Karina Barboza y Cecilia Salinas por hacer del trabajo de todos los días una tarea divertida y por ayudarme y aprender a mi lado en casi todas las etapas de mi tesis.

A mi director Pablo Cavagnaro por dirigirme durante la tesis y por su orientación y enseñanzas.

A Magalí Gimenez por su gran ayuda en la realización de geles de acrilamida.

A Claudio Galmarini por facilitarme las poblaciones segregantes estudiadas y por su apoyo durante la tesis.

A Ricardo Masuelli y María Sance, por formar parte de mi comité tutorial.

Héctor Fuligna por el cuidado y mantenimiento de las plantas a campo.

A CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por financiar esta tesis.

A INTA-La Consulta y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo por permitirme desarrollar parte de este trabajo en sus instalaciones y laboratorios.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|                            |      |
|----------------------------|------|
| AGRADECIMIENTOS.....       | ii   |
| LISTA DE TABLAS.....       | v    |
| LISTA DE FIGURAS.....      | vii  |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | x    |
| RESUMEN.....               | xiii |
| ABSTRACT.....              | xiv  |

### Capítulo 1

#### Introducción general

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Origen e importancia del cultivo.....  | 2  |
| 1.2. Variedades.....  | 3  |
| 1.3. Propiedades funcionales de la cebolla.....   | 4  |
| 1.3.1. Actividad antiplaquetaria.....   | 4  |
| 1.3.2. Actividad antioxidante.....  | 6  |
| 1.3.3. Efectos relacionados a las enfermedades cardiovasculares.....  | 7  |
| 1.3.4. Otras propiedades y efectos benéficos.....   | 8  |
| 1.4. Principales compuestos de interés nutracéutico de la cebolla.....  | 9  |
| 1.4.1. Compuestos azufrados.....  | 9  |
| 1.4.1.1. Reacción generadora del flavor.....  | 11 |
| 1.4.1.2. Factores que afectan la intensidad del flavor.....   | 13 |
| 1.4.1.2.1. Factores genéticos.....  | 13 |
| 1.4.1.2.2. Factores ambientales.....  | 14 |
| 1.4.2. Compuestos fenólicos.....  | 14 |
| 1.4.3. Carbohidratos.....   | 16 |
| 1.5 Relación entre actividad antiplaquetaria, sabor (pungencia), contenido de compuestos azufrados y sólidos..... | 17 |
| 1.6. Formulación del problema, planteo de hipótesis y objetivos.....  | 19 |

### Capítulo 2

#### Análisis genético de caracteres de interés agronómico y funcional en cebolla heredabilidad ( $H^2$ ), número de genes involucrados y relaciones entre caracteres.

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 2.1. Introducción.....         | 22 |
| 2.2. Materiales y métodos..... | 23 |
| 2.3. Resultados.....           | 29 |
| 2.4. Discusión.....            | 54 |
| 2.5. Conclusiones.....         | 63 |

### **Capítulo 3**

#### **Desarrollo y evaluación de marcadores moleculares microsatélites (SSRs) para ajo y cebolla.**

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 3.1. Introducción.....         | 65 |
| 3.2. Materiales y métodos..... | 67 |
| 3.3. Resultados. ....          | 77 |
| 3.3. Discusión.....            | 93 |
| 3.4. Conclusiones.....         | 94 |

### **Capítulo 4**

#### **Relación entre compuestos funcionales y las propiedades antioxidantes y anti-agregantes en especies comestibles de Aliáceas.**

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| 4.1. Introducción.....         | 97  |
| 4.2. Materiales y métodos..... | 99  |
| 4.3. Resultados. ....          | 103 |
| 4.3. Discusión.....            | 103 |
| 4.4. Conclusiones.....         | 113 |

### **Capítulo 5**

#### **Interferencias en la determinación espectrofotométrica de piruvato en cebolla.**

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| 5.1. Introducción.....         | 116 |
| 5.2. Materiales y métodos..... | 119 |
| 5.3. Resultados. ....          | 122 |
| 5.4. Discusión.....            | 122 |
| 5.5. Conclusiones.....         | 132 |

### **Capítulo 6**

#### **Conclusiones generales y perspectivas a futuro.....**

134

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| 6.2 Bibliografía..... | 141 |
|-----------------------|-----|

## LISTA DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Características de los cultivares parentales usados para generar las poblaciones F <sub>2</sub> .....  | 24  |
| <b>Tabla 2.</b> Pedigree y características (número y tamaño) de las poblaciones F <sub>2</sub> evaluadas.....  | 25  |
| <b>Tabla 3.</b> Valores medios, heredabilidad, asimetría y presencia de segregación transgresiva de los caracteres peso, sólidos y piruvato en cada población F <sub>2</sub> .....   | 31  |
| <b>Tabla 4.</b> ANOVA. Análisis de la varianza y comparación de medias (Fisher) de los caracteres peso, sólidos solubles (SS) y totales (ST) y piruvato (PV) en los distintos cruzamientos.....  | 50  |
| <b>Tabla 5.</b> Valores medios, heredabilidad y presencia de segregación transgresiva de los caracteres tiosulfatos, carbohidratos, R x, polifenoles y actividad antiplaquetaria <i>in vitro</i> en la población F <sub>2</sub> 2143.....  | 51  |
| <b>Tabla 6.</b> Coeficientes de correlación entre los caracteres evaluados en la población 2143.....   | 54  |
| <b>Tabla 7.</b> Secuencias utilizadas para el desarrollo de nuevos primers.....  | 68  |
| <b>Tabla 8.</b> Cebadores de cebolla evaluados publicados previamente.....   | 70  |
| <b>Tabla 9.</b> Cebadores de ajo evaluados publicados previamente.....   | 75  |
| <b>Tabla 10.</b> Características de cebadores y amplicones esperados para SSRs de ajo y cebolla.....   | 77  |
| <b>Tabla 11.</b> Presencia y tipo de polimorfismo en marcadores microsatélites en ajo y cebolla.....   | 88  |
| <b>Tabla 12.</b> Presencia y tipo de polimorfismo en marcadores microsatélites en dos poblaciones segregantes de cebolla.....  | 91  |
| <b>Tabla 13.</b> Propiedades antiplaquetarias y antioxidantes y contenido de compuestos bioactivos en 6 especies de aliáceas.....  | 103 |
| <b>Tabla 14.</b> Valores de correlación (r) entre piruvato (PV), fenoles totales (FTs), sólidos solubles (SS), sólidos totales (ST), tiosulfatos (TS), flavonoides totales (FL), no-flavonoides totales (NFL), actividad antioxidante (AOXA) y actividad antiplaquetaria <i>in vitro</i> (AAIV)..... | 107 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 15.</b> Valores de correlación (r) entre las capacidades antioxidantes y antiplaquetarias de aliáceas y el contenido de 11 compuestos fenólicos.....  | 108 |
| <b>Tabla 16.</b> Autovalores, autovectores y % de varianza acumulada para el análisis de componentes principales del conjunto total de datos (arriba) y del perfil fenólico (abajo) para las 6 especies de <i>Allium</i> analizadas..... | 110 |
| <b>Tabla 17.</b> Lista de publicaciones científicas que utilizan el método SW para determinar el contenido de piruvato en cebolla.....   | 116 |
| <b>Tabla 18.</b> Comparación del contenido de piruvato determinado por el método SW y el método AB para 11 cultivares de cebolla en tres años de cultivo.....  | 123 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Respuesta al daño vascular .....  | 5  |
| <b>Figura 2.</b> S-alquencil-L-sulfóxidos de cisteína en diferentes especies del género <i>Allium</i> ..                                       | 11 |
| <b>Figura 3.</b> Reacción generadora del flavor en <i>Alliums</i> .....  | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Los principales compuestos azufrados producidos en cebolla luego de la<br>disrupción de tejido.....                           | 12 |
| <b>Figura 5.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Angaco INTA x Valcatorce INTA<br>(1 población F <sub>2</sub> ).....               | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1<br>población F <sub>2</sub> ).....                 | 33 |
| <b>Figura 7.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (10<br>poblaciones F <sub>2</sub> ). .....             | 34 |
| <b>Figura 8.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Antártica INTA x Refinta 20 (1<br>población F <sub>2</sub> ).....                 | 35 |
| <b>Figura 9.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Refinta 20 (↑ ss) x Refinta 20 (↓ss)<br>(1 población F <sub>2</sub> ). .....      | 35 |
| <b>Figura 10.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA<br>(5 poblaciones F <sub>2</sub> ).....             | 36 |
| <b>Figura 11.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (3<br>poblaciones F <sub>2</sub> ).....                 | 37 |
| <b>Figura 12.</b> Histograma del carácter sólidos solubles del cruzamiento Angaco INTA x<br>Valcatorce INTA (1 población F <sub>2</sub> )..... | 38 |
| <b>Figura 13.</b> Histograma del carácter sólidos solubles del cruzamiento Navideña INTA x<br>Angaco INTA (1 población F <sub>2</sub> ).....   | 39 |
| <b>Figura 14.</b> Histograma del carácter peso de cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (6<br>poblaciones F <sub>2</sub> ).....               | 40 |
| <b>Figura 15.</b> Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Antártica INTA x<br>Refinta 20 (1 población F <sub>2</sub> ).....    | 41 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 16.</b> Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Refinta 20( $\uparrow$ ss) x Refinta 20 ( $\downarrow$ ss) (1 población $F_2$ )..... | 41 |
| <b>Figura 17.</b> Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (4 poblaciones $F_2$ ).....                             | 42 |
| <b>Figura 18.</b> Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (4 poblaciones $F_2$ ).....                                 | 43 |
| <b>Figura 19.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Angaco INTA x Valcatorce INTA (1 población $F_2$ ).....                              | 44 |
| <b>Figura 20.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1 población $F_2$ ).....                                | 44 |
| <b>Figura 21.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (6 poblaciones $F_2$ ). .....                             | 45 |
| <b>Figura 22.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Antártica INTA x Refinta 20 (1 población $F_2$ ).....                                | 45 |
| <b>Figura 23.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Refinta 20 (bajos sólidos) x Refinta 20 (altos sólidos) (1 población $F_2$ ).....    | 46 |
| <b>Figura 24.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (4 poblaciones $F_2$ ).....                             | 46 |
| <b>Figura 25.</b> Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (2 poblaciones $F_2$ ).....                                 | 47 |
| <b>Figura 26.</b> Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Angaco INTA x Valcatorce INTA (1 población $F_2$ ).....                                     | 48 |
| <b>Figura 27.</b> Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1 población $F_2$ ).....                                       | 48 |
| <b>Figura 28.</b> Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (6 poblaciones $F_2$ ).....                                      | 49 |
| <b>Figura 29.</b> Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Refinta 20 (bajos sólidos) x Refinta 20 (altos sólidos) (1 población $F_2$ ).....           | 49 |
| <b>Figura 30.</b> Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (4 poblaciones $F_2$ ).....                                    | 50 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 31.</b> Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (2 poblaciones F <sub>2</sub> ).....  | 50  |
| <b>Figura 32.</b> Histogramas de los caracteres tiosulfatos, flavonoides, piruvatos, polifenoles y actividad antiplaquetaria del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA.....  | 53  |
| <b>Figura 33.</b> Histogramas de los principales carbohidratos en cebolla del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA.....   | 54  |
| <b>Figura 34.</b> Análisis de amplificación en gel de agarosa al 3%.....  | 70  |
| <b>Figura 35.</b> Porcentaje de transferibilidad de los marcadores diseñados sobre secuencias de ajo y sobre secuencias de cebolla en otras aliáceas.....   | 87  |
| <b>Figura 36.</b> Análisis de polimorfismo en gel de acrilamida.....  | 88  |
| <b>Figura 37.</b> Análisis de componentes principales. (A) Análisis de componentes principales del conjunto de datos incluyendo piruvato (PV), compuestos fenólicos totales (FTs), sólidos solubles (SS), sólidos totales (ST), tiosulfatos (TSs), flavonoides totales (FL), no flavonoides totales (NFL), actividad antioxidante (AOXA), actividad antiplaquetaria <i>in vitro</i> (AAIV) para ambos donantes analizada como IC <sub>50</sub> . (B) Análisis de componentes principales del perfil fenólico expresado como proporción relativa (%) de cada compuesto.....  | 112 |
| <b>Figura 38.</b> Diferencias en los niveles de piruvato obtenidos por los métodos SW y AB para cebollas de diferente color en tres años de cultivo. Las diferencias se calcularon como SW – AB.....  | 126 |
| <b>Figura 39.</b> Valores de absorbancia de extractos acuosos de cebolla debida a compuestos diferentes de piruvato, en longitudes de onda utilizadas por el método SW (420 nm) y por el método AB (515 nm). Los asteriscos indican diferencias significativas entre métodos para cada cultivar (p < 0,05). Los números sobre las barras indican el porcentaje que cada valor de absorbancia representa respecto de la absorbancia total obtenida utilizando el método estándar de piruvato, es decir, con la adición de DNPH, para cada método y cultivar.....   | 128 |
| <b>Figura 40.</b> Espectros de absorbancia para cebollas blancas, amarillas y rojas y para el compuesto flavonoide quercetina con y sin la adición de NaOH en concentraciones utilizadas por los métodos SW (0,6N) y AB (1,5N). Las líneas verticales indican las longitudes de onda utilizadas por los métodos SW (420nm) y AB (515 nm).....   | 129 |
| <b>Figura 41.</b> Absorbancia a 420 nm de extractos acuosos de una cebolla blanca (Refinta 20), una amarilla (Valcatorce INTA), una roja (Morada 1) y del extracto de una cebolla blanca adicionado con quercetina y/o con antocianinas a una concentración equivalente a la hallada en cebollas amarillas y rojas, respectivamente. Las letras distintas indican diferencias significativas p<0,05. Querc. (A) = cantidad de quercetina presente en el cultivar amarillo; Querc. (R) = cantidad de quercetina presente en el cultivar rojo; Ant. (R) = cantidad de antocianos presentes en el cultivar rojo..... | 131 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

%RD = Diferencia relativa porcentual.

1-PECSO = 1-propenil sulfóxido de cisteína.

2-PECSO = 2-propenil sulfóxido de cisteína.

AA = actividad antiplaquetaria.

AAIV = actividad antiplaquetaria *in vitro*.

AAPH = compuesto generador de radicales libres de referencia (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) di-hidrocloruro).

AB = método de Anthon y Barrett (2003).

ACP = Análisis de componentes principales.

ACSOSs = S-alquenil- L- sulfóxidos de cisteína

ADP= adenosin difosfato.

ANOVA = Análisis de la varianza.

AOXA = Actividad antioxidante.

bp = pares de bases.

CP = componente principal.

CV = coeficiente de variación.

D.E. = desviación estándar.

DNPH = di-nitrofenil hidracina.

dNTP = desoxinucleótido trifosfato.

DTNB = ácido ditiobis-nitrobenzoico.

ECg = epicatequina galato.

ECV = Enfermedades cardiovasculares.

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético.

EGC = epigallocatequina.

EGCg = epigallocatequina galato.

ELSD= detector evaporativo de masas (Evaporative Light Scattering Detector).

EST = marcador de secuencia transcripta o expresada (Expressed Sequence Tag).

F<sub>2</sub> = filial 2, población segregante proveniente de una planta F1 autofecundada.

FL = Flavonoides.

FOS = fructooligosacáridos.

GSS = marcador de secuencia genómica (Genome Survey Sequences).

H<sup>2</sup> = heredabilidad en sentido amplio.

HPLC = Cromatografía líquida de alta eficiencia (High performance liquid chromatography).

IC<sub>50</sub> = dosis necesaria para lograr una inhibición del 50% en la agregación plaquetaria.

INTA = Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

LSD = diferencia mínima no significativa.

MP = Marcador de peso molecular.

N = número de individuos.

NCBI = Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information).

nd = sin datos.

NFL = compuestos no flavonoides.

ORAC = Capacidad de absorbanza del radical oxígeno.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

pf = peso fresco.

PRP = Plasma rico en plaquetas.

PTFE = filtro de membrana de politetrafluoroetileno, 0,45 µm marca Target.

PTs = polifenoles totales.

PV = Piruvato.

QTL = loci de caracteres cuantitativos (quantitative trait loci).

R x A = Cruzamiento entre Refinta 20 y Angaco INTA.

R x N = Cruzamiento entre Refinta 20 y Navideña INTA.

SAM = Selección asistida por marcadores.

SS = sólidos solubles.

SSRs = marcadores moleculares microsatélites (simple sequence repeats).

ST = sólidos totales.

SW = método de Schwimmer y Weston (1961).

TBE = buffer con Tris, ácido bórico y EDTA.

TBS = Tris buffer salino.

TE = equivalentes de TROLOX.

TROLOX= compuesto antioxidante de referencia (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

TSs = Tiosulfatos.

uv = ultravioleta.

Vf = Varianza fenotípica.

Vg = Varianza genotípica.

## **Resumen:**

La cebolla se cultiva y consume en todo el mundo, por su sabor y sus propiedades benéficas para la salud. En esta tesis se caracterizó la variabilidad genética, el tipo de segregación y número de genes involucrados, y la heredabilidad ( $H^2$ ) de caracteres de interés agronómico y nutricional y/o funcional en cebolla, incluidos el contenido de sólidos, compuestos azufrados, fenólicos y carbohidratos, la pungencia, y la actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV). Se determinaron valores de  $H^2$  y correlaciones entre los caracteres evaluados en 22 poblaciones segregantes  $F_2$ . Se obtuvo alta variabilidad y valores medios a altos de  $H^2$  para los caracteres estudiados sugiriendo que gran parte de la variación observada es heredable. La existencia de correlación positiva y significativa entre tiosulfatos y AAIV sugiere que los compuestos organoazufrados están involucrados en la AAIV de la cebolla.

Se evaluó el contenido de compuestos azufrados y fenólicos y las propiedades antiplaquetarias y antioxidantes en seis hortalizas de aliáceas. Los resultados sugieren que los compuestos azufrados y fenólicos influyen en forma diferencial sobre las actividades antiplaquetarias y antioxidantes de aliáceas.

Se desarrollaron marcadores moleculares microsátélites y se evaluó la transferibilidad hacia otras especies de aliáceas como también el nivel de polimorfismo en cebolla, ajo y 2 poblaciones segregantes de cebolla. Estos marcadores serán de utilidad para el mapeo genético de los caracteres antes mencionados.

Finalmente, se puso a punto una técnica ampliamente usada para determinar piruvato en aliáceas, un indicador de la pungencia y el contenido de compuestos azufrados. Se detectaron y cuantificaron errores en el método tradicional para medición de piruvato y se identificaron como fuentes de error interferencias con pigmentos presentes en cebollas coloreadas, como quercetina y antocianos.

Se espera que los resultados alcanzados en esta tesis contribuyan al mejoramiento genético de cebolla y otras aliáceas y a su aprovechamiento como alimentos funcionales.

## **Abstract:**

Onion is consumed and cultivated worldwide, mainly due to its particular taste and also for its beneficial properties. In this thesis the genetic variability, segregation, number of genes responsible for each character and the broad sense heritability of soluble solids, total solids, sulfur, phenolic and carbohydrate compounds, pungency and antiplatelet activity in onion. Broad sense heritability and correlation among characters was determined in 22 onion F<sub>2</sub> populations. Medium to high values of heritability were obtained indicating that much of the phenotypic variability is explained by genetic differences. The statistically significant and positive correlations between AAIIV and thiosulfinates suggest that these sulfur compounds are involved in onion antiaggregatory effects.

The sulfur and phenolic content and the antioxidant and antiplatelet activities of six *Allium* species were assessed. Our results indicate that organosulfur and phenolic compounds contribute to similar extents in *Allium* IVAA, but phenolic compounds appear to have a much greater contribution in the antioxidant effects of these vegetables.

Molecular markers SSR were developed for onion and garlic and its transferability to other *Allium* species was evaluated. The polymorphism of each marker was also evaluated in onion, garlic and 2 onion segregating populations. These markers will be useful to develop genetic maps and for QTL mapping of the characters previously analyzed.

Finally, the source of variability and errors in the determination of pyruvate was investigated in onion. The magnitude of errors and their nature was established using the traditional method for PV determination. We found that compounds naturally present in onion can contribute to the interference.

We hope that the results reached in this thesis contribute significantly to the *Alliaceae* molecular breeding programs.

## **CAPÍTULO 1**

### **Introducción general**

## **1. Introducción.**

### **1.1. Origen e importancia del cultivo**

La cebolla pertenece a la familia *Alliaceae* y al género *Allium*, el cual comprende más de 700 especies, entre las cuales hay especies ornamentales, malezas y especies comestibles de importancia económica como ajo (*Allium sativum*), puerro (*A. porrum*), shallot (*A. ascalonicum*), ciboulette (*A. schoenoprasum*) y cebolla de verdeo (*A. fistulosum*) entre otras. El centro de origen de este género se cree que es Asia Central, particularmente la región que incluye los países de Tajikistán, Turkmenistán, Uzbekistán y el norte de Irán, Afganistán y Pakistán. Allí se encuentra el primer centro de domesticación del ajo y la cebolla. Posteriormente existieron otros centros de domesticación secundarios como India, Europa, África y América (Hanelt, 1990). Hanelt (1990) postula que la primera domesticación de la cebolla puede haber ocurrido en las montañas de Uzbekistan y Kazakistán.

Las aliáceas se utilizan principalmente para saborizar los alimentos. La producción de cebolla ocupa el segundo lugar entre las hortalizas del mundo. El cultivo de ajo y cebolla presenta una amplia distribución en distintas regiones del planeta y su producción muestra una tendencia creciente en la última década (Sance, 2010; Cvagnaro, 2007). A nivel mundial, la producción de cebolla y ajo es de 41 y 15 millones de toneladas anuales, respectivamente (FAO, 2012). Los principales países productores de cebolla son: Holanda, India, España, EEUU, México, Argentina, Nueva Zelanda y Australia y el principal país productor (abarcando más del 75 % de la producción global) de ajo es China.

En Argentina la producción de cebolla anual llega a 450000 ton, de las cuales el 97% se destina a mercado fresco y el 3% a industria, principalmente a la industria del deshidratado (SENASA, 2013). Argentina produce 120.000 Tn de ajo, de las cuales el 65 % se exporta, el 25 % se destina a mercado interno y el 10 % restante a “semilla” (Boletín INTA Informa Internacional N° 04). El consumo promedio de cebolla en Argentina es de 10kg/habitante/año. Argentina es el sexto exportador mundial, siendo la principal hortaliza exportada. Durante el año 2013 se exportaron 229000 ton por un valor de U\$S 54.914.000

(FAO, 2012). Los principales destinos son Brasil (94.4%), Paraguay (2.8%) y Uruguay (2%).

Argentina posee tres grandes zonas productoras de cebolla: la zona Sur y los Valles Patagónicos (Buenos Aires y Río Negro) con aproximadamente 18.000 ha, lo que representa el 75 % del total cultivado en el país (Buenos Aires representa del 50 % del total nacional; la Zona Norte, representada por Santiago del Estero, con 3.000 ha y la zona Centro Oeste, constituida por San Juan y Mendoza, con alrededor de 3.000 ha, y una representatividad del 12,5 % para cada una. La Zona Norte se especializa en cebollas de día corto tipo valencianita; la zona Centro produce cebollas de día corto, intermedio y largo; aunque la tendencia es cada vez mayor hacia las de día corto e intermedio y la zona sur cebollas de día largo principalmente (Fuente: IDR 2013).

## **1.2. Variedades**

Existen en el mundo muchas variedades de cebolla que han sido desarrolladas buscando su adaptación a distintas temperaturas y fotoperiodos en lugares en los que se cultiva y a las preferencias alimenticias de cada lugar (Brewster,1994). La cebolla forma bulbos en respuesta a estímulos ambientales, en especial el largo del día y las temperaturas. Estos requerimientos fotoperiódicos para la bulbificación permiten clasificar las variedades en diferentes grupos: las cebollas de día largo que requieren un mínimo de 14 horas de fotoperíodo, las cebollas de día intermedio que requieren entre 13 y 14 horas de luz y las cebollas de día corto, que requieren de 12 a 13 horas (Galmarini, 1998). La formación del bulbo se produce en los meses primavera-estivales.

Dentro de esta oferta varietal se pueden hallar variedades de características, composición y sabor diferente. El mercado de cebolla para consumo en fresco requiere variedades suaves y en general de poco color (Galmarini, 1998). Por el contrario, la industria del deshidratado requiere variedades pungentes, con alto contenido de sólidos solubles. El germoplasma de cebolla argentino posee orígenes europeos. Las cultivares ‘Valcatorce INTA’, ‘Valuno INTA’, ‘Cobriza INTA’ y ‘Antartica INTA’ fueron desarrolladas a partir de poblaciones tipo “Valenciana”. La variedad Navideña INTA fue desarrollada a partir de poblaciones de cebolla española de día largo tipo Torrentina, originarias del sur de España, con

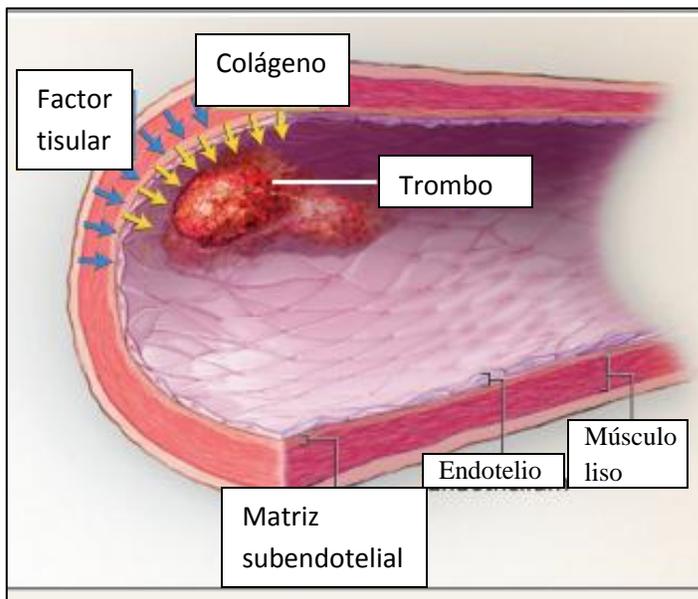
requerimientos intermedios para bulbificar. La cultivar Angaco INTA, por su parte, se originó a partir de poblaciones españolas de cebolla de día corto tipo Valencianita. La cultivar Refinta 20, utilizada para deshidratado, se originó a partir de poblaciones norteamericanas tipo “Southport White Globe”. Refinta es de día largo y posee alto contenido de sólidos (Galmarini, 1998; Sance et al., 2008)

### **1.3. Propiedades funcionales de las aliáceas**

Se han estudiado y comprobado diversas propiedades funcionales de la cebolla, el ajo y las otras especies de aliáceas tales como el puerro, la cebolla de verdeo, el ciboulette y el shallot. Entre ellas se ha demostrado sus propiedades anticancerígenas, hipolipidémicas, hipotensoriales, antiplaquetarias, antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas. El perfil composicional de las aliáceas está estrechamente ligado a sus efectos protectores contra las distintas patologías.

#### **1.3.1. Actividad antiplaquetaria**

Una de las propiedades benéficas para la salud más estudiadas de la cebolla y el ajo es la actividad antiplaquetaria. La hemostasis es el proceso que mantiene la integridad del sistema circulatorio luego de un daño vascular y comprende un conjunto de mecanismos que controlan la pérdida de sangre en el organismo (Furie et al., 2008). El colágeno (que se ubica en la matriz subendotelial) y el factor tisular (que viene del flujo sanguíneo o de la pared de la vena) favorecen el mantenimiento de un sistema circulatorio cerrado. Cuando la pared de un vaso se rompe, o el endotelio es lastimado, el colágeno y el factor tisular se ven expuestos al flujo sanguíneo, iniciando la formación de un trombo. El colágeno expuesto promueve la acumulación y la activación de plaquetas, mientras que el factor tisular expuesto inicia la formación de trombina, la cual tiene dos funciones: 1) activa las plaquetas y 2) cataliza el pasaje de fibrinogen a fibrina. Figura 1.



**Figura 1.** Respuesta al daño vascular (Adaptada de Furie et al., 2008)

Las interacciones entre proteínas de las plaquetas y el colágeno resultan en la adhesión de las plaquetas al sitio del daño y así se desencadena una cascada proteolítica que desemboca en la producción de trombina. La trombina se une a un receptor en la superficie de las plaquetas activando las plaquetas y causando que liberen serotonina, tromboxano A<sub>2</sub> y ADP. A su vez, estos agonistas activan a otras plaquetas y amplifican la señal de la formación de trombos. Un trombo en desarrollo recluta a otras plaquetas no estimuladas. Y a su vez, otras plaquetas dentro del trombo permanecen inactivas y pueden separarse del coágulo. Por esto la formación del coágulo es un proceso dinámico en el cual algunas plaquetas se adhieren a otras, otras se separan del trombo en desarrollo y en el cual la ruptura, el flujo y la turbulencia y el número de plaquetas intervinientes definen la estructura del coágulo. A pesar de que el mecanismo de agregación de plaquetas ha sido y es ampliamente estudiado, aún no está claro el o los mecanismos por los cuales los compuestos presentes en la cebolla intervienen en la inhibición plaquetaria. Ali (2000) reportó que tanto el ajo como la cebolla poseen compuestos (azufrados y fenólicos) que son capaces de intervenir en varios puntos diferentes de la ruta metabólica del ácido araquidónico (que da origen a compuestos eicosanoides que son responsables directos de la

agregación plaquetaria) evitando la formación del tromboxano. Este mecanismo de inhibición plaquetaria sería uno entre otros tales como la modificación de las membranas de las plaquetas y la inhibición de la movilización del calcio (Ali et al., 2000). Moon (2000) propuso que los efectos antiplaquetarios en cebolla serían debido al menos en parte a una disminución de la liberación del ácido araquidónico, una inhibición de la enzima tromboxano-sintasa y a un bloqueo del receptor de membrana del tromboxano. Un estudio más reciente reportó que en ratas alimentadas con extractos acuosos de piel de cebolla ricos en quercetina se disminuía la agregación plaquetaria a través de la inhibición de la ciclooxigenasa y la tromboxano sintasa, dos enzimas claves en el mecanismo de agregación plaquetaria (Ro et al., 2015).

Más allá de que los mecanismos de acción de la cebolla no hayan sido aún completa e íntegramente dilucidados, es importante tener en cuenta la cantidad de reportes en los que su acción antiplaquetaria ha sido comprobada *in vitro* (Bordia et al., 1978; Goldman et al., 1995; Briggs et al., 2000; Galmarini, Goldman, & Havey, 2001; Block, 2010) y también *in vivo* (Briggs et al., 2001, Yamada et al., 2004; Lee et al., 2013) en extractos acuosos de bulbos de cebolla (Sance et al., 2008; Galmarini et al., 2001), en extractos de piel de cebolla ricos en quercetina (Hubbard et al., 2003; Hubbard et al., 2006; Lee et al., 2013, Ro et al., 2015) y en extractos oleosos de cebolla (Srivastava, 1986).

El consumo de inhibidores de la agregación plaquetaria en forma natural a través de la dieta jugaría un rol significativo en la prevención de patologías cardiovasculares (Sance, 2010).

### **1.3.2. Actividad antioxidante**

La oxidación del ADN, las proteínas y los lípidos por especies reactivas del oxígeno (ROS) juegan un rol muy importante en el proceso de envejecimiento y en el desarrollo de varias enfermedades tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y neurodegenerativas (Borek, 1997; Richardson 1993). Un compuesto antioxidante es aquel capaz de contrarrestar los efectos dañinos de la oxidación en un tejido animal, más específicamente, son sustancias que protegen a las células del daño y las enfermedades derivadas de la acción de los radicales libres. Los compuestos antioxidantes interactúan y

neutralizan a los radicales libres y así evitan que produzcan daño (Block, 2010). Estudios recientes demostraron que dietas ricas en vegetales, en especial frutas y hortalizas proveen cantidades significativas de fitoquímicos antioxidantes tales como la vitamina C y E, el glutatión, compuestos fenólicos y pigmentos vegetales que ofrecen protección ante al daño celular (Dimitrios, 2006). La cebolla es en muchos países, una de las principales fuentes dietarias de flavonoides tanto en su forma aglicona como conjugada. El principal compuesto flavonoides de la cebolla es la quercetina, que se encuentra en forma conjugada como 3',4'-diglucósido (Sellappan y Akoh, 2002). La actividad antioxidante de la quercetina ha sido reportada en varios estudios, utilizando extractos acuosos del bulbo y de las catáfilas externas de la cebolla (Hubbard et al., 2003, Ly et al., 2005). Un estudio reciente (Lee et al., 2015) encontró correlaciones significativas entre el contenido de antocianos y quercetina en cebollas y su capacidad antioxidante y también encontró que los extractos metanólicos de las cebollas poseían la misma capacidad antioxidante que los extractos puros frescos, lo que indica que los compuestos responsables de la actividad antioxidante de la cebolla son hidrosolubles. Por otra parte, Benkeblia et al. (2005) midió y comparó la capacidad antioxidante de una variedad de ajo y distintas variedades de cebolla mediante cuatro metodologías diferentes encontrando que en todos los casos el ajo es más potente antioxidante que las cuatro variedades de cebolla, independientemente de la metodología empleada. La capacidad antioxidante del puerro, fue demostrada por Bernaert et al. (2012) en 30 variedades diferentes de puerro, Kameya (2014) reportó capacidad antioxidante en cebolla de verdeo y las propiedades antioxidantes del shallot también fueron reportadas previamente (Lu et al., 2011).

### **1.3.3. Efectos relacionados a las enfermedades cardiovasculares**

Existen muchos factores asociados a la arterioesclerosis y a las enfermedades cardiovasculares, entre las cuales está el contenido de colesterol y triglicéridos elevados en sangre, aumento de la actividad plaquetaria, aumento de la homocisteína en sangre, diabetes, hipertensión y obesidad (Corzo-Martinez et al., 2007). Estos factores de riesgo están controlados por causa incontrolables (herencia, género, edad) y por otras controlables relacionadas con el estilo de vida (la inactividad, el fumar, el estrés y la dieta). Por ello, se

ha propuesto la prevención y el tratamiento de enfermedades arterioescleróticas basados en la dieta y en un estilo de vida saludable.

Las enfermedades relacionadas a la arteriosclerosis están asociadas a altos niveles de lípidos en sangre. Existen varios estudios que reportan la acción del ajo en el metabolismo de los lípidos, pero hay pocos avances en ese campo en cebolla. Effendy (1997) demostró que existen en la cebolla compuestos con capacidad de disminuir los niveles de triglicéridos en sangre y de inhibir la biosíntesis de colesterol *in vitro*. Además Glasser (2002) encontró que la quercetina y la metiina reducen los niveles de colesterol en sangre y la severidad de la aterosclerosis.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la presión arterial elevada es uno de los principales factores de riesgo hacia el infarto y la enfermedad coronaria (Chen et al., 2009). Sanchez (2007) encontró que tanto la quercetina como su metabolito metilado isoharmnetina, presentes en cebolla pueden reducir la presión sanguínea.

También se han reportado los efectos antidiabéticos e hipoglucémicos de la cebolla y el ajo, específicamente la metiina y el S-allil-sulfóxido de cisteína ejercen su actividad antidiabética estimulando la producción de insulina y su secreción en el páncreas, interfiriendo con la absorción de la glucosa (Srinivasan, 2005). Además, se comprobó que la administración de fructanos como los fructooligosacáridos (FOS) presentes en cebolla en altas concentraciones, disminuyen la glucemia y el colesterol total, aumentando la absorción intestinal del calcio y el magnesio y a su vez aumentando la densidad ósea (Jaime et al., 2001).

#### **1.3.4. Otras propiedades y efectos benéficos**

En 1958, Weiberger y Pensky demostraron *in vitro* e *in vivo* que los extractos de tiosulfatos de ajo inhibían el crecimiento de células tumorales. A partir de este estudio, muchas investigaciones se llevaron a cabo para evidenciar los efectos anticancerígenos y antimutágenos de compuestos provenientes de especies de *Allium*. Se han estudiado principalmente la capacidad para inhibir el crecimiento tumoral y la proliferación celular. Estos estudios han demostrado que tanto el ajo como la cebolla son capaces de disminuir el riesgo de sarcoma y carcinoma en varios tejidos y órganos tales como estómago, colon,

esófago, próstata, vejiga, hígado, pulmones, mamas, piel y cerebro (Hu et al., 1999; Lau et al., 1990; Le Marchand et al., 2000; You et al., 1998).

Algunos compuestos azufrados presentes en aliáceas como los tiosulfatos y los ceпаenos han sido reportados como fuertes inhibidores de las enzimas responsables de iniciar el metabolismo eicosanoide que conlleva a una disminución de la agregación plaquetaria y a una constricción branquial. Debido a esto se ha propuesto que la cebolla tendría efectos antiasmáticos (Wagner et al. 1990). El mecanismo por el cual la cebolla posee efectos espasmolíticos y broncodilatorios fue reportado por Mandukhail et al., (2014) que estudió el efecto de extracto de piel de cebolla en conejos y cerdos y propuso que los efectos broncodilatorios y espasmolíticos que podrían ayudar a aliviar desordenes gastrointestinales y respiratorios tales como la diarrea y el asma.

También se ha reportado que la cebolla estimula el proceso digestivo acelerando la digestión y reduciendo el tiempo de tránsito de la comida en el tracto gastrointestinal (Platel and Srinivasan, 2001). Se ha propuesto además que tanto la cebolla como el ajo poseen efecto prebiótico debido a su alto contenido de fibra soluble, principalmente inulina y fructooligosacáridos, que estimulan el crecimiento de microorganismos benéficos en el colon tales como bifidobacterias y lactobacilos (Ernst and Feldheim, 2000; Benkeblia and Shiomi, 2006). Otra propiedad atribuida y comprobada en cebolla es su efecto en la prevención de la osteoporosis (Huang et al, 2008) reportó que dietas ricas en cebolla disminuyen la pérdida ósea en ratas y que el compuesto activo responsable de este efecto era el  $\gamma$ -L- glutamil-propenil-cisteín-sulfóxido. También, Matheson (2009) que mujeres de 50 o más años que consumían cebolla al menos una vez al día poseían una densidad ósea al menos un 5% mayor que aquellas que consumían cebolla una vez al mes o menos.

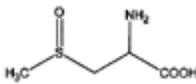
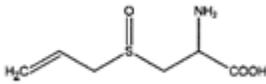
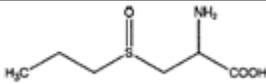
#### **1.4. Principales compuestos de interés nutracéutico presentes en aliáceas**

Los principales compuestos bioactivos de interés nutracéutico presentes en aliáceas son compuestos azufrados, fenólicos y los fructooligosacáridos (FOS) (Roldán-Marín et al, 2009).

##### **1.4.1. Compuestos azufrados**

La cebolla y otras hortalizas de género *Allium* son consumidas por su sabor característico y por su habilidad de realzar el sabor de otros alimentos. Los compuestos azufrados responsables del sabor y de algunas de las propiedades benéficas para la salud de la cebolla y otras aliáceas. Entre estos, los tiosulfatos (TSs) son los compuestos azufrados predominantes en alliums y se forman a partir del azufre que las plantas absorben como sulfato, el cual es usado para sintetizar los aminoácidos cisteína y glutatión, los cuales, a su vez, dan origen a los  $\gamma$ -glutamil péptidos. Hasta la fecha, se han aislado e identificado más de 24  $\gamma$ -glutamil péptidos diferentes en alliums (Rose et al., 2005). Estos péptidos sirven como reserva de azufre y nitrógeno y como sustrato para la formación de los S-alquencil-sulfóxidos de cisteína (ACSOs). Los ACSOs son aminoácidos no proteicos que no tienen olor ni sabor y, al ser hidrolizados por la enzima allinasa (EC 4.4.1.4), dan origen a TSs, piruvato y amonio (Cavallito & Bailey, 1944; Virtanen & Matikkala, 1959; Edwards et al., 1994).

Actualmente se han identificado 4 ACSOs mayores y 2 ACSOs menores en el género *Allium* y de estos 6 compuestos se pueden generar más de 50 compuestos azufrados (Figura 2). Debido a esto, la composición y la cantidad de cada ACSO determina la gran variedad de aromas, sabores y propiedades biológicas del género *Allium*, y debido a esta diversidad química, los miembros de este género han recibido atención por parte de químicos y biólogos como fuentes novedosas de compuestos bioactivos (Rose et al. 2005).

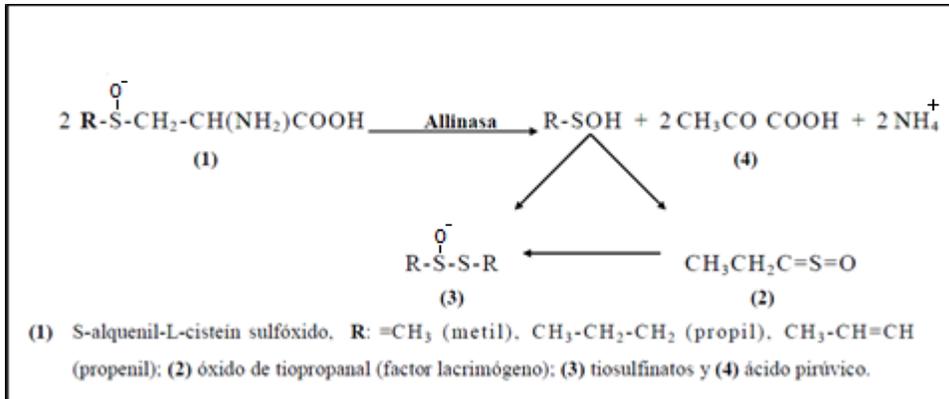
| Nombre común | Nombre químico                 | Estructura química   | Especies representativas  |
|--------------|--------------------------------|--|---|
| Metiina      | S-metil sulfóxido de cisteína  |   | <i>A. cepa</i> L.<br><i>A. sativum</i> L.<br><i>A. chinense</i> G. Don<br><i>A. longicuspis</i> Rgl.    |
| Aliina       | S-allil-sulfóxido de cisteína  |  | <i>A. sativum</i> L.<br><i>A. longicuspis</i> Rgl.<br><i>A. ampeloprasum</i> L.<br><i>A. ursinum</i> L. |
| Propiina     | S-propil sulfóxido de cisteína |  | <i>A. cepa</i> L.<br><i>A. porrum</i> L.<br><i>A. altaicum</i> Pall.<br><i>A. fistulosum</i> L.         |

|          |                               |  |   |
|----------|-------------------------------|--|---|
| Isoalina | S-allil-sulfóxido de cisteína |  | <i>A. cepa</i> L.<br><i>A. nutans</i> L.<br><i>A. ascalonicum</i> auct.<br><i>A. schoenoprasum</i> L.                 |
| Etiina   | S-etil-sulfóxido de cisteína  |  | <i>A. aflatunense</i> B. Fed.<br><i>A. ampreloprasum</i> L.<br><i>A. ochotense</i> Prokh.<br><i>A. victorialis</i> L. |
| Butiina  | S-butil-sulfóxido de cisteína |  | <i>A. siculum</i>   |

**Figura 2.** S-alk(en)yl-L-sulfóxidos de cisteína en diferentes especies del género *Allium*. Adaptada de Rose et al. (2005).

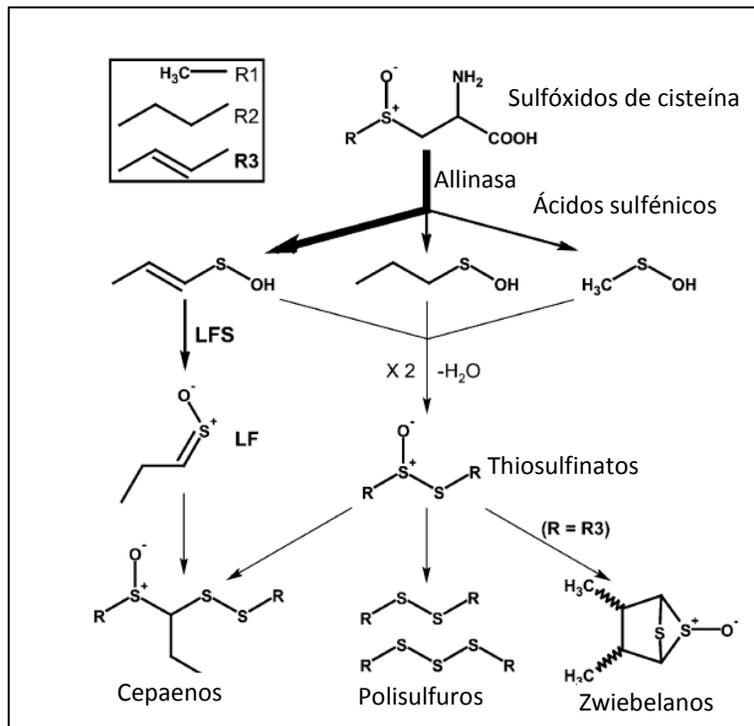
#### 1.4.1.1. Reacción generadora del flavor:

Los ACSOs se ubican físicamente en el citoplasma de las células del mesófilo, separados de la enzima allinasa, que se ubica en la vacuola (Lancaster & Collin, 1981). Cuando se produce ruptura del tejido, los ACSOs son hidrolizados por la enzima allinasa dando origen a ácido pirúvico, amonio y TSs compuestos responsables del flavor de las aliáceas (Lancaster & Boland, 1990) (Figura 3). Además los tiosulfatos participan en una cascada de reacciones y rearrreglos que dan origen a tiosulfonatos, sulfuros y una amplia gama de compuestos organoazufrados (Block et al., 1992). En ajo, el ACSO, 2-PECSO o alliina, da origen al tiosulfato allicina, que le otorga el flavor característico al ajo. En extractos añejos de ajo, las moléculas de allicina reaccionan entre sí formando sulfuros, tiosulfonatos y ajoeno (Randle & Lancaster, 2002). En aliáceas que contienen 1-PECSO (también llamado isoalliina) como la cebolla, se produce la formación de óxido de tiopropanal, o factor lacrimógeno, a partir de la reestructuración instantánea del ácido sulfénico 1-propenil.



**Figura 3.** Reacción generadora del flavor en *Allium*. Tomada de Sance, 2010.

La figura 4 presenta la variedad de compuestos azufrados que pueden formarse en cebolla, estos compuestos son responsables del sabor de la cebolla y de sus propiedades benéficas (Bystricka et al., 2013).



**Figura 4.** Los principales compuestos azufrados producidos en cebolla luego de la disrupción de tejido. LFS: enzima factor lacrimógeno sintasa; LF: factor lacrimógeno; R: radical; R1: radical metilo; R2: radical propilo; R3: radical propenilo; X2: dos moléculas de

ácidos sulfénicos reaccionan entre sí para formar una molécula de tiosulfinatos. (Tomada de Eady et al., 2008).

#### **1.4.1.2. Factores que afectan la intensidad del flavor:**

Tanto cebollas pungentes como suaves son requeridas o apreciadas según el uso. Así, para su uso en ensaladas o para condimentar, generalmente se prefieren variedades suaves. En cambio, para su uso en sopas, extractos y cebollas deshidratadas se requieren variedades pungentes y con alto contenido de sólidos (Platenius, 1941).

El flavor, es la combinación compleja de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales (Sance, 2008). Existen factores genéticos y ambientales incluido el manejo del cultivo entre los factores ambientales que afectan la cantidad y calidad del flavor. Es decir que la intensidad del sabor en las cebollas es influenciada por el acervo genético y el ambiente en el que se cultiva. Por otro lado, el sabor está determinado en gran medida por los compuestos azufrados en combinación con los azúcares de la cebolla. Por ejemplo, una variedad muy pungente puede deberse a que posea alto contenido de tiosulfinatos o bien que posea contenido medio de tiosulfinatos y pocos azúcares, ya que los azúcares pueden disminuir la sensación de pungencia, dependiendo de su naturaleza y la concentración relativa (Lancaster & Boland, 1990; Randle & Bussard, 1993).

##### **1.4.1.2.1. Factores genéticos:**

Diferentes especies de *Allium* difieren en la intensidad y calidad del flavor. Esto es debido a diferencias genéticas que determinan la absorción de azufre y a diferencias en el metabolismo del azufre una vez absorbido. Las diferencias en el metabolismo se deben a la eficiencia en la reducción del azufre inorgánico y a su posterior incorporación en compuestos organoazufrados, que servirán de sustrato para la formación de ACSOs. Se ha comprobado, de hecho que las cebollas más pungentes son más eficientes en reducir el sulfato absorbido e incorporarlo a la ruta metabólica del flavor (Ketter & Randle, 1998). Las variedades suaves, por su parte, acumulan el sulfato absorbido en las vacuolas de las células, evitando de esta forma su incorporación a la ruta metabólica del flavor (Ketter & Randle, 1998). También se ha estudiado que las diferencias en la acumulación de

compuestos organoazufrados y en la actividad de la enzima allinasa tienen efecto en los distintos niveles de flavor hallados (Randle & Lancaster, 2002).

#### **1.4.1.2.2. Factores ambientales:**

Se ha estudiado y comprobado que el almacenamiento en post cosecha puede modificar el sabor del ajo y la cebolla (Kopsell, 1997). Los cambios dependen de la temperatura y la duración del almacenamiento, del cultivar y del grado de dormición del bulbo (Randle & Lancaster, 2002; Kopsell, 1997). Respecto de la temperatura de almacenamiento, se asume que los patrones de cambio del flavor en aliáceas es complejo y en general depende fuertemente del genotipo estudiado (Kopsell, 1997).

Respecto del manejo (Randle, 1992; Randle & Bussard, 1993) encontraron que las fertilizaciones azufradas podían modificar el sabor de las cebollas, aunque esta influencia era proporcionalmente menor a la influencia de la determinación genética. Así concluyó que la pungencia puede ser minimizada cultivando variedades con potencial genético para ser suaves en suelos pobres en azufre y regadas con aguas de similares características (Randle, 1992 a). También se ha estudiado la influencia de la temperatura, las fertilizaciones nitrogenadas y el riego en el sabor de las cebollas (Platenius, 1941; Freeman & Mossadeghi, 1970; Gamiely et al., 1991).

La calidad y disponibilidad de agua afecta el flavor de las cebollas. Cebollas que se cultivan en condiciones de restricción hídrica son más pungentes que aquellas cultivadas en condiciones de irrigación adecuada (Freeman & Mossadeghi, 1973). Esto se ha explicado como un efecto de concentración o dilución de los compuestos azufrados y los azúcares bajo cada condición (Darbyshire & Henry, 1979). El mecanismo exacto por el cual el flavor aumenta en cebollas estresadas hídricamente no ha sido dilucidado aún.

#### **1.4.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante el desarrollo normal de la misma y en respuesta a algún tipo de estrés, como pueden ser heridas, infecciones, radiación ultravioleta y/o exposición a temperaturas extremas (Grassmann et al., 2002). En los alimentos, los compuestos fenólicos pueden contribuir a su

amargura, astringencia, flavor, aromas y colores. La distribución de los compuestos fenólicos en plantas no es uniforme, de hecho los fenoles insolubles se ubican en las paredes celulares y los fenoles solubles se encuentran en las vacuolas. Además, la distribución dentro de los órganos vegetales tampoco es uniforme ya que en general, el exterior de frutos u órganos contiene generalmente más polifenoles que su interior (Naczki y Shahidi, 2006).

El contenido de polifenoles en alimentos depende también de las técnicas de cultivo, de la variedad, de las condiciones de crecimiento, del proceso de maduración y del posterior procesamiento y almacenamiento a los que son sometidos los vegetales (Price et al., 1997).

Dentro de los polifenoles, los flavonoides han sido muy estudiados debido a que están ampliamente representados en el reino vegetal y es posible encontrarlos en prácticamente todas las partes de las plantas (Yao et al., 2004). Además, se consideran un componente fundamental de la dieta de animales y humanos (Clifford y Scalbert, 2000). Se han identificado más de 8000 compuestos cuya distribución varía entre diferentes vegetales y aún dentro de diferentes órganos dentro de la misma planta (Sultana y Anwar, 2008). Los flavonoides se clasifican en al menos 10 grupos químicos diferentes, entre los cuales los más abundantes en la dieta son las flavanonas, flavonas, isoflavonoides, flavanoles, antocianos y flavonoles (Sultana y Anwar, 2008).

Se han comprobado las propiedades antioxidantes y la capacidad de neutralización de los radicales libres de los flavonoides (Yan-Hwa et al., 2000; Fukumoto & Mazza, 2000; Hung et al., 2004). También se ha comprobado su papel en la prevención de enfermedades coronarias y diversos tipos de cáncer (Block et al., 1992; Middleton et al., 2000). Los flavonoides presentes en nuestra dieta se consideran antioxidantes más poderosos que las vitaminas C y E (Sokół-Letowska et al., 2007).

La cebolla es la principal fuente de flavonoides en la dieta tales como la quercetina, isoharmnetina, miricetina, kaempferol y sus conjugados. Dentro de estos, la quercetina y sus conjugados son los predominantes. Estos flavonoles están ubicados principalmente en las catáfilas externas de la cebolla (Naczki & Shahidi, 2006). El shallot contiene entre dos a

diez veces mayor concentración de quercetina que la cebolla, dependiendo de los materiales analizados (Fattorusso et al. 2002).

En algunas variedades de ajo, de shallotes y en cebollas rojas, es posible hallar además de flavonoles, antocianinas, que se localizan principalmente en las catáfilas externas de protección (secas) y en las de reserva más externas, es decir, dentro de la parte comestible. Las antocianinas predominantes son los derivados mono y diglucosilados de cianidinas, los cuales representan más del 50% del total de antocianinas. Respecto del patrón de flavonoles en cebolla rojas, los predominantes son los 3' y 4' glucósidos de quercetina (Slimestad et al., 2007).

### **1.4.3. Carbohidratos**

La materia seca de la cebolla y el ajo es un importante parámetro de calidad ya que está relacionada con el sabor, la textura y la vida poscosecha (Suzuki y Cutcliffe, 1989; Sinclair et al., 1995). También tiene una importancia económica para la industria del deshidratado debido a que se relaciona directamente con la energía necesaria para deshidratar los bulbos frescos (Luh et al., 1975). La materia seca de la cebolla madura puede representar entre el 5 y el 26%, dependiendo de la variedad (Sinclair et al., 1995). Entre el 65-80% de esta materia seca está compuesta por carbohidratos no estructurales (Darbyshire y Henry, 1979). Cebollas con alto contenido de materia seca tienen una vida poscosecha más prolongada y son utilizadas para la industria del deshidratado (Lin et al., 1995). Los principales carbohidratos no estructurales de la cebolla son glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos de bajo peso molecular. En general se considera que el bulbo de cebolla no posee almidón (Darbyshire y Henry, 1981). La concentración de carbohidratos totales en hojas, pseudotallos y bulbos aumenta con la edad de la planta y con la intensidad lumínica (Darbyshire y Henry, 1978). La materia seca del ajo puede variar del 30 al 42% dependiendo de la variedad y posee en comparación con la cebolla y el puerro entre un 10 y un 20% mayor contenido de materia seca (Cavaganaro, 2012).

Los principales carbohidratos de reserva en cebolla son los fructanos, también conocidos como fructooligosacáridos. Estos son oligosacáridos lineales formados por moléculas de fructosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$  de peso molecular y grado de polimerización variable.

Los fructanos son sintetizados durante la etapa de bulbificación y son catabolizados en la etapa de brotación del bulbo (Benkeblia et al., 2005).

Sólo un 15% de las plantas almacenan fructanos, entre las que se encuentran cereales, frutas y vegetales. En plantas los fructanos, además de actuar como carbohidratos de reserva actúan, a diferencia del almidón, como osmoreguladores (Jaime et al., 2001). Los fructanos presentes en cebolla poseen un grado de polimerización bajo, en general entre 3 y 15 y pueden actuar como osmoreguladores, siendo los fructanos de bajo grado de polimerización moléculas de mayor potencial osmótico que los fructanos de alto grado de polimerización. Esto influye en la absorción de agua por parte de la planta (Sinclair et al., 1995). Esto indica que los cultivares de cebolla con alto contenido de materia seca absorben menos cantidad de agua –limitando la hidrólisis de fructanos- y esto estaría regulado genéticamente (Galmarini et al., 2001). La cebolla es la segunda fuente de fructanos después del trigo en la dieta americana (Moshfegh et al., 1999). Además, estudios previos han propuesto que los fructanos serían útiles a la planta ante situaciones de estrés por frío y por sequía (Puebla et al., 1997).

### **1.5 Relación entre actividad antiplaquetaria, sabor (pungencia), contenido de compuestos organoazufrados y sólidos**

En cebolla cruda se han reportado correlaciones significativas positivas entre el contenido de piruvato y la sensación de pungencia (Schwimmer y Guadagni 1962; Wall y Corgan 1992). La alta correlación encontrada entre las dos variables, sumado al -relativamente-bajo costo y simplicidad del análisis de piruvato ha llevado al uso generalizado de esta técnica como indicador del grado de pungencia en cebolla. Además, la concentración de piruvato refleja el contenido total de los compuestos organoazufrados en cebolla (Goldman et al., 1996) y se correlaciona significativamente con el contenido de sólidos solubles (SS) (Bedford 1984; Randle 1992; Simon 1995). Mas recientemente, se han encontrado correlaciones significativas positivas fenotípicas (Debaene et al. 1999, Galmarini et al. 2001b, Goldman et al. 1996) y genéticas (Galmarini et al. 2001b) entre actividad antiplaquetaria, contenido de piruvato y sólidos solubles. Se han mapeado QTL (Quantitative Trait Loci) en una región cromosómica en cebolla que es significativa tanto para el contenido de sólidos, piruvato y actividad antiplaquetaria (Galmarini, 2001b).

Debido a estos resultados, es ampliamente aceptado que cebollas pungentes poseen mayor contenido de piruvato y SS, y mayor poder antiplaquetario. En ajo, Cavagnaro (2007) encontró correlaciones fenotípicas positivas y significativas entre actividad antiplaquetaria, piruvato y tres tiosulfinatos (alicina, 1propenil tiosulfinato y metil tiosulfinato) y encontró QTL (loci de caracteres cuantitativos) para piruvato y tiosulfinatos en las mismas regiones cromosómicas.

La relación entre estas variables no ha sido investigada en otras especies de *Allium*, diferentes del ajo y la cebolla.

## **1.6. Formulación del problema, planteo de hipótesis y objetivos**

La cebolla es la principal hortaliza exportada en nuestro país y a nivel mundial tiene importancia al ser consumida en todas las partes del mundo principalmente debido a su sabor y a sus propiedades benéficas. Además de la cebolla, otras aliáceas como el ajo, el shallot, la cebolla de verdeo, el puerro y el ciboulette también son ampliamente consumidos en el mundo entero.

A pesar de su importancia económica y funcional, estas especies han sido poco estudiadas genética y molecularmente, principalmente debido a sus genomas enormes y, en el caso de la cebolla, a su ciclo bianual, lo que causa que los planes de mejoramiento y el desarrollo de poblaciones genéticamente estructuradas lleve mucho tiempo. Debido a esto, en la actualidad existen pocos reportes acerca de la herencia de caracteres de interés nutricional y funcional en cebolla, además de que se han desarrollado pocas herramientas moleculares como marcadores, que permitan encarar estudios moleculares en cebolla y en otras aliáceas.

### **Objetivos generales:**

1. Estudiar la herencia de caracteres nutraceuticos y caracteres relacionados al sabor en cebolla.
2. Desarrollar herramientas moleculares para la Familia *Alliaceae*.
3. Caracterizar a las principales especies comestibles del género *Allium* por sus propiedades benéficas y su contenido de compuestos bioactivos.

### **Objetivos específicos:**

1. Estimar la heredabilidad en sentido amplio, el nivel de variabilidad, las principales acciones génicas y el tipo de distribución de compuestos fenólicos, azufrados, carbohidratos, sólidos y actividad antiplaquetaria en poblaciones segregantes de cebolla.
2. Desarrollar y evaluar marcadores microsatélites en base a las secuencias públicamente disponibles en las bases de datos (NCBI) útiles para cebolla, ajo y otras aliáceas.
3. Caracterizar a la cebolla, el ajo, la cebolla de verdeo, el puerro, el ciboulette y el shallot por sus propiedades antioxidantes y antiplaquetarias y por el contenido de compuestos bioactivos organoazufrados y fenólicos.

4. Correlacionar las propiedades funcionales de cada especie de aliáceas con su perfil bioquímico.
5. Comparar dos metodologías de determinación de piruvato, un indicador de la pungencia y del contenido de compuestos azufrados, para minimizar errores.

### **Hipótesis:**

Hipótesis 1: Los compuestos fenólicos, azufrados, carbohidratos, sólidos y la actividad antiplaquetaria en cebolla son caracteres heredables, de distribución normal, de alta variabilidad y de acciones génicas explicadas por un modelo simple de aditividad-dominancia.

Hipótesis 2: Es posible desarrollar marcadores microsatélites a partir de las secuencias disponibles públicamente.

Hipótesis 3: Existen diferencias y variabilidad interespecífica para el contenido de compuesto bioactivos y para las capacidades antioxidantes y antiplaquetarias en las principales aliáceas comestibles (cebolla, ajo, shallot, ciboulette, puerro y cebolla de verdeo).

Hipótesis 4: Existen correlaciones fenóticas estadísticamente significativas entre los compuestos azufrados y fenólicos y las propiedades benéficas antioxidantes y antiplaquetarias en las distintas especies del género *Allium*.

Hipótesis 5: Existen diferencias entre las dos metodologías de medición de piruvato respecto de la sensibilidad, exactitud, precisión, linealidad y el porcentaje de interferencia en las determinaciones.

## **CAPÍTULO 2**

**Análisis genético de caracteres de interés agronómico y funcional en cebolla  
heredabilidad ( $H^2$ ), número de genes involucrados y relaciones entre caracteres.**

## 2.1 Introducción

La heredabilidad de un carácter cuantitativo en una población es el parámetro genético de mayor importancia, ya que determina la estrategia a ser usada en el mejoramiento de ese carácter. Para la mayoría de los caracteres una parte de la variación observada tiene una base genética y otra es el resultado de factores ambientales. Si la mayor parte de la variación es de origen genético, esperamos que las diferencias en producción sean mayormente debidas a los genes que los individuos poseen y entonces serán transmitidos en su mayor parte a la progenie.

Por otro lado, el número de genes también tiene implicancias directas sobre el mejoramiento y la estrategia a seguir; si se tiene un gen que controla el carácter, es más fácil seleccionar para un fenotipo determinado que si se tienen muchos poligenes de poco valor explicativo cada uno distribuidos en varios cromosomas.

Es importante conocer la heredabilidad, el número de genes y las acciones génicas de caracteres de interés agronómico (como peso de bulbo), funcional (compuestos azufrados, carbohidratos y fenólicos) y caracteres relacionados al sabor (piruvato y tiosulfatos) y la actividad antiplaquetaria para planificar las estrategias a seguir en el mejoramiento de la cebolla respecto de estos caracteres.

La herencia para contenido de sólidos solubles, sólidos totales, piruvato y AAIV ha sido estudiada por varios investigadores (Lin et al. 1995; Simon, 1995; Galmarini et al., 2001; Havey et al., 2004; McCallum et al., 2007 ), utilizando variedades o poblaciones de cebolla y diseños experimentales variados, encontrando en todos los casos que estos caracteres tienen una herencia poligénica. Hasta la fecha no se han realizado estudios genéticos de este tipo en materiales de cebolla nacionales, bajo condiciones de cultivo local.

El estudio de las correlaciones entre caracteres también es importante para determinar la estrategia en el mejoramiento de los caracteres, ya que si dos caracteres están correlacionados, posiblemente estén ligados los genes responsables de los distintos caracteres, o están asociados por pleiotropía. Sea cual fuere el caso, al seleccionar para uno, también se está seleccionando para el otro. También tiene implicancias en aspectos prácticos/metodológicos para los programas de mejoramiento. Por ejemplo, si dos variables están fuertemente correlacionadas y una es muy fácil y rápida de medir, aunque no sea la

variable directa de interés, se puede usar esa variable para seleccionar indirectamente la otra. En cebolla se han reportado correlaciones fenotípicas y genéticas entre el contenido de SS y ST con el contenido de piruvato y la actividad antiplaquetaria (Bedford, 1984; Sinclair, Blakeney, & Barlow, 1995; Galmarini et al., 2001), Por otro lado, se reportaron correlaciones significativas inversas entre contenido de sólidos y peso de bulbo (McCollum, 1968) y entre el peso de bulbo con pungencia y SS (Mallor 2011).

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar para los caracteres mencionados anteriormente la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ), el tipo de herencia (i.e., bajo el control un gen, de pocos genes “mayores”, o poligénica), el número mínimo de genes implicados en su control, detectar posibles acciones génicas, e identificar individuos transgresivos para los distintos caracteres en las poblaciones segregantes. Además, investigar y cuantificar correlaciones fenotípicas entre los caracteres.

## **2.2. Materiales y métodos**

Veintidos poblaciones  $F_2$  de cebolla (Tabla 2) provenientes de cruzamientos de variedades disímiles para los caracteres en estudio fueron evaluadas. Las 5 variedades parentales (Tabla 1) fueron desarrolladas por el INTA E.E.A. La Consulta (Galmarini 2000). Las poblaciones  $F_2$  junto con las variedades parentales se cultivaron en la estación experimental de INTA La Consulta, (Mendoza; 33°44'S, 69°07'W) utilizando prácticas agronómicas tradicionales durante la temporada 2010-2011. El cultivo fue implantado en el año 2010 durante la primera quincena de setiembre por trasplante. El total de plantas por parcela fue 300 aproximadamente, colocadas a doble cara y con una distancia de plantación de 10 cm entre plantas. Las cebollas fueron cultivadas sobre suelo franco. El régimen de riego fue cada 8 días y la modalidad por gravedad. No se realizó fertilización. Las cebollas fueron cultivadas hasta madurez. Cada población se consideró madura cuando el 50 % de las hojas estaban senescentes (madurez comercial). Luego de cosechados los bulbos  $F_2$  fueron almacenados durante 30 días en galpón, con temperaturas de 15 a 25°C y 25 a 55% de humedad relativa, hasta el momento de su procesamiento y posterior análisis.

En las 22 poblaciones se midió el peso de bulbo. En 15 poblaciones se midieron las siguientes variables: contenido de sólidos solubles (SS), sólidos totales (ST) y piruvato. En

una población seleccionada (población “2143”) se determinaron, además de las variables anteriores, el contenido de tiosulfatos (TSs), polifenoles totales (PTs) y la actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV) (Aclaración: el número de poblaciones a analizar fue disminuyendo a medida que se avanzaba con los análisis basándose principalmente en el nivel de variabilidad, escogiendo a las poblaciones más variables para diferentes caracteres, de modo que aquellas poblaciones con poca variación o que variaban sólo para un carácter, no se seguían analizando).

**Tabla 1** Características de los cultivares parentales usados para generar las poblaciones F<sub>2</sub>.

| Cultivar        | Especie                            | Origen                                       | Color*   | Requerimientos Fotoperiódicos ** |
|-----------------|------------------------------------|--|----------|----------------------------------|
| Refinta 20      | <i>A. cepa</i> var. <i>typicum</i> | USA poblaciones tipo “Southport White Globe” | Blanco   | Día largo                        |
| Navideña INTA   | <i>A. cepa</i> var. <i>typicum</i> | España variedades tipo “Torrentina”          | Amarillo | Día intermedio                   |
| Cobriza INTA    | <i>A. cepa</i> var. <i>typicum</i> | España variedades tipo “Valenciana”          | Amarillo | Día largo                        |
| Valcatorce INTA | <i>A. cepa</i> var. <i>typicum</i> | España variedades tipo “Valenciana”          | Amarillo | Día largo                        |
| Angaco INTA     | <i>A. cepa</i> var. <i>typicum</i> | España variedades tipo “Valencianita”        | Amarillo | Día corto                        |

\*Se refiere al color de las catáfilas externas e internas. \*\*Clasificación basada en los requerimientos fotoperiódicos para bulbificar (día largo: 14 horas; día intermedio: 13 horas; día corto: 12 horas).

**Tabla 2.** Pedigree y características (número y tamaño) de las poblaciones F<sub>2</sub> evaluadas.

| Cruzamiento                         | Nº de poblaciones F <sub>2</sub> * | N    |
|-------------------------------------|------------------------------------|------|
| Angaco INTA x Valcatorce INTA       | 1                                  | 200  |
| Navideña INTA x Angaco INTA         | 1                                  | 160  |
| Refinta 20 x Navideña INTA          | 10                                 | 1895 |
| Antártica INTA x Refinta 20         | 1                                  | 51   |
| Refinta 20(↑ ss) x Refinta 20 (↓ss) | 1                                  | 82   |
| Cobriza INTA x Navideña INTA        | 5                                  | 996  |
| Refinta 20 x Angaco INTA            | 3                                  | 262  |

\* Número de poblaciones derivadas del mismo cruzamiento. N = número de individuos F<sub>2</sub> de cada población. ↑ ss = individuos pertenecientes al cultivar Refinta 20 seleccionados con alto contenido de sólidos solubles. ↓ss = individuos pertenecientes al cultivar Refinta 20 seleccionados con bajo contenido de sólidos solubles.

### 2.2.1. Acondicionamiento de las muestras

La preparación de los extractos acuosos a partir de bulbos de cebolla se realizó según Galmarini et al. (2001). Los bulbos se pesaron, se pelaron y se cortaron longitudinalmente en mitades. Una mitad de cada bulbo se procesó con agua destilada en una relación 1:1 (peso: volumen) utilizando un procesador Braun MR 400 Plus. Los homogenatos se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa hidrólisis de los precursores (ACSOs). Luego se filtraron (filtro con poro 1mm<sup>2</sup>) y centrifugaron (centrífuga refrigerada marca Beckman Coulter modelo Allegra 21R). Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -20°C.

### 2.2.2. Determinación de sólidos solubles (SS) y totales (ST)

La otra mitad de cada bulbo se utilizó para el análisis de SS, mediante refractometría (Mann & Hoyle, 1945) y ST, mediante pesado del tejido fresco y pesado luego de su deshidratado a 60°C de acuerdo a Cavagnaro (2007). Los valores se expresaron como grados Brix para SS (lectura directa en refractómetro), y porcentaje de materia seca (%) para ST calculado como: peso seco x 100/ peso fresco.

### 2.2.3. Determinación de piruvato

El día del análisis, los extractos acuosos se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron y se diluyeron 80x (80 veces, es decir se diluyen 50 µL de extracto acuoso

puro en 4000  $\mu\text{L}$  de agua destilada). Para determinar el contenido de piruvato se siguió la metodología de Schwimmer y Weston (1961). Brevemente, a 2 mL del extracto acuoso diluido se le adicionó 1 mL de una solución de 2,4-dinitro-fenil-hidracina (DNPH) (Sigma ultra 99%) al 0,0125% en 2N HCl. Se realizaron tres repeticiones analíticas por muestra (por cada individuo  $F_2$ ). Las muestras se incubaron a 37°C por 10 minutos. Luego, se les agregaron 5 mL de NaOH 0,6N. La absorbancia se midió a 420 nm en un espectrofotómetro Beckman DU Series 500 UV/Visible. Se construyeron curvas de calibración utilizando soluciones estándar de piruvato de sodio (Sigma ultra 99%) de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,2 y 0,25 mM. El contenido de piruvato se calculó por interpolación en la curva estándar y se expresó como mmol % g de peso fresco (pf), considerando las diluciones del extracto y la ecuación de la recta de regresión.

#### **2.2.4. Determinación de tiosulfatos (TSs)**

Para la determinación de TSs los extractos acuosos se usaron tal como fueron extraídos (sin dilución adicional). El contenido de TSs se determinó siguiendo la técnica de Han et al. (1995). Brevemente, a 1125  $\mu\text{L}$  de cada extracto de *Allium* se le adicionaron 1875  $\mu\text{L}$  de cisteína 0,8 mM. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, 900  $\mu\text{L}$  de la mezcla - muestra + cisteína- se le agregaron 6,6 mL de DTNB (ácido 5,5'-Ditiobis 2-nitrobenzoico) 200  $\mu\text{M}$ . Como referencia, se reemplazó el extracto de *Allium* por agua destilada y se realizó la metodología de manera similar a lo descrito previamente para las muestras. Se midió la absorbancia a 412 nm. Se realizaron tres repeticiones analíticas por muestra (por cada individuo  $F_2$ ). El contenido de tiosulfatos se calculó utilizando la fórmula:

Concentración de tiosulfatos (mmol/ml) =  $(A_o - A) / 2 \times 14150$ , donde 14150 es el coeficiente de extinción molar del DTNB,  $A_o$  es la absorbancia del tubo utilizado como referencia (sin el agregado de extracto de cebolla) y  $A$  es la absorbancia de las muestras de cebolla. El contenido de TSs se expresó en mmol TS % g peso fresco (pf).

#### **2.2.5. Determinación de polifenoles totales (PTs)**

Para la determinación de PTs los extractos acuosos se usaron tal como fueron extraídos (sin dilución adicional). La cuantificación siguió la técnica de Singleton y Rossi (1965).

Brevemente, a 80  $\mu\text{L}$  del extracto de cebolla se le agregan 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu, 1 mL de  $\text{NaCO}_3$  y 3,6 mL de agua destilada, en ese orden. Luego de homogeneizar, se incubó una hora a  $37^\circ\text{C}$  para permitir el desarrollo del color y finalmente se midió la intensidad de color azul en un espectrofotómetro Beckman DU Series 500 UV/Visible a 765 nm. Se realizaron tres repeticiones analíticas por muestra (por cada individuo  $F_2$ ). Se calculó la concentración de PTs por interpolación con una curva estándar construida con ácido gálico de 0, 50, 100, 150, 250, 300, 500, 650, 750, 1000, 1250 y 1500 mg/L. El contenido de PTs se expresó como mg de ácido gálico / Kg pf.

### **2.2.6. Determinación de actividad antiplaquetaria *in vitro* (IVAA)**

Para la determinación de IVAA los extractos acuosos se utilizaron tal cual fueron obtenidos (sin diluciones adicionales). La determinación se realizó en sangre entera (Cardinal y Flower, 1980) de acuerdo a González et al. (2009) utilizando un agregómetro de impedancia eléctrica (Chrono-log Corp, Havertown, Penn). Se extrajo sangre de 2 donantes sanos que 72 hs previas al análisis no habían consumido aliáceas, café, cerveza negra, jengibre, chocolate, vino, jugo de uvas, bebidas energizantes, té otro producto de conocida acción antiagregante. El consumo de ácido acetilsalicílico se restringió 14 días antes del estudio debido a su fuerte efecto antiagregante de plaquetas. La sangre fue extraída por venopunción en el Servicio de Hematología del Hospital Central de acuerdo a protocolos del hospital. La sangre fue anticoagulada con citrato de sodio al 3,8% en una relación 1:9 v/v, (citrato/sangre) y posteriormente diluida 1:1 (v/v) con TRIS buffer salino (TBS), pH 7,4. Para todos los ensayos, 1 mL de sangre/TBS fue transferida a una cubeta de agregometría conteniendo un barra magnética, para producir la agitación. Las cubetas se colocaron en el agregómetro en la posición de incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se agregó el extracto acuoso de cebolla en una dosis de 150 o 200  $\mu\text{L}$  (para donante 1 y donante 2, respectivamente). Posteriormente, se insertaron los electrodos en la mezcla y la agregación fue inducida por la adición de 2,5 mL de colágeno (Chrono-Log, Corp). Los cambios en la impedancia eléctrica fueron obtenidos luego de 6 minutos, estos cambios fueron proporcionales a la agregación plaquetaria (el equipo arroja directamente valores de agregación plaquetaria). La AAIV se expresó como porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria respecto a valores de agregación en controles

negativos sin el agregado del extracto de cebolla. Cada muestra se midió 3 veces. La dosis de extracto de cebolla agregada se definió en base a las curvas dosis-respuesta realizadas de acuerdo a Sance et al (2008) y Gonzalez et al (2009), en este caso las dosis ensayadas fueron 50, 75, 100, 150 y 200  $\mu\text{L}$  de extracto de cebolla. Se seleccionó para cada donante la dosis que, interpolando en la recta, produjera una agregación del 50%.

Para cuantificar la respuesta en la agregación se calculó la dosis necesaria para inhibir el 50% de la agregación ( $\text{IC}_{50}$ ). La  $\text{IC}_{50}$  se expresó en mg de peso fresco/mL de sangre entera (la  $\text{IC}_{50}$  se obtiene originalmente en  $\mu\text{L}$  de extracto y posteriormente se pasa a mg de peso fresco considerando el volumen de extracto y la dilución 1:2 que se realizó al obtener el extracto).

#### **2.2.7. Determinación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

La detección y cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y fructooligosacáridos (kestosa, nistosa y fructofuranosilnistosa) se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La cromatografía se llevó a cabo con un equipo marca TSP (Thermo Separation Products, Inc., USA) que incluye: bomba cuaternaria (P4000), unidad desgasificadora de solventes (SCM 1000), auto-muestreador (AS 3000) con válvula de inyección de 100  $\mu\text{L}$  y un detector evaporativo de masas ELSD 500 (Alltech, Deerfield, IL). Las condiciones del detector aplicadas en el ensayo fueron: temperatura del drift tube: 85°C; flujo del gas carrier (gas flow): 2,2 y presión del gas: 16,2 psi. La columna analítica utilizada fue una Prevail Carbohydrate ES (polimérica, fase amino) de 250 x 4,6 mm con partículas de 5  $\mu\text{m}$  (Alltech) y una pre-columna del mismo material (Alltech). La columna se mantuvo termostaticada a 25°C y se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  de jugo previamente filtrado por membrana de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, así como de estándares comerciales. Para la corrida cromatográfica de 30 min se empleó una fase móvil consistente en un gradiente lineal de una mezcla de 2 solventes: A: Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker, USA) y B: Agua grado HPLC (J.T.Baker) seguida de una corrida de diez min para re-equilibrar la columna con las condiciones iniciales previo a la inyección de la siguiente muestra. Con el mismo sistema cromatográfico se realizaron curvas de calibración para ocho niveles de concentración de todos los analitos estudiados para realizar la cuantificación. Los solventes

utilizados fueron todos calidad HPLC marca Baker (J.T. Baker, USA). El flujo de corrida se mantuvo en 1 mL/min. Se realizaron curvas de calibración para ocho niveles de concentración de todos los analitos estudiados para realizar la cuantificación. La determinación de los oligosacáridos individuales y fructooligosacáridos se realizó según lo reportado por Insani (2010).

### **2.2.8. Análisis estadísticos**

Los análisis de la varianza, los análisis de comprobación de normalidad (mediante la prueba de Shapiro-Wilks) y las correlaciones se ejecutaron utilizando el software InfoStat versión 2014 software para Windows 4.0 (Di Rienzo et al., 2013). Las comparaciones de medias se realizaron según Fisher. Valores  $p < 0.05$  fueron considerados significativos. La desviación estándar se calculó como el cuadrado de la varianza. El coeficiente de variación se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media y luego este cociente se multiplicó por 100. La heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) se calculó usando datos transformados (Log o raíz) para lograr normalidad-, mediante la siguiente formula:  $H^2 = Vg/Vf$ , donde  $Vg$  es la varianza genética calculada como la varianza fenotípica de la  $F_2$  – la varianza ambiental calculada en base a la varianza de las poblaciones parentales,  $Vf$  =varianza de la  $F_2$ -varianza padres, de acuerdo a Mahmud y Kramer (1951).

Se realizó análisis de correlación simple entre los caracteres evaluados mediante el coeficiente de Pearson. Las segregaciones en las  $F_2$  se consideraron transgresivas cuando al menos un individuo presentaba valores menores o mayores en dos desviaciones estándar respecto de los valores menores o mayores de los parentales (Barchi et al. 2012).

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Peso de bulbo**

Se graficó la distribución de frecuencias en las  $F_2$  y se evaluó el tipo de segregación en las progenies de cada cruzamiento (Tabla 2 y Figuras 5 a 11). Las variedades parentales tuvieron en promedio los siguientes pesos de bulbos: Refinta 20 = 61,2 g, Antártica INTA = 89,8 g, Angaco INTA = 101,5 g, Cobriza INTA = 102,2 g, Valcatorce INTA = 112 g, y Navideña INTA = 129,3 g. En general, las distribuciones presentaron una asimetría

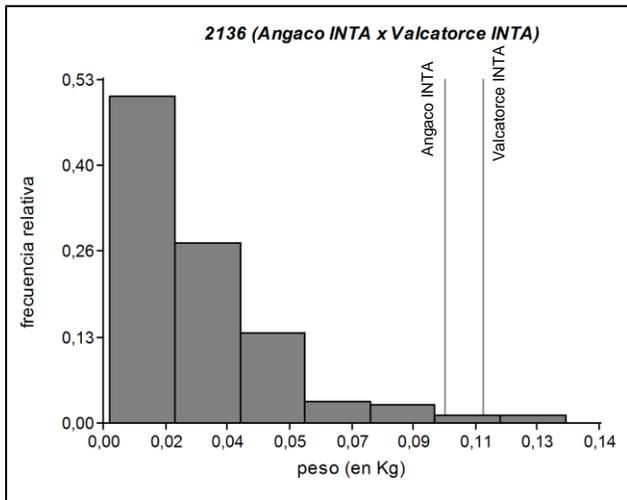
positiva, siendo los valores de peso menores los más frecuentes. Respecto de los valores paternos de peso, las poblaciones  $F_2$  mostraron valores medios menores a los valores medios de las variedades parentales en todos los cruzamientos evaluados. El análisis de la varianza arrojó diferencias significativas entre los distintos cruzamientos. El valor medio de peso de todas las poblaciones  $F_2$  provenientes del cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA resultó significativamente mayor que el del resto de las poblaciones y el valor medio del cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA resultó menor, pero no se diferenció significativamente de los cruzamientos Refinta 20 x Refinta 20 y el cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (Tabla 4). Por otro lado, se detectaron individuos transgresivos para este carácter en todas las poblaciones estudiadas.

$H^2$  para peso de bulbo varió entre 33,1 y 84% (Tabla 3), con  $H^2$  promedio para las 22 poblaciones del 69,3%, indicando que el peso de bulbo en cebolla está determinado en gran medida por factores genéticos (la acción conjunta de cada uno de los genes que contribuyen a este carácter).

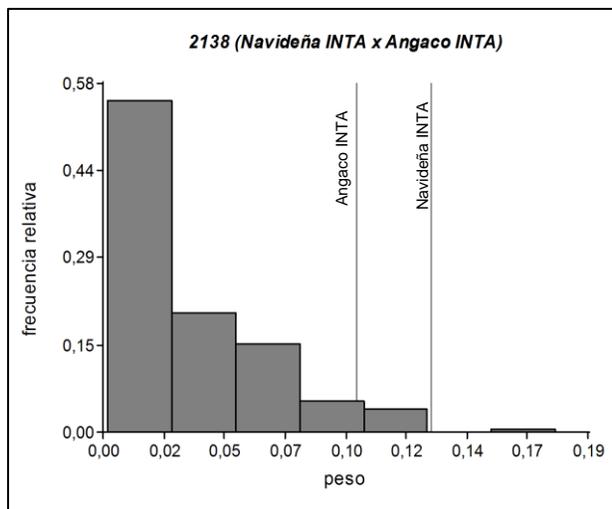
**Tabla 3.** Valores medios, heredabilidad, asimetría y presencia de segregación transgresiva de los caracteres peso, sólidos y piruvato en cada población F<sub>2</sub>.

| Cruzamiento                       | Código | N   | Peso           | H <sup>2</sup> <sub>peso</sub> | Segr <sup>s</sup> <sub>peso</sub> | Asimetría | SS           | H <sup>2</sup> <sub>SS</sub> | Segr <sup>s</sup> <sub>SS</sub> | Asimetría | ST           | H <sup>2</sup> <sub>ST</sub> | Segr <sup>s</sup> <sub>T</sub> | Asimetría | PV          | H <sup>2</sup> <sub>PV</sub> | Segr <sup>s</sup> <sub>PV</sub> | Asimetría |
|-----------------------------------|--------|-----|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------|------------------------------|---------------------------------|-----------|--------------|------------------------------|--------------------------------|-----------|-------------|------------------------------|---------------------------------|-----------|
| Angaco INTA                       | x 2136 | 200 | 28,45 ± 23,90  | 0,33                           | +                                 | 1,81      | 6,86 ± 1,71  | 0,90                         | +                               | 0,45      | 6,87 ± 2,95  | 0,79                         | +                              | 1,53      | 1,41 ± 0,79 | 0,69                         | +                               | 0,53      |
| Valcatorce INTA                   | x 2138 | 160 | 33,84 ± 31,44  | 0,79                           | +                                 | 1,59      | 5,95 ± 1,64  | 0,93                         | +                               | 1,36      | 6,75 ± 1,72  | 0,92                         | +                              | 1,16      | 0,73 ± 0,14 | 0,95                         | +                               | 0,31      |
| Navideña INTA                     | x 2139 | 239 | 40,20 ± 20,26  | 0,71                           | +                                 | 0,71      | 10,86 ± 2,61 | 0,60                         | -                               | 0,64      | 12,64 ± 2,61 | 0,93                         | -                              | 0,67      | 2,88 ± 0,83 | 0,63                         | +                               | -0,08     |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2140 | 105 | 35,29 ± 22,63  | 0,81                           | +                                 | 0,54      | nd           | nd                           | nd                              | nd        | nd           | nd                           | nd                             | nd        | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2141 | 221 | 30,57 ± 18,08  | 0,74                           | +                                 | 0,66      | 9,44 ± 2,46  | 0,81                         | +                               | 0,52      | 11,53 ± 2,76 | 0,94                         | -                              | 1,22      | 1,19 ± 0,33 | 0,69                         | -                               | 0,09      |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2142 | 224 | 33,14 ± 26,27  | 0,84                           | +                                 | 1,64      | nd           | nd                           | nd                              | nd        | nd           | nd                           | nd                             | nd        | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2143 | 174 | 57,22 ± 31,26  | 0,80                           | +                                 | 1,39      | 12,33 ± 2,78 | 0,62                         | -                               | 0,35      | 15,04 ± 2,94 | 0,94                         | -                              | 0,02      | 1,59 ± 0,42 | 0,82                         | -                               | 0,11      |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2144 | 236 | 49,13 ± 22,19  | 0,70                           | +                                 | 0,79      | nd           | nd                           | nd                              | nd        | nd           | nd                           | nd                             | nd        | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2145 | 284 | 39,93 ± 26,03  | 0,84                           | +                                 | 0,63      | 12,95 ± 4,03 | 0,80                         | +                               | 0,54      | 15,06 ± 4,23 | 0,94                         | +                              | 0,48      | 1,34 ± 0,32 | 0,62                         | -                               | 0,29      |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2146 | 166 | 44,49 ± 22,25  | 0,73                           | +                                 | 0,71      | 11,97 ± 3,44 | 0,78                         | +                               | 0,02      | 14,84 ± 3,35 | 0,95                         | -                              | 0,18      | 1,56 ± 0,31 | 0,66                         | -                               | 0,28      |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2147 | 112 | 45,77 ± 23,35  | 0,75                           | +                                 | 1,40      | nd           | nd                           | nd                              | nd        | nd           | nd                           | nd                             | nd        | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Refinta 20 Navideña INTA          | x 2148 | 134 | 43,80 ± 18,30  | 0,61                           | +                                 | 0,79      | 11,87 ± 1,96 | 0,93                         | -                               | 1,32      | 13,65 ± 2,28 | 0,91                         | -                              | 0,42      | 1,21 ± 0,27 | 0,69                         | -                               | -0,22     |
| Antártica INTA                    | x 2163 | 51  | 38,46 ± 26,54  | 0,62                           | +                                 | 0,65      | 13,01 ± 1,83 | 0,91                         | +                               | -0,25     | 15,37 ± 1,84 | 0,78                         | -                              | 0,33      | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Refinta 20(↑ ss) Refinta 20 (↓ss) | x 2164 | 82  | 31,19 ± 12,42  | 0,75                           | +                                 | -0,30     | 18,02 ± 2,56 | 0,87                         | +                               | -1,21     | 19,47 ± 2,00 | 0,87                         | -                              | 0,63      | 1,87 ± 0,36 | 0,92                         | -                               | 0,02      |
| Cobrizza INTA Navideña INTA       | x 2174 | 292 | 53,49 ± 40,46  | 0,69                           | +                                 | 0,89      | 6,63 ± 0,83  | 0,90                         | +                               | 0,55      | 7,51 ± 0,71  | 0,89                         | -                              | -1,16     | 1,13 ± 0,21 | 0,78                         | -                               | -0,62     |
| Cobrizza INTA Navideña INTA       | x 2175 | 209 | 107,56 ± 48,04 | 0,60                           | +                                 | 0,28      | 6,75 ± 0,88  | 0,91                         | +                               | 0,85      | 7,61 ± 0,98  | 0,94                         | -                              | 0,22      | 1,14 ± 0,14 | 0,61                         | -                               | 0         |
| Cobrizza INTA Navideña INTA       | x 2177 | 180 | 63,11 ± 37,51  | 0,55                           | +                                 | 1,54      | 7,66 ± 0,84  | 0,90                         | +                               | -1,16     | 8,59 ± 0,84  | 0,91                         | -                              | 0,01      | 1,04 ± 0,29 | 0,71                         | -                               | -0,73     |
| Cobrizza INTA Navideña INTA       | x 2179 | 213 | 71,64 ± 34,22  | 0,47                           | +                                 | 0,40      | nd           | nd                           | nd                              | nd        | nd           | nd                           | nd                             | nd        | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Cobrizza INTA Navideña INTA       | x 2180 | 102 | 77,31 ± 40,88  | 0,59                           | +                                 | 0,48      | 6,91 ± 2,03  | 0,86                         | +                               | 4,69      | 7,87 ± 2,09  | 0,93                         | -                              | -1,27     | 1,04 ± 0,18 | 0,70                         | -                               | 2,43      |
| Refinta 20 x Angaco INTA          | 2200   | 87  | 23,41 ± 11,69  | 0,76                           | +                                 | 0,26      | 19,44 ± 2,08 | 0,93                         | +                               | -1,29     | 22,36 ± 2,40 | 0,78                         | -                              | 0,19      | 1,50 ± 0,42 | 0,77                         | +                               | -0,02     |
| Refinta 20 x Angaco INTA          | 2202   | 82  | 21,59 ± 12,25  | 0,75                           | +                                 | 0,82      | nd           | nd                           | nd                              | nd        | nd           | nd                           | nd                             | nd        | nd          | nd                           | nd                              | nd        |
| Refinta 20 x Angaco INTA          | 2203   | 93  | 29,46 ± 15,92  | 0,81                           | +                                 | 0,63      | 20,87 ± 2,44 | 0,93                         | +                               | -0,89     | 23,35 ± 1,96 | 0,83                         | -                              | -0,83     | 1,54 ± 0,21 | 0,83                         | -                               | 0,28      |

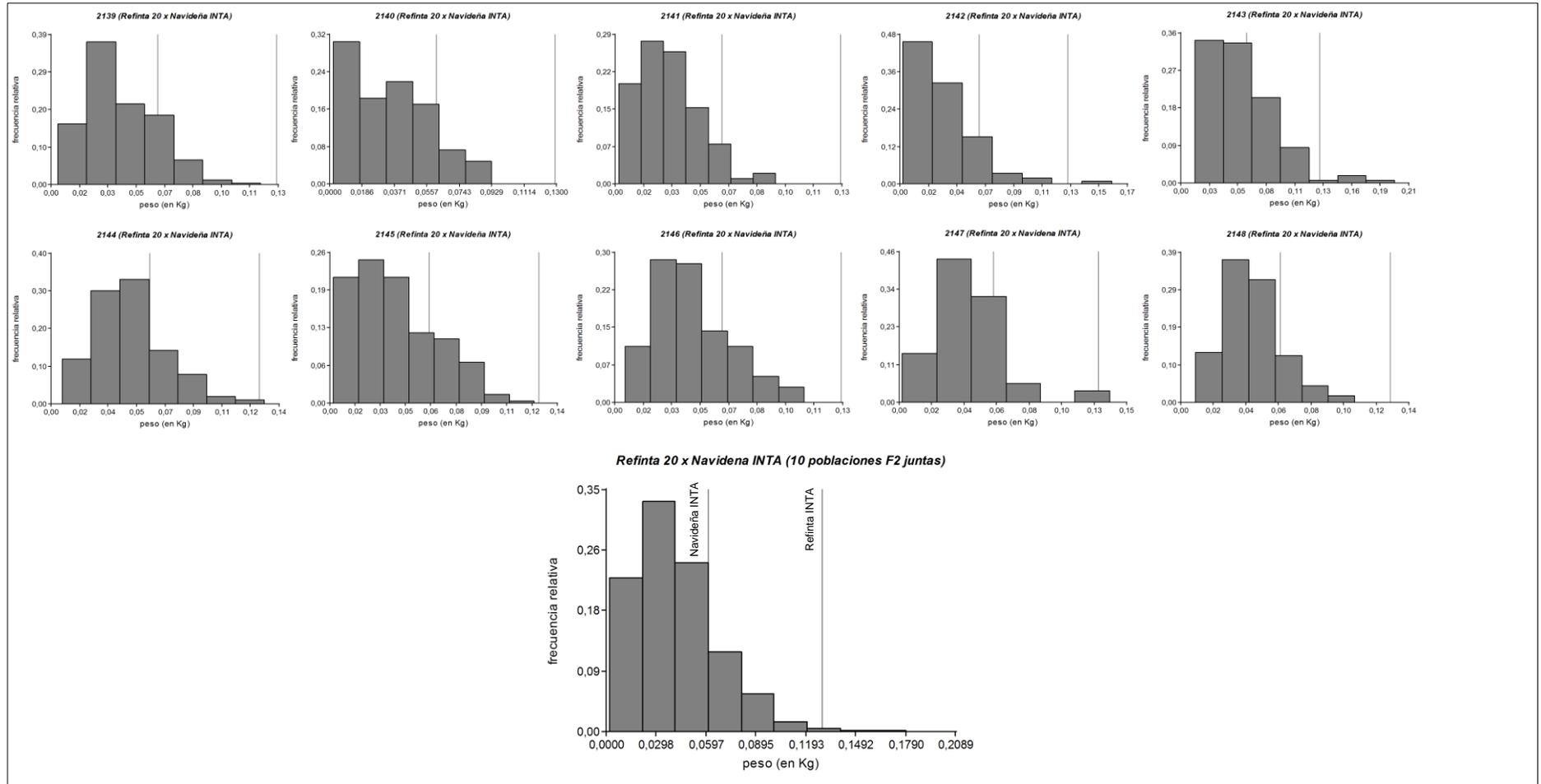
Nota de tabla 3: Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar. §= Segregación transgresiva; N=número de plantas;  $H^2$ =heredabilidad en sentido amplio; SS=sólidos solubles; ST=sólidos totales; PV=piruvato.



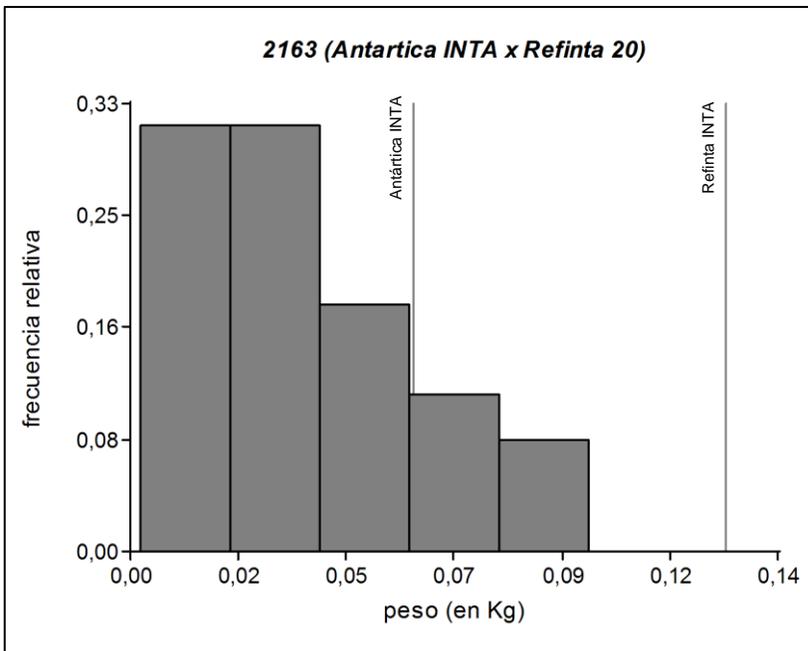
**Figura 5.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento entre Angaco INTA x Valcatorce INTA (1 población F<sub>2</sub>).



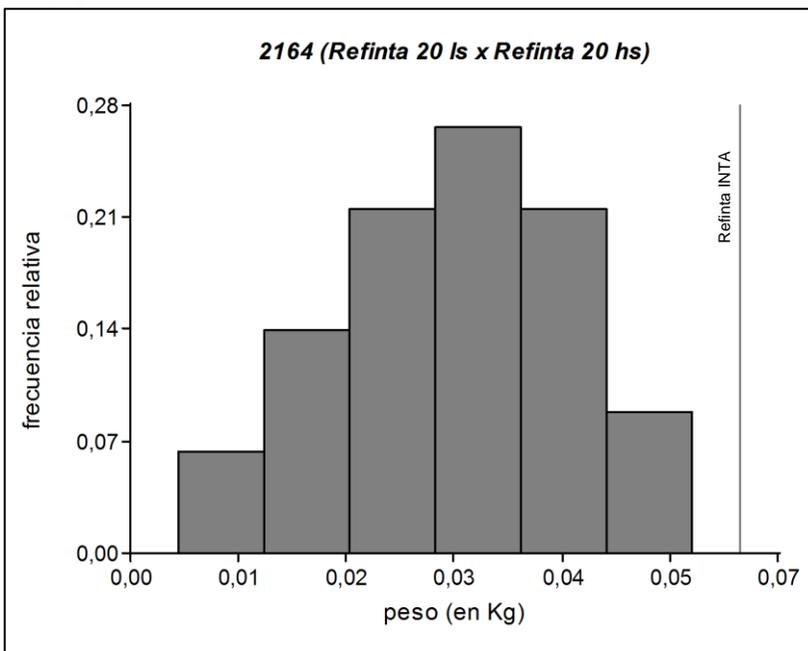
**Figura 6.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1 población F<sub>2</sub>).



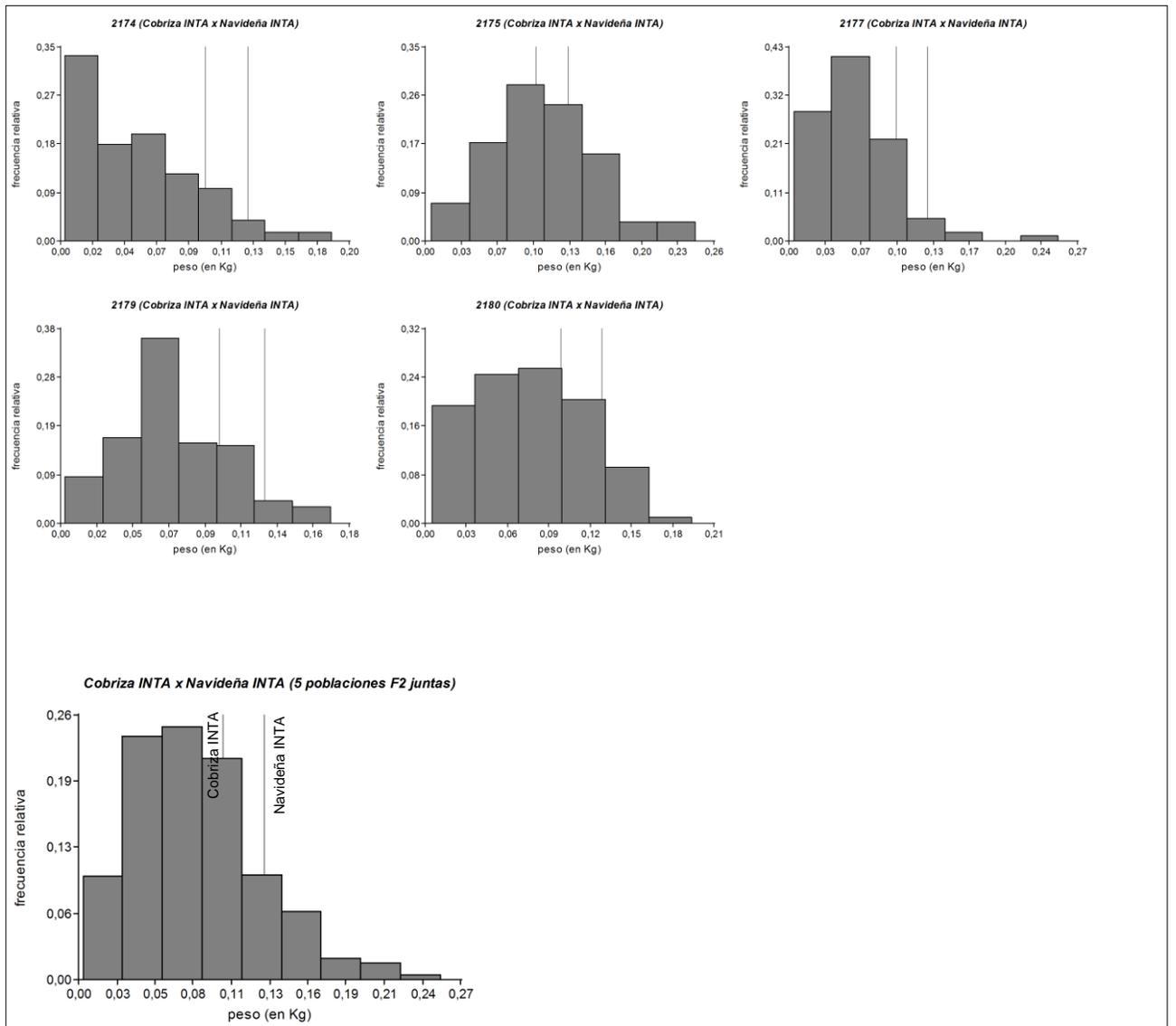
**Figura 7.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (10 poblaciones F2).



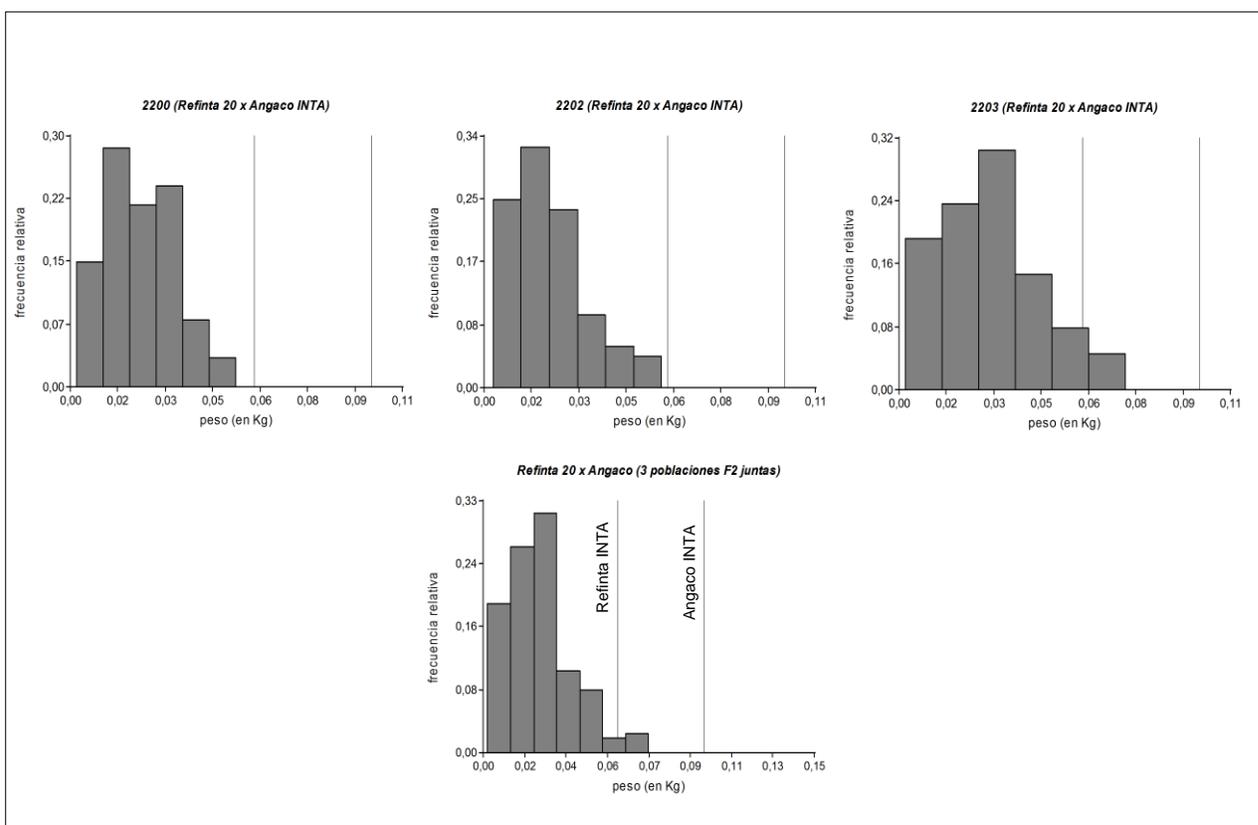
**Figura 8.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento Antártica INTA x Refinta 20 (1 población F<sub>2</sub>).



**Figura 9.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento Refinta 20 (individuos seleccionados con alto contenido de sólidos) x Refinta 20 (individuos seleccionados con bajo contenido de sólidos) (1 población F<sub>2</sub>).



**Figura 10.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (5 poblaciones F<sub>2</sub>).



**Figura 11.** Histograma del carácter peso de bulbo del cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (3 poblaciones F<sub>2</sub>).

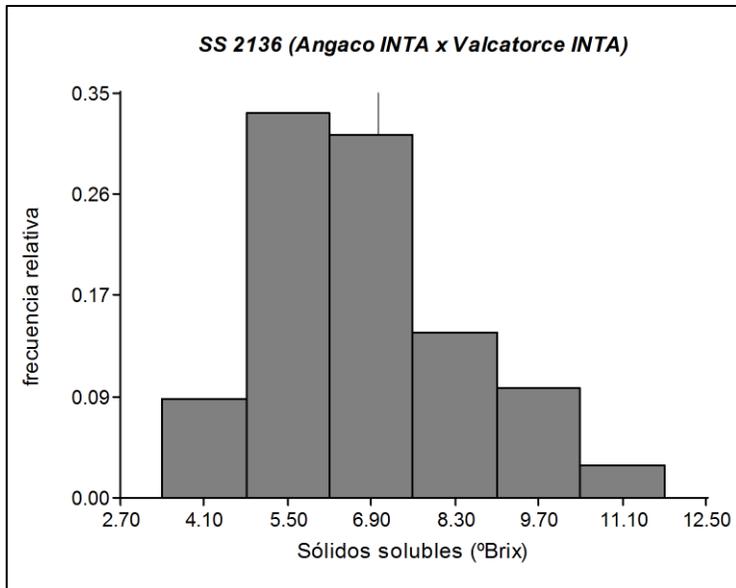
### 2.3.2. Sólidos solubles (SS)

Esta variable varió, considerando valores medios poblacionales, entre 5,9 g, para el cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA, y 18,0 g para el cruzamiento de Refinta 20 (↑ ss = individuos seleccionados con alto contenido de sólidos) x Refinta 20 (↓ss = individuos seleccionados con alto contenido de sólidos). Se graficó la distribución de frecuencias para evaluar el tipo de segregación en cada cruzamiento (Tabla 2 y Figuras 12-18). Los parentales tuvieron valor promedio de SS de 5,9; 7,0; 7,0; 7,1; 12,1 y 19,3 para Navideña INTA, Valcatorce INTA, Angaco INTA, Cobriza INTA, Antártica INTA y Refinta 20, respectivamente. Las distribuciones de frecuencia para SS presentaron asimetrías variables positivas o negativas dependiendo de cruzamiento, encontrándose también distribuciones simétricas (figuras 1-8). Considerando todas las poblaciones, la asimetría predominante es positiva, ya que 11 de las 16 poblaciones evaluadas presentaban un valor de asimetría

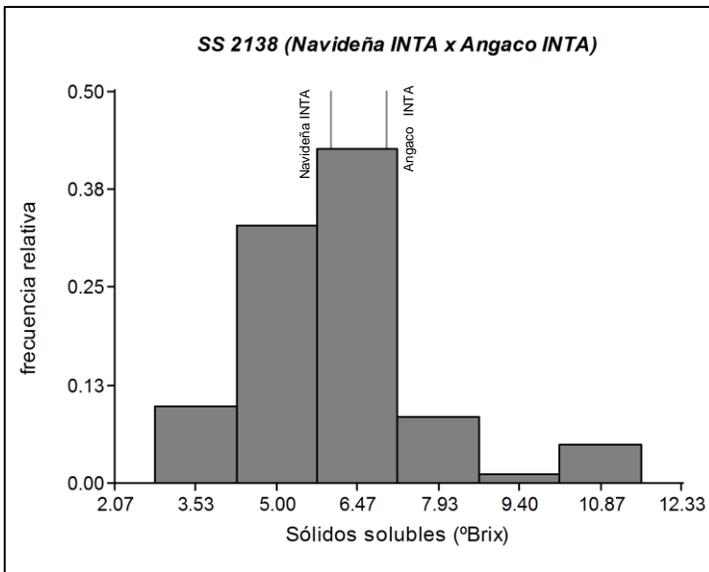
positivo. Se detectaron diferencias significativas para SS entre las F<sub>2</sub> de los diferentes cruzamientos (Tabla 4).

En 13 de las 16 poblaciones se detectaron individuos transgresivos (figs. 12-18).

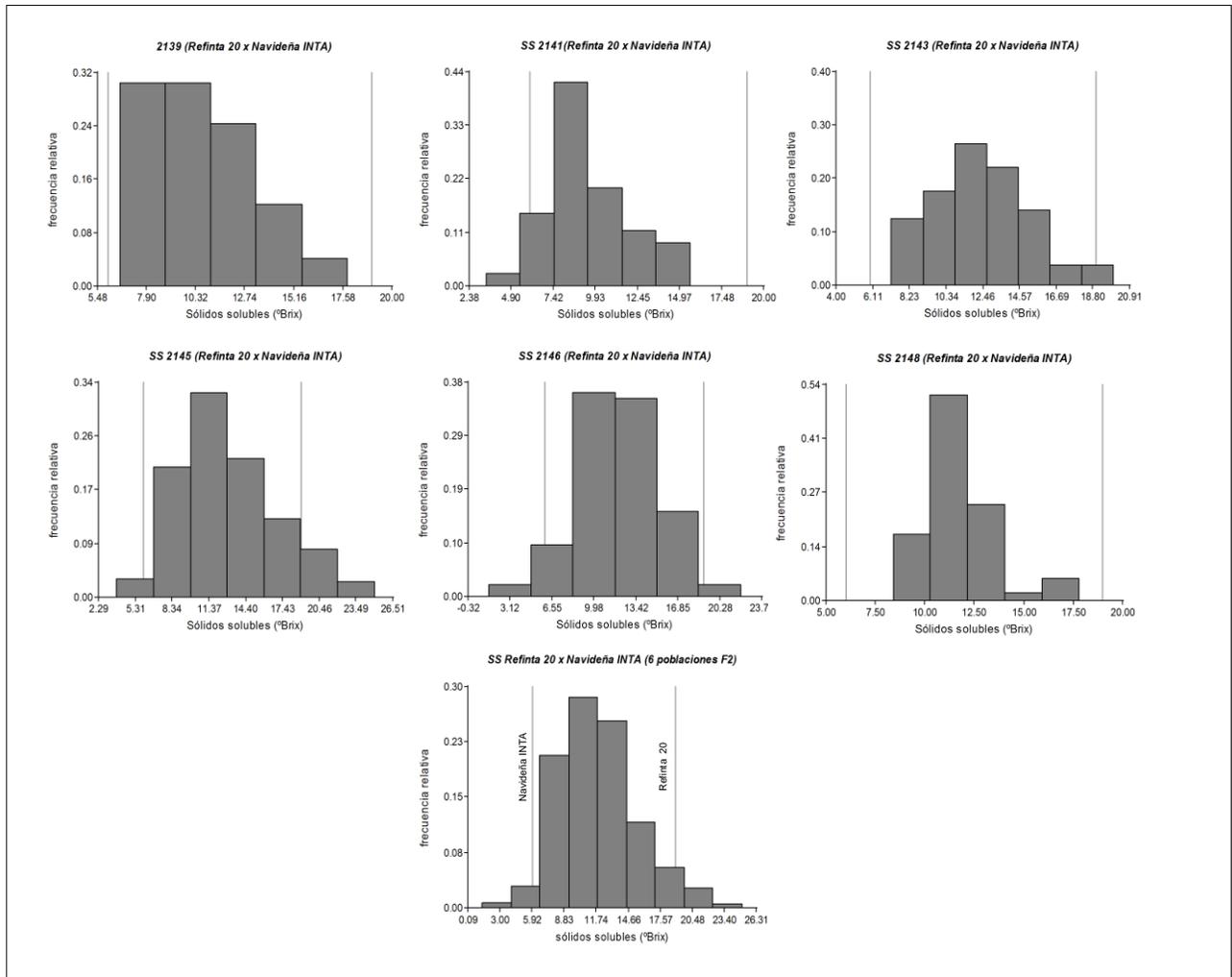
H<sup>2</sup> para SS varió entre 60,6 y 93,5% (Tabla 3) con una H<sup>2</sup> promedio de 85,1%, indicando un alto componente genético (y no ambiental) para este carácter.



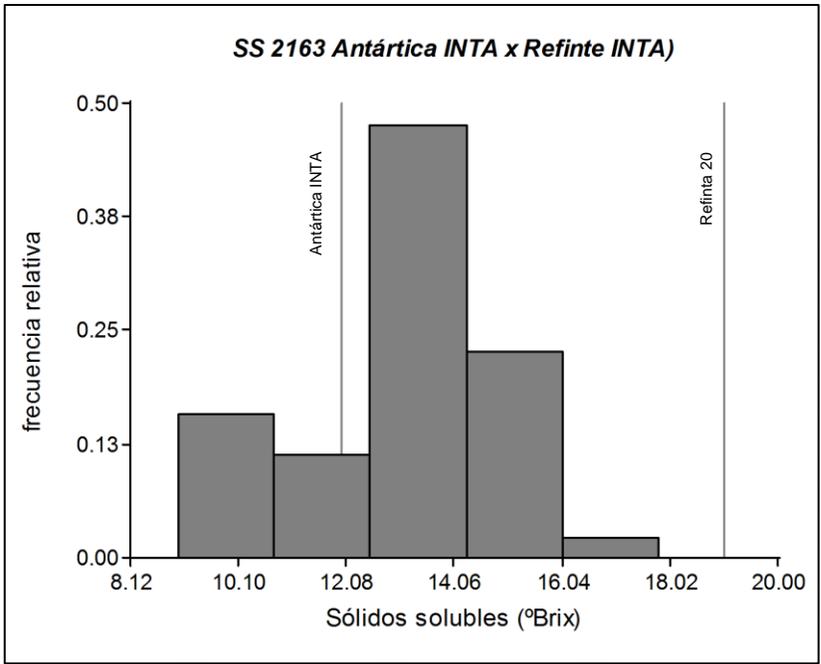
**Figura 12.** Histograma del carácter sólidos solubles del cruzamiento Angaco INTA x Valcatorce INTA (1 población F<sub>2</sub>).



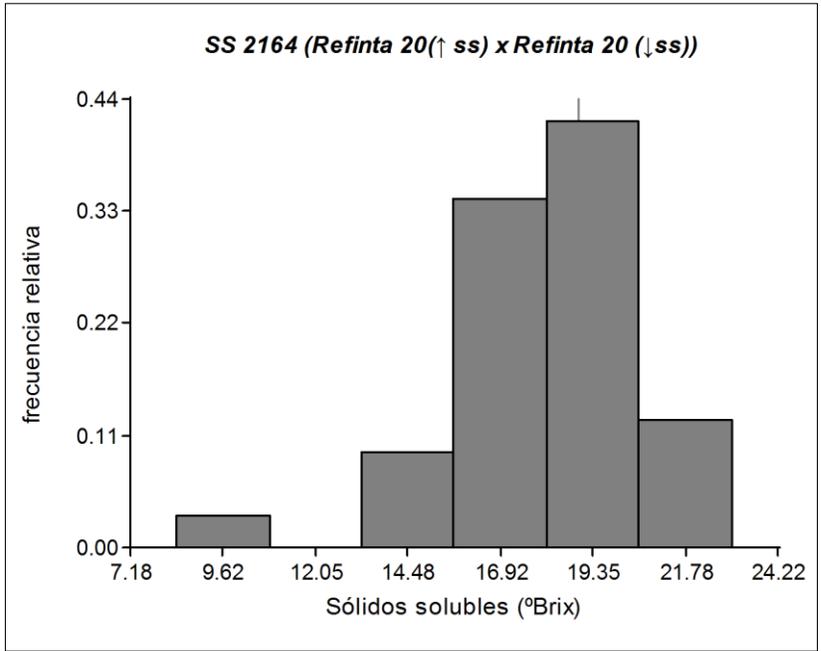
**Figura 13.** Histograma del carácter sólidos solubles del cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1 población F<sub>2</sub>).



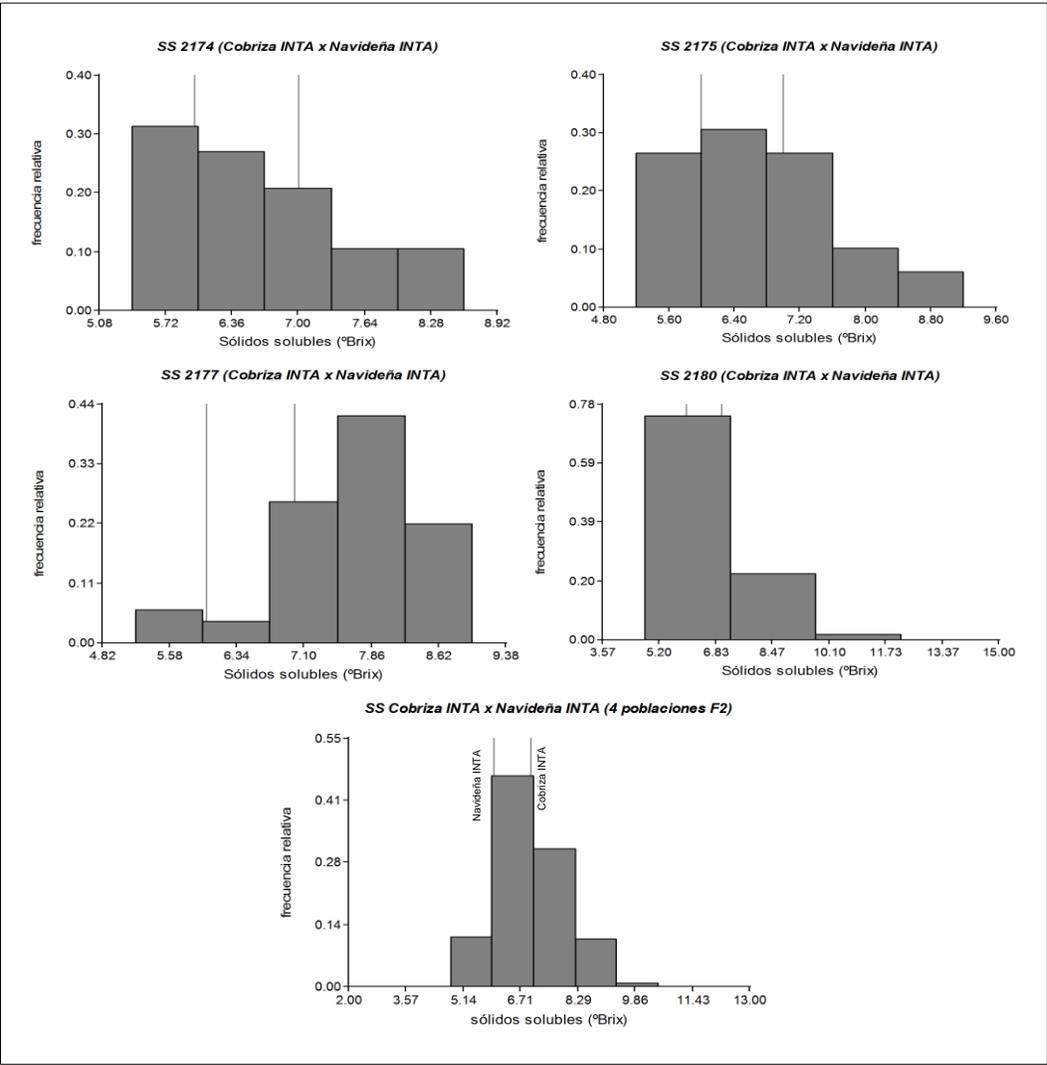
**Figura 14.** Histograma del carácter peso de cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (6 poblaciones F<sub>2</sub>).



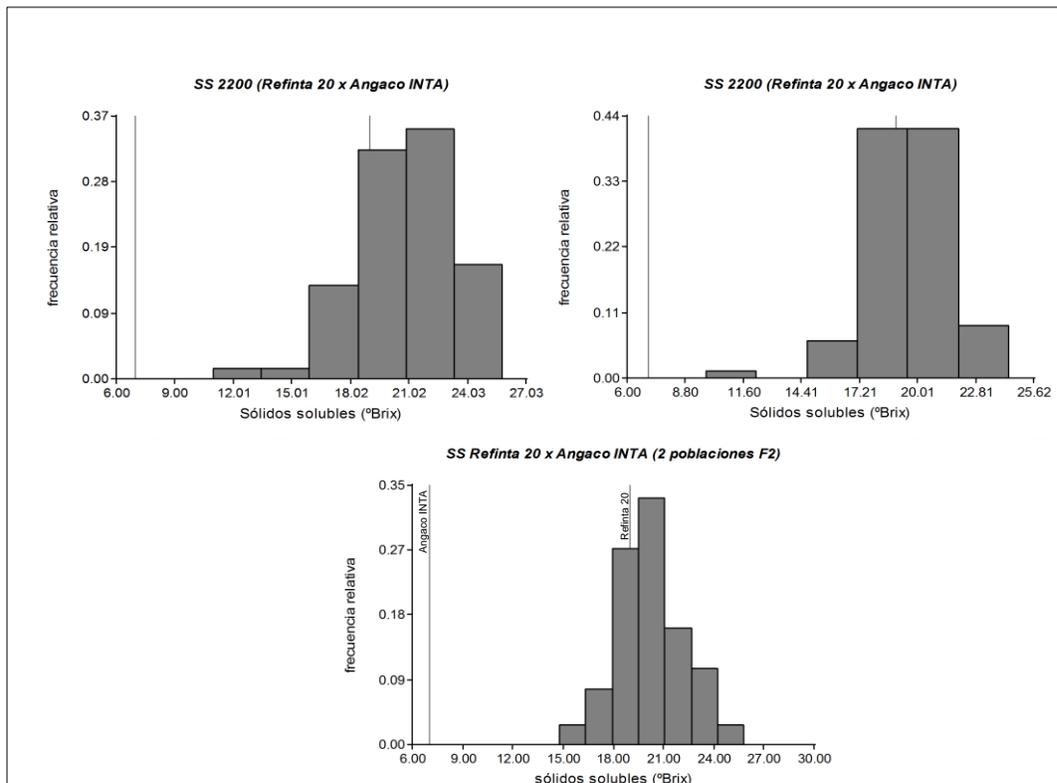
**Figura 15.** Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Antártica INTA x Refinta 20 (1 población F<sub>2</sub>).



**Figura 16.** Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Refinta 20(↑ss) x Refinta 20 (↓ss) (1 población F<sub>2</sub>).



**Figura 17.** Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (4 poblaciones F<sub>2</sub>).

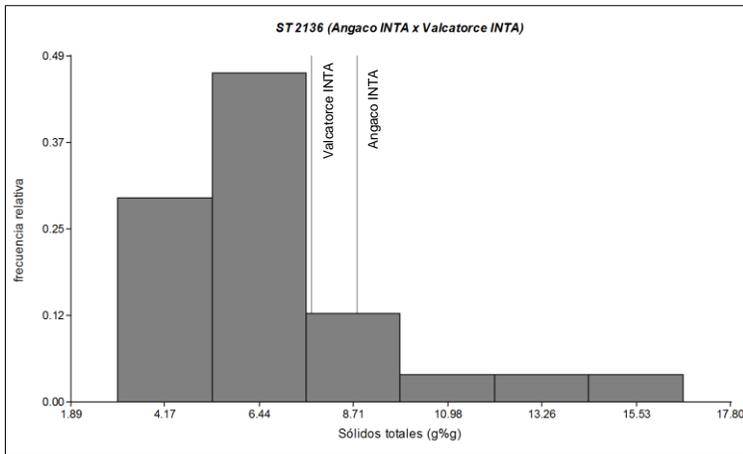


**Figura 18.** Histograma del carácter sólidos solubles de cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (4 poblaciones F<sub>2</sub>).

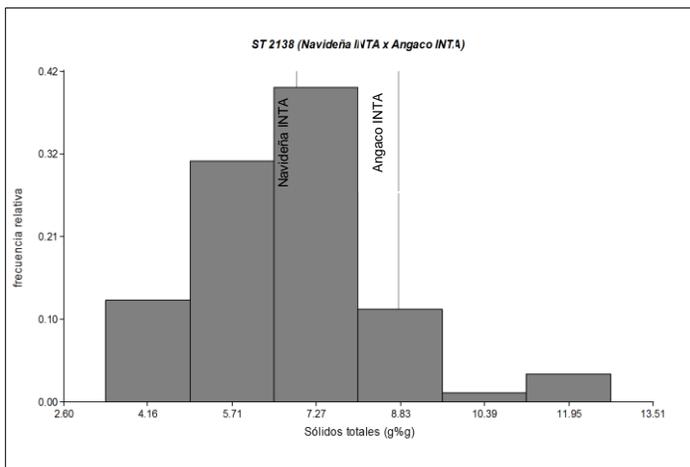
### 2.3.3. Sólidos Totales (ST)

El contenido de ST varió, en promedio por población, entre 6,75 g (para progenies de Cobriza x Navideña INTA) y 22,4 g (para progenies de Refinta 20 x Angaco INTA). La distribuciones de frecuencias para ST en las F<sub>2</sub> se presenta en las figuras 19-25. Los parentales tuvieron contenidos de ST de 6,9, 7,7, 8,5, 8,8 14,5 y 19,5% para Navideña INTA, Valcatorce INTA, Cobriza INTA, Angaco INTA, Antártica INTA y Refinta 20, respectivamente. Trece de las 16 poblaciones analizadas presentaron asimetría positiva, indicando una mayor frecuencia de valores menores a la media, comparable a los resultados obtenidos para SS. Se detectaron diferencias significativas para valores medios de ST entre las diferentes F<sub>2</sub> (Tabla 4). Individuos transgresivos se detectaron en 3 de las 16 poblaciones analizadas.

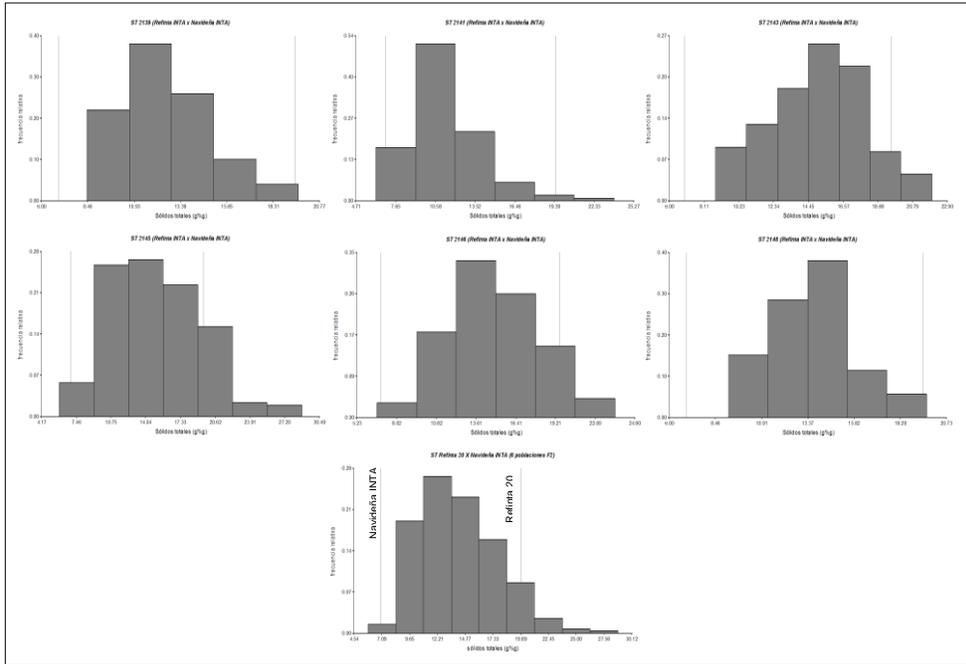
$H^2$  varió entre 78,1 y 95,6% (Tabla 3) con una  $H^2$  promedio de 89,2% indicando –al igual que para SS- que el contenido de ST está condicionado, mayoritariamente, por factores genéticos y no ambientales.



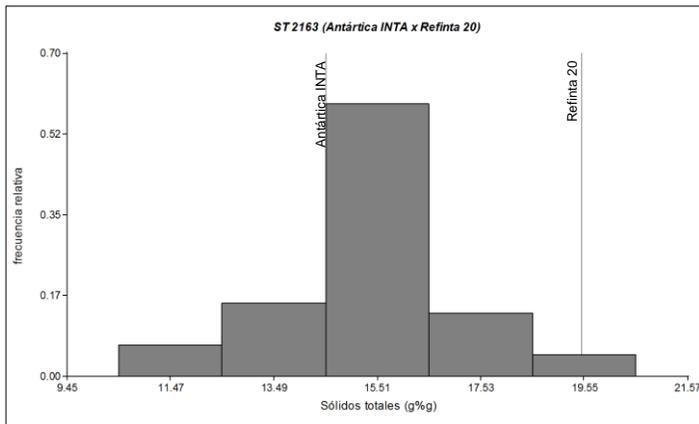
**Figura 19.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Angaco INTA x Valcatorce INTA (1 población F<sub>2</sub>).



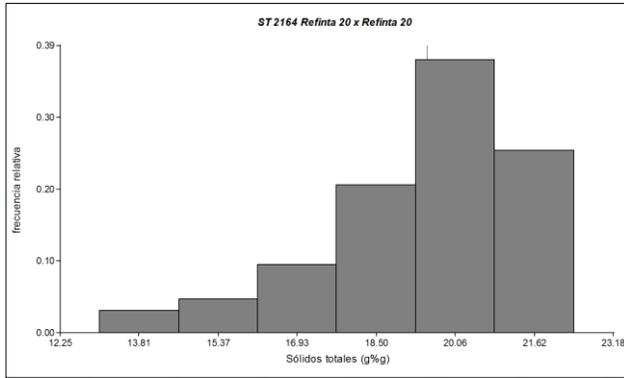
**Figura 20.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1 población F<sub>2</sub>).



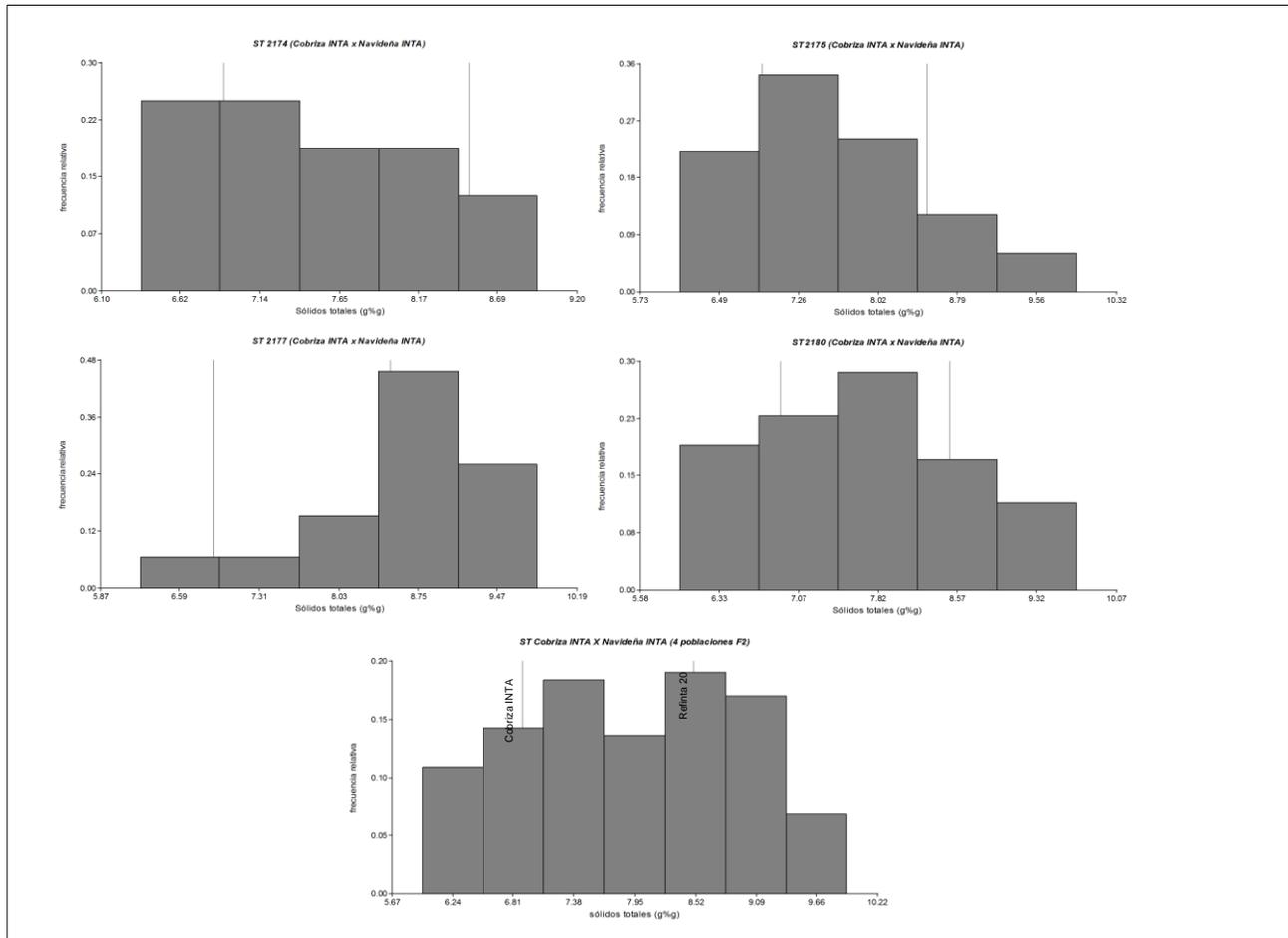
**Figura 21.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (6 poblaciones  $F_2$ ).



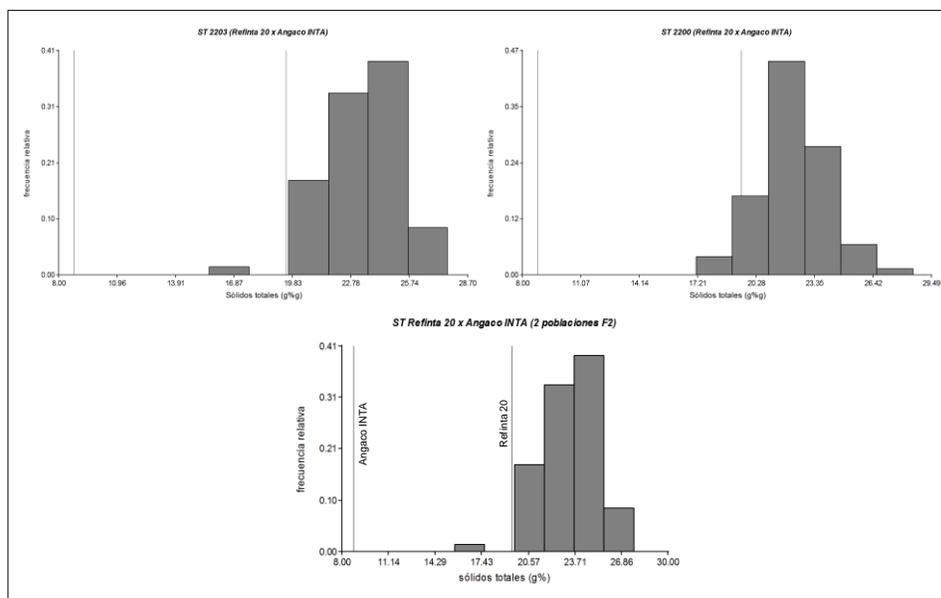
**Figura 22.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Antártica INTA x Refinta 20 (1 población  $F_2$ ).



**Figura 23.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Refinta 20 ( ) x Refinta 20 (altos sólidos) (1 población F<sub>2</sub>).



**Figura 24.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (4 poblaciones F<sub>2</sub>).



**Figura 25.** Histograma del carácter sólidos totales del cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (2 poblaciones F<sub>2</sub>).

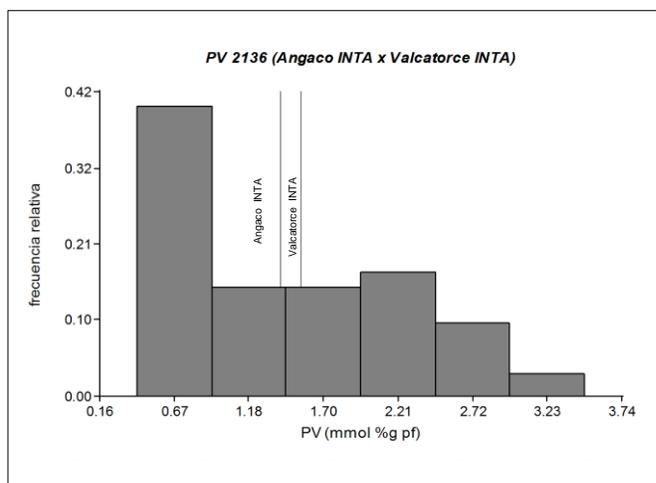
### 2.3.5. Piruvato

Esta variable tuvo un rango- en valores medios- de 0,73 mmol % g peso fresco para el cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA a 2,88 mmol % g peso fresco para el cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA. Se graficó la distribución de frecuencias para evaluar el tipo de segregación por cada cruzamiento (Tabla 2 y Figuras 26-31).

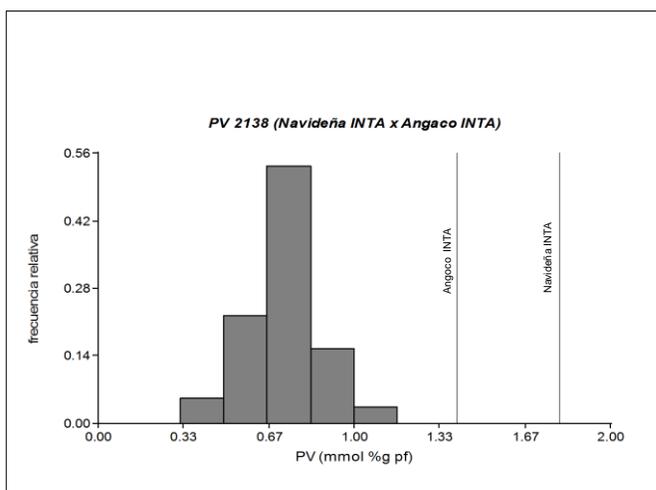
Las variedades parentales tuvieron un contenido de piruvato promedio de 1,38; 1,54; 1,72; 1,81; 1,86 y 1,89 mmol % g peso fresco para las variedades Angaco INTA, Valcatorce INTA, Antártica INTA, Navideña INTA, Cobriza INTA y Refinta 20 respectivamente. Se detectaron diferencias significativas entre los valores medios de piruvato en los diferentes cruzamientos analizados (Tabla 4).

Por otro lado, 10 de las 15 poblaciones F<sub>2</sub> analizadas presentaron asimetría positiva, indicando una mayor frecuencia de valores menores a la media. Por otro lado en 7 de las 15 poblaciones analizadas, se detectaron individuos con valores menores o mayores a 2 desviaciones estándar respecto del rango de valores paternos, indicando un tipo de segregación transgresiva para este carácter, debido a que aquellas poblaciones en las que se encontraron individuos transgresivos, sus valores fueron mucho menores que las medias de los padres, tal como se aprecia en los histogramas.

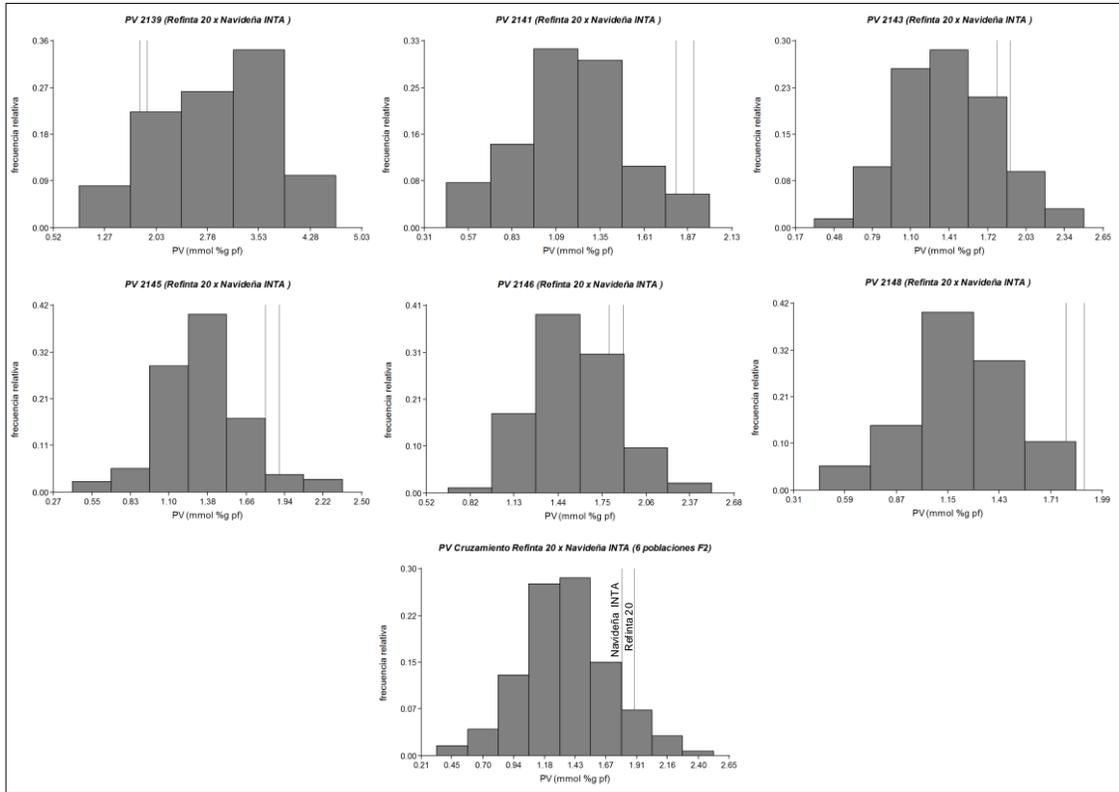
Además se estudió la heredabilidad en sentido amplio del contenido de piruvato en cebolla y se obtuvieron valores entre 61,0% al 95,0% (Tabla 3) con una heredabilidad promedio entre las 15 poblaciones cultivadas en el mismo ambiente del 73,9 % indicando que la variación en el contenido de piruvato en cebolla está determinado en gran medida por diferencias genéticas entre las plantas y en menor medida por influencias ambientales.



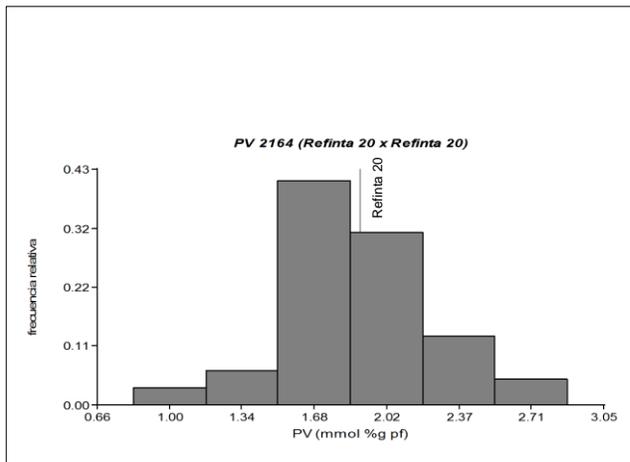
**Figura 26.** Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Angaco INTA x Valcatorce INTA (1 población F<sub>2</sub>).



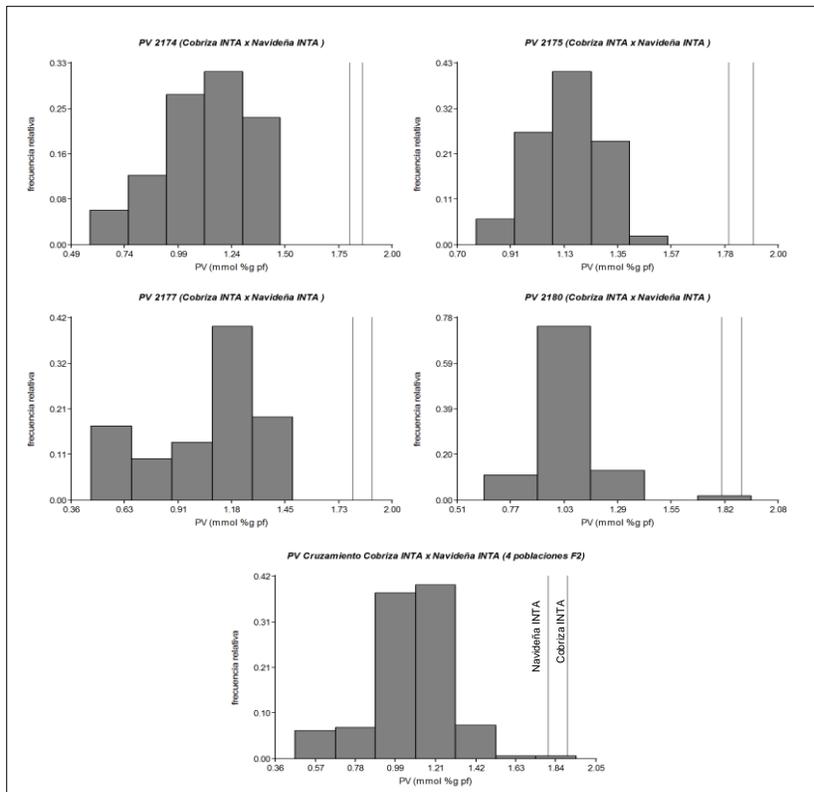
**Figura 27.** Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Navideña INTA x Angaco INTA (1 población F<sub>2</sub>).



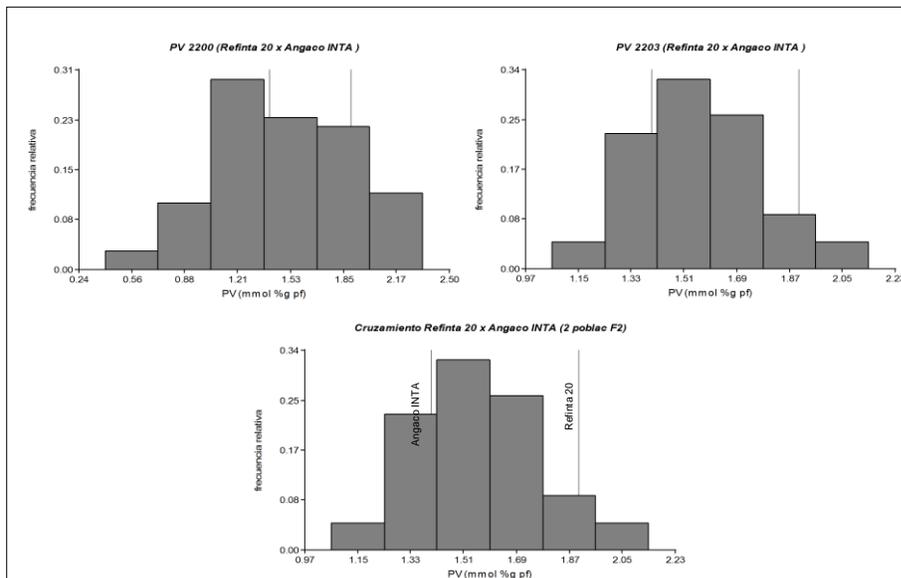
**Figura 28.** Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA (6 poblaciones F<sub>2</sub>).



**Figura 29.** Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Refinta 20 (↑ ss) x Refinta 20 (↓ ss) (1 población F<sub>2</sub>).



**Figura 30.** Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Cobriza INTA x Navideña INTA (4 poblaciones F<sub>2</sub>).



**Figura 31.** Histograma del carácter piruvato del cruzamiento Refinta 20 x Angaco INTA (2 poblaciones F<sub>2</sub>).

**Tabla 4. ANOVA.** Análisis de la varianza y comparación de medias (Fisher) de los caracteres peso, sólidos solubles (SS) y totales (ST) y piruvato(PV) en los distintos cruzamientos.

| Cruzamiento                         | N° de poblaciones F <sub>2</sub> | N    | Media +/- desv.est. | ANOVA (Fisher) |    |    |    |
|-------------------------------------|----------------------------------|------|---------------------|----------------|----|----|----|
|                                     |                                  |      |                     | Peso           | SS | ST | PV |
| Angaco INTA x Valcatorce INTA       | 1                                | 200  | 28,45 ± 23,9        | B              | B  | A  | C  |
| Navideña INTA x Angaco INTA         | 1                                | 160  | 33,85 ± 31,44       | AB             | A  | A  | A  |
| Refinta 20 x Navideña INTA          | 10                               | 1895 | 41,95 ± 23,06       | C              | C  | C  | C  |
| Antártica INTA x Refinta 20         | 1                                | 51   | 38,46 ± 26,64       | BC             | D  | D  | ND |
| Refinta 20(↑ ss) x Refinta 20 (↓ss) | 1                                | 82   | 31,19 ± 12,42       | AB             | E  | E  | D  |
| Cobrizo INTA x Navideña INTA        | 5                                | 996  | 74,64 ± 40,22       | D              | B  | B  | B  |
| Refinta 20 x Angaco INTA            | 3                                | 262  | 24,82 ± 13,29       | A              | F  | F  | C  |

### 2.3.6. Población 2143 (Refinta 20 x Navideña INTA)

En esta población se midió: sólidos solubles, sólidos totales, piruvato, actividad antiplaquetaria, tiosulfatos, polifenoles, flavonoides y carbohidratos. Para cada carácter se calcularon variables estadísticas descriptivas (Tabla 5) y se graficaron histogramas de distribución frecuencias (Figuras 32 y 33). Se calculó  $H^2$  y se estimaron valores de correlación simple (r) entre los caracteres (Tabla 6).

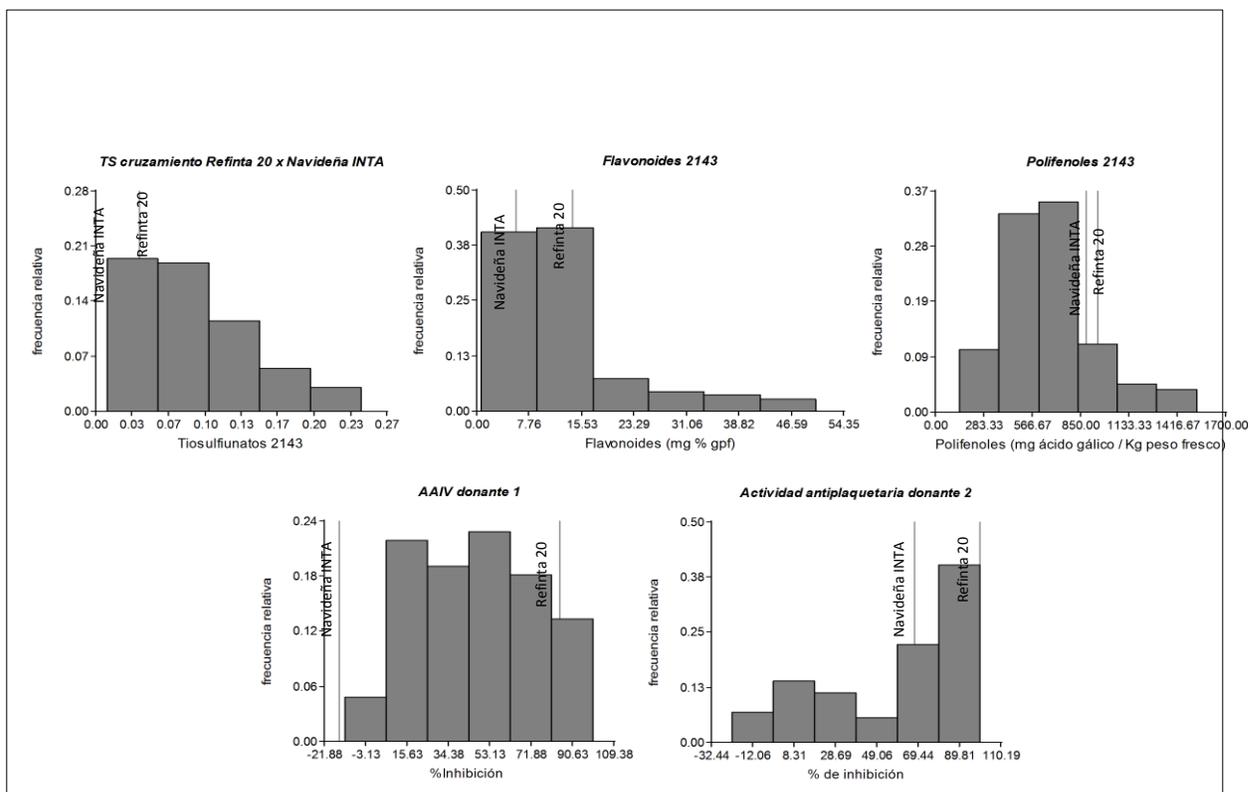
Observando los histogramas de tiosulfatos, polifenoles totales y flavonoides puede observarse una tendencia a la mayor frecuencia de valores menores a la media, presentando unos valores de asimetría positivos y más altos respecto a las otras variables estudiadas. Las variables contenido de carbohidratos (con excepción del contenido de sacarosa) y la AAIV presentaron asimetrías cercanas a 0, consistentes con distribuciones normales.

**Tabla 5.** Valores medios, heredabilidad y presencia de segregación transgresiva de los caracteres tiosulfatos, carbohidratos, flavonoides, polifenoles y actividad antiplaquetaria *in vitro* en la población F<sub>2</sub> 2143.

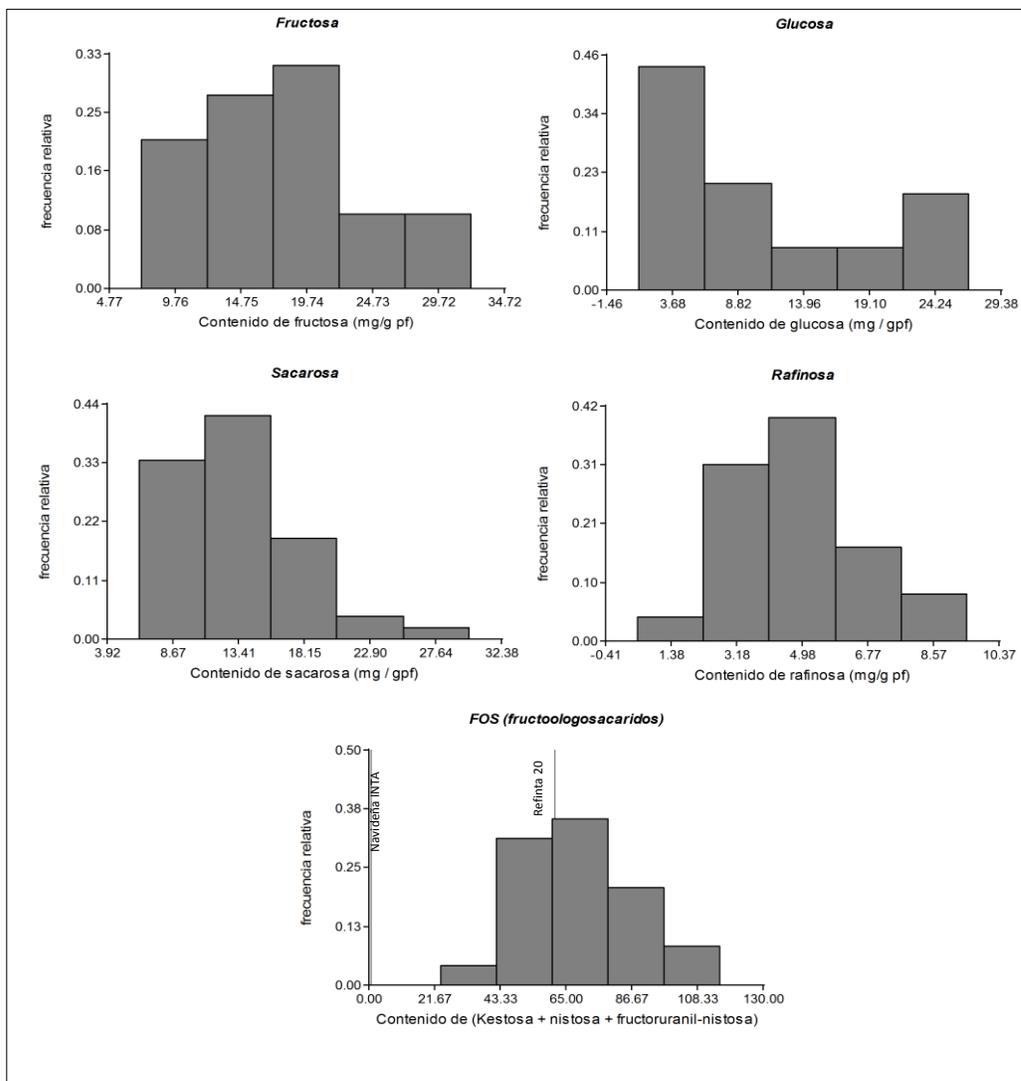
| Población 2143 (Refinta 20 x Navideña INTA)        |     |        |        |        |        |         |           |                          |                |
|--|-----|--------|--------|--------|--------|---------|-----------|--------------------------|----------------|
| Variable   | N   | Media  | D.E.   | CV     | Mín    | Máx     | Asimetría | Segregación Transgresiva | H <sup>2</sup> |
| TS (mmol % g pf)                                   | 162 | 0,05   | 0,06   | 115,03 | 0,00   | 0,24    | 1,07      | +                        | nd             |
| Fructosa (mg/g pf)                                 | 48  | 17,97  | 6,51   | 36,23  | 7,26   | 32,22   | 0,35      | +                        | 0,97           |
| Glucosa (mg/g pf)                                  | 48  | 10,99  | 7,81   | 71,07  | 1,11   | 26,81   | 0,76      | +                        | 0,85           |
| Sacarosa (mg/g pf)                                 | 48  | 13,14  | 4,67   | 35,54  | 6,29   | 30,01   | 1,31      | +                        | 0,89           |
| Rafinosa (mg/g pf)                                 | 48  | 4,77   | 1,79   | 37,59  | 0,49   | 9,47    | 0,52      | Nd                       | nd             |
| 1-Kestosa (mg/g pf)                                | 48  | 18,19  | 4,58   | 25,17  | 10,56  | 28,1    | 0,38      | Nd                       | nd             |
| Nistosa (mg/g pf)                                  | 47  | 25,28  | 7,91   | 31,29  | 9,02   | 46,79   | 0,52      | Nd                       | nd             |
| Fructo-furanosil-nistosa (mg/g pf)                 | 48  | 26,37  | 9,59   | 36,38  | 3,87   | 46,94   | 0,17      | Nd                       | nd             |
| ∑ de FOS (kestosa, nistosa y fructofuranilnistosa) | 48  | 6948   | 19,13  | 27,52  | 23,78  | 115,84  | 0,19      | +                        | 0,97           |
| FL(mmol % gpf)                                     | 111 | 12,59  | 9,53   | 75,65  | 0,71   | 50,23   | 1,88      | +                        | 0,52           |
| PF (mg/ Kg pf)                                     | 104 | 667,24 | 270,43 | 40,53  | 142,03 | 1529,06 | 1,01      | +                        | 0,70           |
| AAIV 1 (% de inhibición)                           | 105 | 47,17  | 27,81  | 58,95  | -12,5  | 100     | 0,14      | -                        | 0,94           |
| AAIV 2 (% de inhibición)                           | 72  | 58,89  | 37,32  | 63,37  | -22,25 | 100     | -0,61     | +                        | 0,81           |

N= número de plantas; TS= Tiosulfatos; H<sup>2</sup>= heredabilidad en sentido amplio; PF= polifenoles; FL = flavonoides totales; AAIV 1= actividad antiplaquetaria en donante 1; AAIV 2= actividad antiplaquetaria en donante 2. Nd= no determinado.

Los caracteres que más variaron fueron los tiosulfatos, AAIV y el contenido de flavonoides, y los que menos variaron fueron PTs y carbohidratos. Dentro de los caracteres que más variaron, la AAIV tomó valores negativos, de hasta 100% sugiriendo efectos proagregantes (en ambos donantes) extractos de algunos individuos F<sub>2</sub>. Esta respuesta se dio en una baja proporción (15 %) de individuos.



**Figura 32.** Histogramas de los caracteres tiosulfatos, flavonoides, piruvatos, polifenoles y actividad antiplaquetaria del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA.



**Figura 33.** Histogramas de los principales carbohidratos en cebolla del cruzamiento Refinta 20 x Navideña INTA.

La Tabla 6 presenta valores de correlación simple entre las variables. Se hallaron correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) entre TSs y piruvato, sólidos solubles, totales y actividad antiplaquetaria, entre actividad antiplaquetaria y tiosulfatos, piruvato y sólidos totales para el donante 1 y entre actividad antiplaquetaria y piruvato, sólidos solubles y sólidos totales y peso (entre AAIV y peso la correlación fue negativa) para el donante 2, entre polifenoles y peso (correlación negativa), piruvato y actividad antiplaquetaria, entre flavonoides y polifenoles, entre fructooligosacáridos y glucosa, y entre sacarosa y glucosa y fructosa.

Los valores de correlación más altos se obtuvieron entre sólidos solubles y sólidos totales, entre piruvato y tiosulfatos y entre fructo-oligosacárido y glucosa.

**Tabla 6.** Coeficientes de correlación entre los caracteres evaluados en la población 2143.

|       | TS    | Peso   | PV    | SS    | ST    | AAIV1 | AAIV2 | PTs   | FL    | FOS    | Glu   | Fruc  |
|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| TS    |       |        |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
| Peso  | -0,16 |        |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
| PV    | 0,48* | -0,36* |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
| SS    | 0,28* | -0,41* | 0,24* |       |       |       |       |       |       |        |       |       |
| ST    | 0,36* | -0,45* | 0,36* | 0,85* |       |       |       |       |       |        |       |       |
| AAIV1 | 0,34* | -0,08  | 0,47* | 0,17  | 0,27* |       |       |       |       |        |       |       |
| AAIV2 | 0,22  | -0,37* | 0,54* | 0,38* | 0,43* | 0,44* |       |       |       |        |       |       |
| PTs   | 0,07  | -0,27* | 0,44* | 0,15  | 0,15  | 0,27* | 0,34* |       |       |        |       |       |
| FL    | -0,09 | -0,02  | 0,02  | 0,06  | 0,12  | -0,06 | -0,01 | 0,31* |       |        |       |       |
| FOS   | 0,14  | -0,04  | 0,02  | -0,01 | 0,16  | -0,05 | -0,02 | -0,1  | 0,16  |        |       |       |
| Glu   | -0,18 | -0,01  | -0,09 | 0,12  | -0,05 | -0,11 | -0,06 | -0,11 | -0,3  | -0,51* |       |       |
| Fruc  | 0,10  | 0,14   | -0,02 | -0,13 | -0,09 | -0,13 | -0,1  | 0,08  | -0,04 | -0,19  | 0,27  |       |
| Sac   | 0,05  | 0,12   | -0,09 | -0,22 | -0,21 | -0,2  | -0,27 | -0,19 | -0,10 | 0,11   | 0,43* | 0,48* |

\* p < 0,05

Ts= tiosulfatos; PV= piruvato; SS= sólidos solubles; ST= sólidos totales; AAIV1= actividad antiplaquetaria en donante 1; AAIV2= actividad antiplaquetaria en donante 2; PF= polifenoles totales; FL= flavonoides; FOS= fructooligosacáridos; Glu= glucosa; Fruc= fructosa; Sac= sacarosa.

\* denota valores significativos p<0.05.

## 2.4. Discusión

En este capítulo se estudió el tipo de segregación, la asimetría, la presencia de segregación transgresiva, la heredabilidad, el nivel de variabilidad y las correlaciones entre variables de interés agronómico y nutricional en cebolla.

### 2.4.1. Peso de bulbo

Se distribuyó de acuerdo a un carácter poligénico, presentando una distribución continua y ajustándose al modelo poligénico, además las distribuciones fueron asimétricas en su mayoría indicando la acción preponderante de interacciones alélicas dominantes en los genes implicados. Cuando la acción génica que determina un carácter tiene un componente aditivo bajo, indica que los alelos para bajo y alto peso no estarían ligados en los padres, es decir, en el padre de alto peso también es posible que existan alelos de bajo peso (Lin et al., 1995). En general los valores medios de peso obtenido en las poblaciones F<sub>2</sub> resultaron

menores a los valores parentales. Esto también indica una acción génica principalmente dominante. Las diferencias significativas halladas en los distintos cruzamientos indican variabilidad genética importante en las variedades parentales y, por lo tanto, en los cruzamiento resultantes de ellas. La existencia de este nivel de variabilidad alto en el carácter peso de bulbo es interesante a los fines de mejorar genéticamente el rendimiento del cultivo de cebolla utilizando estos materiales.

Por otro lado, la existencia de individuos con segregación transgresiva indica la existencia de combinaciones alélicas favorables para el peso de bulbo que podrían incrementar el rendimiento y no se encuentran representadas en las variedades parentales. Esto también podría indicar que existen genes con alelos favorables para obtener altos rendimientos en ambos padres de cada cruzamiento, aunque la mayoría de los individuos segregantes tuvieron valores menores a los padres, lo que indica que esta combinación favorables hipotética es difícil de lograr con los materiales parentales evaluados en el presente trabajo. Además de la acción complementaria de genes involucrados en este carácter, también es posible que existan fenómenos epistáticos entre los mismos (Rieseberg, Archer, & Wayne, 1999). Los valores de heredabilidad en sentido amplio obtenidos son moderados de acuerdo a (Robinson, Comstock, & Harvey, 1949) quienes clasificaron la  $H^2$  en alta (> 60%), moderada (30-60%) a baja (< 30%). Estos valores moderados que fueron de 33% al 84% para el carácter peso de bulbo coinciden con los rangos de  $H^2$  obtenido por otros autores para este carácter. Degewione (2011) trabajó con accesiones de shallot y obtuvo valores de  $H^2$  de 84% para diámetro de bulbo, de 60,4% para rendimiento por planta y de 77,8% para rendimiento de bulbo por planta. Hosamani (2010) obtuvo una  $H^2$  del 64%, Mohanty, (2001) del 80.8% y Haydar (2007) del 48% para  $H^2$  de peso de bulbo en cebolla. Chattopadhyay (2013) obtuvo una  $H^2$  del 97,9% para peso de bulbo en cebolla, este valor superior a nuestros resultados puede deberse a las condiciones experimentales y a los materiales estudiados ya que la heredabilidad es específica para una población y un ambiente determinados.

Considerando las correlaciones halladas, sería posible en esta población, seleccionar cebolla con tamaños (peso) pequeños y pungentes, con alto contenido de sólidos y fuerza antiplaquetaria, tal como una de las variedades parentales Refinta 20, debido a las

correlaciones negativas estadísticamente significativas obtenidas, pero sería difícil hallar individuos con alto peso y alto contenido de sólidos, pungencia y actividad antiplaquetaria. Además, la alta correlación entre sólidos solubles y sólidos totales hallada permitiría usar el contenido de SS- determinación metodológicamente más sencilla y rápida- para seleccionar para ST, tal como fue propuesto por (Mallor et al., 2011). Por otro lado, la baja y estadísticamente no significativa correlación obtenida entre sólidos totales y fructanos ya ha sido reportada previamente a nivel molecular, McCallum (2006) encontró que regiones cromosómicas diferentes y no ligadas entre sí afectaban el contenido de materia seca y la producción de fructanos. Además, las correlaciones bajas entre peso de bulbo y contenido de sacarosa y azúcares reductores indican que sería posible seleccionar en esta población para cebollas dulces tanto grandes como pequeñas, lo que podría ser interesante industrialmente (Wall, Mohammad, & Corgan, 1996). La baja y estadísticamente no significativa correlación obtenida entre sacarosa y azúcares no reductores indica que sería difícil obtener cebollas dulces con alta actividad antiplaquetaria utilizando estos materiales. Sería prácticamente imposible seleccionar cebollas grandes con alto contenido de materia seca usando estos materiales ya que estas variables están negativamente (y estadísticamente significativa) correlacionadas, tal como fue reportado previamente (Hosamani, Patil, & Ajjappalavara, 2010).

#### **2.4.2. Sólidos solubles**

Analizando las distribuciones de frecuencia y los valores de asimetría obtenidos para sólidos solubles es posible inferir un tipo de herencia poligénica y la acción preponderante de interacciones alélicas aditivas. Esto está en concordancia con reportes previos en donde la acción génica predominante para el contenido de sólidos en cebolla es la aditividad (Wall & Corgan, 1999) y a pesar de ser un carácter cuantitativo es fácilmente explicado con un modelo simple de dominancia- aditividad (Lin et al., 1995; Simon, 1995). Las diferencias significativas halladas en los distintos cruzamientos indican variabilidad genética importante para el contenido de sólidos solubles en las variedades parentales y, por lo tanto, en los cruzamiento resultantes de ellas.

Por otro lado, la existencia de individuos con segregación transgresiva indica la existencia de combinaciones alélicas favorables en los individuos  $F_2$  que no se encuentran

representadas en las variedades parentales. Además de la acción complementaria de genes involucrados en este carácter, también es posible que existan fenómenos epistáticos entre los mismos (Rieseberg et al., 1999).

Además, los valores altos de heredabilidad para SS obtenidos –superiores al 60%-en todos los cruzamientos analizados, sugieren que existe una proporción importante de la variabilidad fenotípica observada que estaría siendo explicada por diferencias genéticas. Estos valores altos de heredabilidad superiores a 60% para SS concuerdan con otros autores (Kadams & Nwasike, 1986; Simon, 1995; Mcallum 1968) aunque son levemente superiores a los obtenidos por (Lin et al., 1995), esto es esperable ya que el valor de heredabilidad es específico para una población determinada en un ambiente específico.

### **2.4.3. Sólidos totales**

Analizando las distribuciones de frecuencia y los valores bajos de asimetría obtenidos para sólidos totales es posible inferir un tipo de herencia poligénica y la acción preponderante de interacciones alélicas aditivas. Esto está en concordancia con reportes previos, Hosamani (2010) encontró valores altos de heredabilidad en sentido estricto para el contenido de ST y postuló que esto sería debido a una acción génica aditiva. Las diferencias significativas halladas en los distintos cruzamientos indican variabilidad genética importante para el contenido de sólidos solubles en las variedades parentales y, por lo tanto, en los cruzamiento resultantes de ellas.

Por otro lado, sólo en 3 de las 16 poblaciones analizadas, se detectaron individuos con segregación transgresiva, indicando que los alelos para alto –o bajo- contenido de ST están ligados en los genotipos parentales y por lo tanto las combinaciones alélicas ideales para obtener altos ST ya están representadas en los genotipos parentales.

Además los altos valores de  $H^2$  del contenido de ST obtenidos en todos los cruzamientos analizados indican que es posible seleccionar por alto contenido de sólidos teniendo baja influencia ambiental, ya que la mayor parte de la variabilidad observada es debida a causas genéticas tal como se reportó previamente (Hosamani et al., 2010).

Debido a que se hallaron individuos con altos valores de sólidos totales en las poblaciones analizadas, es posible predecir que estos materiales podrían servir para planes de mejoramiento tendientes a mejorar la vida poscosecha de la cebolla, ya que el contenido de materia seca está directamente relacionado la vida poscosecha de la cebolla (Fosket & Peterson, 1950).

#### **2.4.4. Piruvato**

Analizando las distribuciones de frecuencia y los bajos valores de asimetría obtenidos para el contenido de PV se puede inferir la herencia cuantitativa de este carácter y la acción génica preponderante aditiva tal como fue reportado previamente por Pal & Singh (1988), Lin (1995) y Simon (1995). Además, se encontraron 10 de 15 poblaciones con asimetrías positivas, lo que indicaría una mayor frecuencia de valores de PV bajos, lo que también concuerda con la dominancia para bajo contenido de piruvato reportada por Simon (1995). Por otro lado, la existencia de individuos con segregación transgresiva indica la existencia de combinaciones alélicas en los individuos  $F_2$  que no se encuentran representadas en las variedades parentales. También es interesante indicar que todos los individuos segregantes tuvieron valores de PV menores a dos desviaciones respecto del padre de menor contenido en 13 de los 15 cruzamientos analizados, lo que también concuerda con la dominancia para bajo contenido de piruvato reportada por Simon (1995). La heredabilidad en sentido amplio del contenido de piruvato fue en todos los cruzamientos analizados superior al 62%, lo que está en congruencia con las  $H^2$  reportadas para PV por Lin (1995) y Simon (1995) que fueron de 0,48 a 0,7 y también con las heredabilidades en sentido estricto reportadas por Wall (1996) que fueron de 0,25 a 0,53. La existencia de individuos  $F_2$  con valores de piruvato menores a 3,5  $\mu\text{mol/g}$ , que de acuerdo a Mallor (2011) serían consideradas cebollas muy suaves o extra dulces, serían muy interesantes a la hora de seleccionar cebollas con estas características, como podría ser, por ejemplo para uso en fresco, en ensaladas o en hamburguesas, tal como lo propuso Platenius (1941).

#### **2.4.5. Tiosulfatos**

El histograma para TS del cruzamiento 2143 sugiere una acción poligénica, pero de pocos genes, ya que se obtuvo una distribución continua consistente con una distribución

poligénica, pero con una marcada asimetría positiva, es decir con una frecuencia de valores bajos de TS muy alta. Esta asimetría podría ser explicada considerando la relación estequiométrica entre los tiosulfatos y la pungencia en cebolla ya que son producidos en la misma reacción (Lancaster & Boland, 1990) y para el contenido de piruvato, Simon (1995) reportó que podría estar determinado por pocos genes ya que a pesar de ser un carácter cuantitativo, su herencia es fácilmente explicada por un modelo simple de aditividad-dominancia. Otra posible explicación a la marcada asimetría positiva observada en la distribución sería un efecto dominante de bajo TS sobre alto TS. Por otro lado, se encontraron individuos con segregación transgresiva, lo que indica una acción complementaria de los alelos intervinientes en este carácter y también indica la existencia de combinaciones alélicas en los individuos  $F_2$  que no se encuentran representadas en las variedades parentales. En estudios futuros, sería interesante estudiar la herencia de los TS en otras poblaciones y en otros ambientes, con diseños experimentales adecuados que permitan estudiar las distintas acciones génicas intervinientes en este carácter.

#### **2.4.6. Polifenoles totales**

El contenido de PTs se distribuyó de acuerdo a una distribución cuantitativa lo que indica una herencia poligénica. También se obtuvo una asimetría positiva, lo que podría indicar acciones génicas dominantes entre los alelos intervinientes. También se encontraron individuos con segregación transgresiva, lo que indica la existencia de combinaciones alélicas en los individuos  $F_2$  que no se encuentran representadas en las variedades parentales. Por otro lado, los altos valores de  $H^2$  del contenido de PTs obtenidos en todos los cruzamientos analizados indican que es posible seleccionar por PTs teniendo baja influencia ambiental, ya que la mayor parte de la variabilidad observada es debida a causas genéticas. Bravo (2009) reportó que la presencia de polifenoles en plantas está determinado por factores genéticos y ambientales, otros factores como la germinación, grado de madurez, variabilidad, procesamiento y almacenamiento también pueden influir en el contenido de PTs, esto no parece estar en concordancia con el valor alto de heredabilidad encontrado en el presente reporte, pero esto podría deberse a que la población analizada se cultivó en un ambiente uniforme. En estudios futuros sería interesante estudiar la arquitectura genética del contenido de polifenoles en diferentes ambientes y poblaciones.

#### **2.4.7. Flavonoides**

Los flavonoides fueron, al igual que los tiosulfatos, uno de los caracteres que más variaron indicando una gran variabilidad genética en el cruzamiento analizado. También se observó una asimetría positiva marcada para el contenido de Flavonoides lo que indicaría dominancia para bajo Flavonoides pero no la acción de pocos genes, ya que el contenido de polifenoles se distribuyó de acuerdo a un carácter poligénico consistente con una distribución normal estándar. Además se determinó la heredabilidad en sentido amplio del contenido de flavonoides y se obtuvo un valor moderado de 0,52, menor al valor de  $H^2$  obtenido para polifenoles totales, lo que estaría de acuerdo a reportes previos que indican que los flavonoides son sintetizados en respuesta a condiciones de estrés (Berhow, 1998) y por lo tanto, son más influenciados por el ambiente que los polifenoles totales. También se encontraron individuos con segregación transgresiva, lo que indica la existencia de combinaciones alélicas en los individuos  $F_2$  que no se encuentran representadas en las variedades parentales.

#### **2.4.8. Carbohidratos**

Considerando a los carbohidratos en conjunto, esto es sumando el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructooligosacáridos, se obtiene una distribución continua y ajustándose al modelo multigénico. Al considerar cada compuesto en forma individual, las distribuciones son diferentes. Para rafinosa y FOS las distribuciones son aproximadamente simétricas y continuas según un modelo multigénico, pero para el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa, la distribución resulta asimétrica que respondería a un modelo de pocos genes. En shallot, se han reportados dos zonas cromosómicas en dos cromosomas distintos que dirigen la síntesis de glucosa y fructosa (Hang, Shigyo, Yaguchi, Yamauchi, & Tashiro, 2004), también en tomate se ha reportado la acción de un locus de efecto mayor como responsable de la relación fructosa/glucosa (Levin, Gilboa, Yeselson, Shen, & Schaffer, 2000). McCallum (2006) reportó distribuciones para contenido de glucosa y fructosa en poblaciones  $F_2$  altamente asimétricas y se ajustaron a un modelo de herencia bimodal. Por otro lado, es interesante destacar que en el presente trabajo el contenido de fructooligosacáridos se ajustó a un modelo multigénico, presentando una distribución simétrica, pero McCallum (2006) encontró una distribución bimodal congruente con una

herencia de un gen mayor para el contenido total de carbohidratos. Mccallum (2006) también encontró distribuciones asimétricas hacia alto contenido de fructanos, lo cual no coincide con las asimetrías hacia abajo contenido de fructanos halladas en el presente trabajo. Estas discrepancias podrían deberse al bajo número de muestras de este cruzamiento en donde se analizaron carbohidratos en el presente trabajo (50 muestras analizadas). Respecto de los análisis de correlación, Mccallum (2006) reportó correlaciones negativas entre azúcares reductores y fructanos, coincidentes con los valores de correlación reportados en el presente trabajo. La heredabilidad en sentido amplio para contenido de FOS resultó ser del 97% coincidente con las  $H^2$  reportadas por Mccallum (2006) para este carácter que fueron de 94 al 95%. Esto sugiere que la selección para alto contenido de fructanos sería efectiva ya que la variabilidad está casi totalmente explicada por causas genéticas, esta baja influencia ambiental sobre el contenido de carbohidratos también fue hallada por Kahane (2001). Finalmente, se ha propuesto que la herencia de carbohidratos en cebolla está determinada por pocos genes de efecto mayor, pero las interacciones epistáticas también estarían presentes, lo que en ciertos casos desviaría la segregación hacia una herencia poligénica. Debido a que la herencia del contenido de carbohidratos es alta, es probable que el mejoramiento para este carácter se desarrolle de manera rápida y eficiente (McCallum et al., 2006).

#### **2.4.9. Actividad antiplaquetaria**

Esta variable tomó valores desde negativos a 100%, esto indica que existen diferencias marcadas en el contenido de compuestos antiagregantes en cada individuo de la población  $F_2$ . El valor medio para ambos donantes fue cercano a 50%, lo que indica que la dosis escogida fue adecuada ya que permite comparaciones con trabajos previos en los que se ha usado la  $IC_{50}$  (dosis mínima necesaria para inhibir el 50% de la agregación). Además la distribución de frecuencias para el donante 1 fue bastante simétrica, pero para el donantes 2 resultó asimétrica hacia valores altos, lo que indica que este donante es más sensible a los compuestos antiagregantes. Estas distribuciones también permiten inferir un control poligénico debido a que se acerca a una distribución normal. Esto está en congruencia con los resultados de (C R Galmarini et al., 2001) que encontró 2 QTL (loci de caracteres cuantitativos) en dos grupos de ligamiento distintos que explicaban juntos el 40% de la

variación observada, y otros dos posibles QTL (con menor significancia estadística) en otros grupos de ligamiento. Esto indica que hay varias regiones cromosómicas con genes responsables de la actividad antiagregante en cebolla, tal cual indican los histogramas aquí expuestos. Por otro lado, los valores de heredabilidad en sentido amplio para actividad antiplaquetaria obtenidos en el presente trabajo de 81 al 94% son levemente superiores a los hallados por Galmarini (2001) que fueron de 36 al 54% probablemente debido a una menor variación ambiental en nuestros datos, ya que tanto el cruzamiento 2143 como las variedades parentales fueron cultivadas en la misma parcela experimental, en cambio, Galmarini trabajó en 2 localidades y en 2 años consecutivos. Esta mayor varianza ambiental obtenida por Galmarini (2001) afectaría la varianza fenotípica aumentándola y disminuyendo en consecuencia la heredabilidad.

Por otro lado, solo para un donante se encontraron individuos con segregación transgresiva, lo que está también en concordancia con los obtenidos por Galmarini (2001), pero es importante destacar que los valores de AAIV no dependen solo del contenido de compuestos antiagregantes presentes en cada individuo, sino que depende también de la reacción del donante a cada compuesto involucrado. De hecho (Briggs, Xiao, Parkin, Shen, & Goldman, 2000) encontró que cada tiosulfonato poseía un efecto diferencial respecto de la fuerza antiagregante y que existían también interacciones donante-inhibición plaquetaria, lo que sugiere que esta variable debería analizarse en varios donantes. En conclusión, nuestros resultados indican que la actividad antiplaquetaria en cebolla se ajusta a una herencia poligénica, presentando acciones predominantemente aditivas aunque la acción génica de dominancia también está implicada, y presentando heredabilidades medias a altas. Esto último sugiere que la actividad antiplaquetaria es cultivar dependiente, tal como previamente reportó Goldman (1995).

## **2.5. Conclusiones**

Los valores de variabilidad encontrados para los caracteres estudiados sugieren que existen diferencias importantes tanto en los padres como en los individuos  $F_2$  para los caracteres en

estudio y debido a los valores medios a altos de heredabilidad hallados, es posible inferir también que parte de esta variación observada es heredable. La heredabilidad de un carácter es de importancia para el mejorador ya que define la efectividad de la selección y permite escoger el mejor método de selección para eficientizar la selección (Buso & Costa, 1979).

La existencia de segregaciones tipo transgresivas para los caracteres peso, sólidos solubles, piruvato, tiosulfatos, carbohidratos, flavonoides, polifenoles y actividad antiplaquetaria es interesante para los planes de mejoramiento tendientes a lograr líneas o variedades que mejoren la oferta existente, pero no es una excepción en el estudio de caracteres cuantitativos. (Rieseberg et al., 1999) encontró que la segregación transgresiva es bastante frecuente y en el 91% de los caracteres cuantitativos estudiados presentaron al menos un individuo con este tipo de segregación. Encontró además que la segregación transgresiva ocurre más frecuentemente en cruzamientos intraespecíficos que involucran a materiales endogámicos y en poblaciones de especies de plantas domesticadas, siendo menos frecuente, en contraposición, en cruzamientos interespecíficos que involucran a materiales no emparentados y en poblaciones naturales de especies silvestres.

Por otro lado, la existencia de correlaciones fenotípicas positivas estadísticamente significativas entre sólidos, tiosulfatos y actividad antiplaquetaria indican que es posible desarrollar variedades de cebollas suaves –poco pungentes- con alto valor funcional. Pero la correlación negativa entre los caracteres previos y el peso sugieren una asociación entre cebollas de alto valor antiplaquetario de tamaños pequeños difícil de romper.

### **CAPÍTULO 3**

#### **Desarrollo y evaluación de marcadores moleculares microsatélites (SSRs) para ajo y cebolla.\***

\* Trabajo desarrollado en colaboración con la Ing. Karina Barboza Rojas (KBR).

---

KBR analizó las secuencias nucleotídicas del NCBI bioinformaticamente, diseñó cebadores para SSRs y evaluó transferabilidad en aliáceas por electroforesis en gel de agarosa. Vanesa Beretta realizó las evaluaciones de polimorfismo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en accesiones genéticamente diversas de ajo y cebolla y en poblaciones F<sub>2</sub> de cebolla.

### 3.1. Introducción

Muchos caracteres importantes como el rendimiento, el contenido de compuestos benéficos para la salud y la resistencia a algunas enfermedades están controlados por múltiples genes y se conocen como caracteres cuantitativos o poligénicos. Las regiones cromosómicas que contienen genes asociados a un carácter cuantitativo se denominan loci de caracteres cuantitativos (QTL; por “Quantitative Trait Loci”). La identificación de QTL requiere del análisis conjunto de datos fenotípicos en una población genéticamente estructurada (por ejemplo, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, retrocruzas) segregante para el carácter de interés y un mapa de ligamiento (“mapa genético”) basado en marcadores moleculares construido a partir de la misma población segregante.

Uno de los principales usos de los marcadores moleculares ha sido la construcción de mapas de ligamiento (Collard et al., 2005). Los mapas de ligamiento han permitido identificar regiones cromosómicas que contienen genes simples y QTL (Mohan et al., 1997). Los marcadores moleculares que están estrechamente ligados a genes de importancia agronómica pueden servir como herramienta para la ‘selección asistida por marcadores’ (SAM) en programas de mejoramiento (Ribaut y Hoisington, 1998). La selección asistida por marcadores consiste en evaluar la presencia/ausencia de un marcador para predecir fenotipos de un carácter de interés, facilitando y acelerando las etapas de selección en los programas de mejoramiento genético (Collard, et al. 2005).

Uno de los marcadores más utilizados en la actualidad son los microsatélites o ‘SSRs’ (por “simple sequence repeats”) que son secuencias de ADN repetitivas compuestas de motivos cortos dispuestos en tándem (por ej., ATATATATATATAT...). En base al número de bases nucleotídicas en el motivo básico, los SSRs pueden ser di- [e.g., ATATATATATAT = (AT)<sub>6</sub>], tri- [e.g., ATGATGATGATG = (ATG)<sub>4</sub>], tetra- [CGTTCGTTTCGTT = (CGTT)<sub>3</sub>], penta- o hexanucleotidos. El número de veces que el motivo básico se encuentra repetido en el SSR se correlaciona positivamente con el grado de polimorfismo del marcador [i.e., SSRs con mayor número de repeticiones, por ejemplo (AT)<sub>20</sub>, suelen ser más polimórficos que SSRs con bajo número de repeticiones (AT)<sub>6</sub>] (Cavagnaro et al. 2011). Esto es importante para su potencial utilización en SAM. Los marcadores SSRs tienen las ventajas de ser codominantes, neutros, uniformemente distribuidos en el genoma y altamente

polimórficos (Mahajan et al., 2012). Los marcadores microsatélites representan herramientas ideales para el mapeo genético y detección de QTL.

La disponibilidad de marcadores SSRs polimórficos en las poblaciones F<sub>2</sub> de cebolla segregantes para actividad antiplaquetaria y contenido de compuestos bioactivos (Capítulo 2 de esta tesis) permitiría su uso para la detección y mapeo de QTL para estos caracteres, y su posterior aprovechamiento en SAM.

Las especies del género *Allium* poseen genomas enormes (comparado con otras especies de plantas), con tamaños que varían entre 10-20 Gb (Ricroch et al., 2005). Esto, asociado a una gran cantidad de secuencias repetitivas en sus genomas, ha complicado los estudios genómicos y ha imposibilitado la secuenciación de sus genomas (MacCallum et al., 2012). El desarrollo de mapas genéticos en aliáceas se ha visto limitado por la dificultad para obtener cruzamientos sexuales y poblaciones segregantes (por ej., en ajo), por los altos niveles de heterocigocidad y secuencias repetitivas que poseen la mayoría de la especies y por la escasez de secuencias disponibles en las bases de datos públicas (McCallum et al., 2007).

Se han desarrollado pocos marcadores SSRs en aliáceas. En cebolla y cebolla de verdeo se han reportado cerca de 200 marcadores SSRs (Kuhl et al., 2004; Fisher et al., 2000; Tsukazaki et al 2008; Martin et al., 2005; Baldwin et al., 2012), mientras que en ajo hay ~100, desarrollados a partir de secuencia genómicas y transcriptómicas (EST) (Lee et al 2011; Cunha et al., 2012; Ma et al., 2009; Chnad et al., 2015). El desarrollo de marcadores SSRs transferibles entre especies de aliáceas, principalmente entre ajo y cebolla, facilitaría encarar estudios genéticos comparativos entre las hortalizas de *Allium* más importantes.

El objetivo del presente capítulo fue desarrollar y evaluar nuevos marcadores moleculares microsatélites que sirvan como herramienta para asistir planes de mejoramiento nacionales de cebolla, ajo y otras aliáceas. En particular, interesa su potencial utilización para la identificación y mapeo de QTL en las poblaciones de cebolla evaluadas

fenotípicamente en el capítulo 2 de esta tesis. La identificación de marcadores SSRs de uso común en ajo y cebolla permitiría la comparación de mapas de cebolla con QTL previamente mapeados en ajo para estos caracteres (Cavagnaro, 2007).

## **3.2. Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Se evaluaron los marcadores desarrollados en 16 accesiones de aliáceas; 4 accesiones de ajo (Castaño, Nieve INTA, Rubí INTA y Morado INTA), 4 accesiones de cebolla (Morada, Refinta 20, Navideña INTA y Valcatorce INTA, una accesión de ajo elefante (*A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*), una accesión de cebolla de verdeo (*A. fistulosum* L.), una accesión de cebollino chino (*A. tuberosum*), una accesión de puerro (*A. ampeloprasum* var. *porrum*), una accesión de shallot (*A. cepa* L. var. *aggregatum*), una accesión de *A. vineale*, una accesión de ciboulette (*A. schoenoprasum*) provenientes del banco de germoplasma del Instituto nacional de Tecnología agropecuaria (INTA) E.E.A. La Consulta, Mendoza, Argentina, y *Tulbaghia violácea*, una aliácea ornamental. Además, los marcadores SSRs se evaluaron en muestras (seis individuos por población) de dos poblaciones segregantes F<sub>2</sub> de cebolla, derivadas de cruzamientos entre Refinta 20 x Angaco INTA y Refinta 20 x Navideña INTA. Estas poblaciones se evaluaron fenotípicamente en el capítulo 2 de la presente tesis.

### **3.2.1 Desarrollo y evaluación de marcadores SSRs**

Todas las secuencias utilizadas para diseñar cebadores fueron descargadas de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se utilizaron secuencias transcritas (EST) y genómicas (GSS) de ajo (*A. sativum*) y cebolla (*A. cepa*). Las secuencias detalladas en la tabla 7 se utilizaron para diseñar 153 pares de primers flanqueando los SSRs (Tabla 10). También se evaluaron primers publicados previamente (Cunha et al., 2012; KyungHo et al., 2009; Kuhl et al., 2004) (Tablas 8 y 9).

**Tabla 7.** Secuencias utilizadas para el desarrollo de nuevos primers.

| Especie | Fuente | Nº de accesoión       | Tipo      | Tamaño (Mb) | Nº de secuencias analizadas |
|---------|--------|-----------------------|-----------|-------------|-----------------------------|
| Ajo     | NCBI   | PRJNA158177           | EST       | 29,4        | 79.191                      |
| Cebolla | NCBI   | GAAN01000001          | EST       | 43.1        | 33161                       |
| Cebolla | NCBI   | Todas las disponibles | Genómicas | 5.1         | 4686                        |

Para la detección de secuencias microsatélites a partir de las secuencias descritas en la tabla 7 se utilizó el programa MISA (Microsatellite identification tool) (Thiel et al., 2003). Se consideraron microsatélites con una longitud mínima de 12 para los di a tetranucleótidos, 15 para los pentanucleótidos, 18 para los hexanucleótidos y 21 para heptanucleótidos. Luego de identificar los microsatélites, se diseñaron primers en las regiones flanqueantes a estos utilizando el programa Primer3 (v. 4.0.0) (Untergasser et al., 2012). Se diseñaron cebadores de 18 a 24 bases de una longitud tal que produzcan amplicones de tamaño esperado de 200 a 500 pb, con una T<sub>m</sub> (temperatura de desnaturalización) de 57 a 62 °C y un % GC (porcentaje de guaninia-citosina) de 40 a 70%.

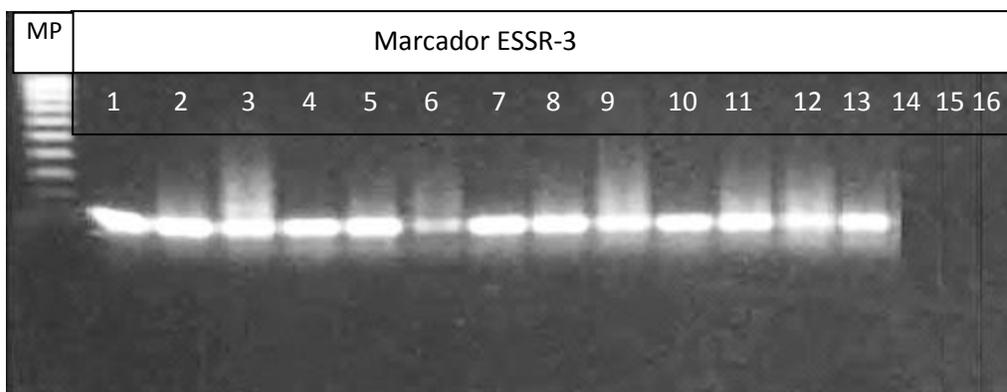
### 3.3.2. Extracción de ADN y Condiciones de amplificación

De las 16 accesiones de aliáceas y de los individuos F<sub>2</sub> de las poblaciones segregantes se extrajo ADN genómico utilizando el método CTAB de Murray et al. (1980). Para ello se utilizaron hojas jóvenes que se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se molieron para su extracción.

Las condiciones de amplificación (PCR) fueron las siguientes: se utilizó un volumen final de 20 µl que contenía 11,3 µl de agua destilada ultrapura, 3,5 µl de buffer de PCR 10x, 1,6 µl de dNTPs (2,5M de cada dNTP) 0,8 µl de cada primer (a partir de una concentración de 5 µM), 0,3 µl de Taq polimerasa a 5 U/ µl y 2,5 µl de ADN genómico (~ 50 ng ADN). El programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 seg, seguido por 40 ciclos de 94°C por 45 seg, temperatura de hibridación dependiente de

cada primers por 30 segundos y 1 min de elongación a 72°C, seguido de un ciclo final a 72°C por cinco minutos.

Se evaluó presencia/ausencia de amplicones de tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, que se corrieron por 2 h a 90 voltios. Un ejemplo de 2 marcadores corridos en un gel de agarosa al 3% puede verse en la figura 34.



**Figura 34.** Gel de agarosa al 3%. Se verifica la amplificación diferencial de un marcador en 16 accesiones de aliáceas: (calles 1-4) 4 accesiones de ajo (Castaño, Nieve INTA, Rubí INTA y Morado INTA), (calles 5-8) 4 accesiones de cebolla (Morada, Refinta 20, Navideña INTA y Valcatorce INTA), (calle 9) una accesión de ajo elefante (*A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*), (calle 10) una accesión de cebolla de verdeo (*A. fistulosum* L.), (calle 11) una accesión de cebollino chino (*A. tuberosum*) y (calle 12) una accesión de puerro (*A. ampeloprasum* var. *porrum*), (calle 13) una accesión de shallot (*A. cepa* L. var. *Aggregatum*), en las últimas 3 (calle 14, 15 y 16) (*A. vineale*, *A. schoenoprasum* y *Thulbagia violácea*) especies no amplifica. MP: marcador de peso.

### 3.2.3. Análisis de transferibilidad entre especies

Se evaluó la transferibilidad de los 153 pares de cebadores diseñados sobre secuencias de ajo y cebolla (Tabla 7) en 16 accesiones correspondientes a 10 especies de aliáceas. Adicionalmente, se evaluaron en las 16 accesiones 112 pares de cebadores para SSRs de ajo y cebolla publicados previamente (Tablas 8 y 9). Como marcador transferible, se consideró aquel que amplificaba un producto de PCR de tamaño esperado en al menos una especie distinta a la especie a partir de la cual fue desarrollado (ajo o cebolla). Un marcador se consideró 100% transferible si amplificaba en todas las accesiones y especies ensayadas.

### 3.2.4. Análisis de polimorfismo de los marcadores

Se evaluó el polimorfismo de aquellos marcadores que previamente resultaron positivos en agarosa, por electroforesis en geles de poliacrilamida, debido a la mayor resolución que poseen los geles de poliacrilamida respecto a los primeros. Para la electroforesis en acrilamida se siguió el protocolo de Marfil et al. (2006). Se utilizó una cámara de electroforesis modelo Sequi-Gen® GT System (Bio-Rad). Las condiciones de electroforesis en poliacrilamida fueron las siguientes: se utilizaron geles de 30 x 40 cm, de 0.4mm de espesor al 6% de acrilamida y 4% de relación acrilamida: bisacrilamida (19:1) en urea 6M. Se usó TBE (Tris 100mM, ácido bórico 83mM, y EDTA 0,5M pH8) como buffer de corrida. La electroforesis se realizó a 1500v, 60w y 40 mA por 3 horas. La tinción se realizó con nitrato de plata según Beidler et al. 1982, modificado por Posso Duque et al., (2008).

Se evaluó el nivel y tipo de polimorfismo, considerando los marcadores como dominante (presencia/ ausencia), o marcador codominante (permite identificar ambos alelos) en cuatro accesiones de ajo y cuatro de cebolla (las mismas accesiones de cada especie en las que se evaluó transferibilidad por electroforesis en agarosa). Además se evaluó el polimorfismo en 2 poblaciones segregantes de cebolla tipo F<sub>2</sub> denominadas “RxA” (Refinta 20 x Angaco INTA) y “RxN” (Refinta 20 x Navideña INTA), evaluadas fenotípicamente en el capítulo anterior.

**Tabla 8.** Cebadores de cebolla evaluados publicados previamente\*

| Primer | tamaño | Primer Forward (5'-3')       | Primer reverso (5'-3')     | Tamaño esperado (bp) | Nº de accesión (NCBI) |
|--------|--------|------------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|
| ACM003 | 12     | ATCGGCCATGGCGTCTA<br>A       | GGCAGTTTCGGAAGTCCA<br>G    | 207                  | BQ58008<br>8          |
| ACM004 | 26     | TCGTTCTTTAGAACACGT<br>TAGGAA | TGTCGGCGGATATAGTGA<br>CA   | 214                  | BI095629              |
| ACM005 | 14     | CGCTTCAGCAGTGAGTT<br>GTT     | TGTTGTCCGATACAGAGTT<br>GCT | 205                  | BI095610              |
| ACM006 | 21     | GCAGTTCTCCCTTTGTAA<br>AATCA  | GTGATGGATGAGTGGATG<br>GA   | 201                  | BQ58018<br>4          |
| ACM00  | 18     | GCCGGAAGAGGAGAAG             | CATAATTCCCATGGCTTTG        | 214                  | BQ58022               |

|        |    |                            |                            |     |              |
|--------|----|----------------------------|----------------------------|-----|--------------|
| 8      |    | AAGT                       | C                          |     | 1            |
| ACM009 | 18 | GCAACGGTAGAAGAACC<br>TGC   | AACCTCTTTTGGTGCCTCC<br>T   | 255 | CF43667<br>8 |
| ACM013 | 27 | CAACCTCGAAGAACTCA<br>CCG   | GCGAATCTTGTTTTTGGGA<br>A   | 176 | CF43939<br>8 |
| ACM014 | 15 | ACCACCAGCCTCACAAA<br>AAG   | GGCCTTTTGCCAACAGTA<br>GA   | 225 | CF43543<br>2 |
| ACM015 | 15 | ACCAAAACAGCCTTCAC<br>CAC   | TTTTTGAGTGGAGATTGG<br>GG   | 272 | CF43789<br>4 |
| ACM016 | 12 | ATGGAAGCCTCGGGTCT<br>G     | GCCGTAAGTCGAGGGTAG<br>AA   | -   | CF45166<br>2 |
| ACM018 | 18 | GGGGAATGGTGGAGAAT<br>AGA   | AACAGAGGCAAGAGGAG<br>CG    | 274 | CF43899<br>5 |
| ACM019 | 15 | GCTCCCAACTGCTATCC<br>CTA   | TCCCTCGCTCTATCTTCCG        | 280 | CF44703<br>0 |
| ACM021 | 15 | AAAACCCTCAACATCTC<br>ACTCC | TCTCTTCTCCTCGTCCTG<br>C    | -   | CF44560<br>0 |
| ACM023 | 15 | CCCACTCGCTTTCATACT<br>GC   | CCACTCCTCTTACTGCTTC<br>CC  | 238 | CF44894<br>1 |
| ACM024 | 30 | CCCCATTTTCTTCATTTT<br>CTCA | TGCTGTTGCTGTTGTTGTT<br>G   | -   | CF44687<br>3 |
| ACM031 | 12 | CCAAAGCCGACCTCCTC<br>T     | CGTGGGAAGACCAAGGGT         | 190 | CF43474<br>4 |
| ACM032 | 18 | ATAGCGACGATGAGGAC<br>GAT   | CCCTGGCTTTCTTTTCCAT<br>A   | 156 | CF43479<br>1 |
| ACM033 | 15 | CCTTCTCCCCATTCTCTT<br>CC   | ATCATCGTCCTCGTCCTCA<br>T   | 252 | CF43949<br>8 |
| ACM034 | 15 | CACCTTGACCGTGAAG<br>AAC    | CTGCTGTTTGGAGATGTG<br>GA   | 249 | CF43941<br>6 |
| ACM036 | 15 | AAAACATTGCGGAGAAA<br>GC    | TCATCAACATCACAAGAA<br>CACA | 280 | CF43950<br>2 |
| ACM037 | 21 | GACCGACTCCAAAGCCA<br>TA    | CTCTCCCGTTTCTCAAATG<br>C   | 269 | CF43892<br>5 |
| ACM038 | 15 | ATGCCAGACTACGACAA<br>CGA   | ACGCCTACCAACCTTCAA<br>TG   | 210 | CF43908<br>6 |
| ACM039 | 15 | TGGGTCAGCAAGAGGGT<br>G     | CCAGTGTGTGTAATGCGG<br>TC   | 255 | CF43961<br>8 |

|             |    |                             |                              |     |              |
|-------------|----|-----------------------------|------------------------------|-----|--------------|
| ACM04<br>0  | 30 | TATCCGACACTTGC<br>GACCT     | GCTCAACATTATTAC<br>CTGC      | 194 | CF43690<br>2 |
| ACM04<br>1  | 15 | CCAATGATGGAAAG<br>GTGAA     | CTCAGAATCGTCG<br>TCCTCG      | 197 | CF43955<br>8 |
| ACM04<br>2  | 15 | TCATCAACACCAAC<br>ACAAC     | TCTGTGAACCTCCT<br>CAAGC      | 274 | CF44696<br>9 |
| ACM04<br>4  | 15 | GTCAAAGGCGAGAAA<br>GTGCG    | CCCCAAAACAATCAT<br>CCTCA     | -   | CF44407<br>2 |
| ACM04<br>5  | 12 | AAAACGAAGCAACAAA<br>CAAAA   | CGACGAAGGTCATA<br>AGTAGGC    | -   | CF45037<br>2 |
| ACM04<br>7  | 18 | CATTCATCTACTCTCT<br>TTCAGCC | GAGGTCATTGGTTT<br>GGTTAGC    | -   | CF44752<br>2 |
| ACM04<br>9  | 18 | TAACGACATCCCTAC<br>CGC      | GCTTCTTCTTCCACT<br>TTTCG     | 159 | CF44772<br>8 |
| ACM05<br>0  | 35 | CGGTTCTCTGTTTGG<br>GACAA    | CCGTTTCGGCTACCT<br>TGTA      | 277 | CF44782<br>8 |
| ACM05<br>2  | 21 | CAGCAGCAACAAAGA<br>ATGC     | CTGGGGAGAATGAGA<br>AGCAC     | 237 | CF44865<br>4 |
| ACM05<br>3  | 18 | CTGGGCTCTTTTGTTC<br>ATCC    | ATGGTGGAGGTATGT<br>GAGGG     | 260 | CF44903<br>1 |
| ACM05<br>4  | 18 | GAGTGAGAGGGGAAAT<br>GGAA    | AAAGATGGTTTGTG<br>TTGGTGGC   | 221 | CF43507<br>3 |
| ACM05<br>6  | 12 | TGTGTGGAAATCAGTAG<br>GCT    | ATGACAACAGAACCG<br>CTGG      | 242 | CF44874<br>0 |
| ACM05<br>8  | 22 | GGAGTCACACAACAGAA<br>ACACAA | AAGAAGGAATAGAGAT<br>GTAGCCGA | 245 | CF43577<br>1 |
| ACM06<br>0  | 45 | ATCAGCAGCCTTCCCAG<br>TAA    | ATCACACCCGCAAAGAA<br>T       | 209 | CF43598<br>5 |
| ACM06<br>1  | 18 | GCGTTTGCTGAGAGATT<br>AGGA   | TTTCTTGCTGATGAT<br>GCTGC     | -   | CF44518<br>6 |
| ACM06<br>3  | 12 | TGCCAAGGTGCATAAAA<br>ACA    | TCACGCACATACCTCT<br>CTCTGG   | -   | CF43931<br>8 |
| ACM06<br>5  | 48 | GCTCTGATGGAGGATGG<br>TTC    | TTCTTGCCATCTTTG<br>TCGGT     | 197 | CF44932<br>8 |
| ACM06<br>6  | 16 | CTCCCCGCAACCAGTAA<br>TAA    | GCTTGGGTTTTGTTTCT<br>CCA     | 186 | CF43720<br>9 |
| ACM06<br>12 | 12 | CGAAGGTGAAGGTGTAC           | CAAATGGCTGCAATAAGC           | 261 | CF45046      |

|        |    |                               |                            |     |              |
|--------|----|-------------------------------|----------------------------|-----|--------------|
| 8      |    | GGT                           | AA                         |     | 3            |
| ACM069 | 12 | TTCTGCGCTCTTCCCAGT<br>AT      | CAAGCGGTTTGAAAAAGG<br>AG   | 189 | CF44982<br>5 |
| ACM071 | 20 | TCTCATTTCAACTTTCTA<br>CCTATCC | CTGACATTTGCTCGACTGG<br>A   | -   | CF44959<br>5 |
| ACM072 | 12 | TGAATTCAGGCCAAACA<br>TGA      | GAGGAAAGCCTGAAGAGT<br>AGCA | 238 | CF44158<br>4 |
| ACM077 | 15 | AAATTATGGGCCACCTC<br>CTC      | CAAGATTGTCGACTCCCC<br>AT   | 140 | CF44596<br>0 |
| ACM080 | 18 | GCATTATGCAGTAACGG<br>GCT      | GCAGCAGCATTTGATTGA<br>AC   | 196 | CF44906<br>8 |
| ACM081 | 18 | CTGAAAAGAAACCCGCA<br>GAG      | TCAGGATGCACTTGCTTCA<br>G   | 208 | CF44799<br>8 |
| ACM091 | 30 | TCTCCTCCTCTAACCAGC<br>CA      | GGTGCTCCAGTTGAGCTTT<br>C   | 184 | CF44052<br>2 |
| ACM093 | 21 | GCCAACAGTTTTTCGTAA<br>GTTGA   | ATTCTCTTCGGCTTTCGTG<br>A   | -   | CF44258<br>5 |
| ACM096 | 15 | TGTGGGCAATTCACGTT<br>ATG      | AAAAGTTGTGAACGGCAT<br>CC   | 260 | CF44619<br>1 |
| ACM101 | 15 | CCTTTGCTAACCAAATC<br>CGA      | CTTGTTGAGAAGGAGGAC<br>GC   | 217 | CF44342<br>5 |
| ACM104 | 18 | ACGATTGTTTAATCGTCC<br>GC      | TATTCCAGCAGCAACTGT<br>CG   | 187 | CF44422<br>1 |
| ACM107 | 15 | CCTTCATTCCCAAAGCA<br>CAT      | GCGATAAAGAGGGACAGC<br>AG   | 213 | CF44983<br>7 |
| ACM112 | 15 | TTCCCAACAAACGTTCA<br>TCA      | GTGAAGGGAGAGCAGTGG<br>AG   | 180 | CF45000<br>8 |
| ACM115 | 18 | TCCATCTATGCATCTGCC<br>AC      | CTATTCTTCCACTGGGGCA<br>A   | 221 | CF44152<br>5 |
| ACM121 | 15 | GCAAACCTCATATAGTGC<br>CGC     | GAACCGATTCTACGAGCA<br>GC   | 147 | CF44194<br>7 |
| ACM001 | 15 | CATCTCCATCGCTATCAT<br>CG      | ACATTTCCAGTTGCCTCCA<br>A   | 197 | BQ58023<br>8 |
| ACM002 | 15 | CCAAAGACTCGTCTGCG<br>AAC      | TCGCCAACTTAGACGATT<br>CC   | 199 | BQ58025<br>8 |
| ACM007 | 12 | ATCGGCCATGGCGTCTA<br>A        | GGCAGTTTCGGAAGTCCA<br>G    | 207 | BQ58018<br>0 |

|        |    |                          |                                |     |          |
|--------|----|--------------------------|--------------------------------|-----|----------|
| ACM010 | 18 | AAATCGTTCGGATTTGTTGC     | TATCTCGGTTGAACCCTTG<br>G       | 234 | CF447316 |
| ACM011 | 15 | ATACCAAGGGCAAGGAGCTT     | GTGATTTGTTGGCGGTCTT<br>T       | 210 | CF435744 |
| ACM012 | 18 | GGAGAAAAAGCCCGAAGAAG     | ATTCCCATAGCCTTGCTTG<br>A       | 222 | CF446939 |
| ACM017 | 15 | CCTTCTCCCAATTCTCTTCC     | CATCGTCCTCGTCCTCATC            | 250 | CF439498 |
| ACM020 | 18 | AACCTCTTTTGCTTACCGCC     | TCCCTTTCATCTGCTCTTG<br>G       | -   | CF451592 |
| ACM022 | 12 | TGAGCAAAGAACAACAACCA     | GCAAAGTAAGAAACAATA<br>AAAGAGAA | -   | CF447023 |
| ACM026 | 15 | GCAGAAATAAGTGGATGGGG     | GGAGGAGGTGGAGGAGG<br>A         | 238 | CF451716 |
| ACM027 | 16 | AAAAGATCGCCTTTTTCTTCA    | AGTGATCTATTGGGCGGATG           | -   | CF439546 |
| ACM029 | 18 | CCCACATCAACTCCATACCC     | CCAATGCCTCTGTCTAACT<br>CC      | 297 | CF434980 |
| ACM035 | 12 | CGCTAATACTCTCTTTCCTTTTCA | TTACAGAATGTGGGGTCGT<br>GT      | 130 | CF439536 |
| ACM043 | 15 | GCTCCCAACTGCTATCCCTA     | TCCCTGATTTCCACTGTCGG           | 166 | CF447030 |
| ACM046 | 27 | TCCTCGTCACCACCACAG       | TCTGAAAGGGAGTAGCGGAG           | 280 | CF446316 |
| ACM048 | 15 | TGAACACGGGAAGCAGTAAT     | TCATCCAAAGGCTCAGGCT            | 169 | CF447555 |
| ACM051 | 15 | CCACCAAATCAGCAAAAGAAA    | CATAGTCAAACACGGACGGA           | 211 | CF448670 |
| ACM055 | 15 | TTCCCAAACGAAACCTATA      | TGGCAGAGAATGAAGATTGA           | 250 | CF435216 |
| ACM062 | 15 | CTACCACAGGGTGCGGA<br>A   | TGATGACCAGAAACAGCGAG           | 190 | CF438264 |
| ACM064 | 12 | AATAAGAACACTGCGTGCCC     | TGCTACAGCCATTGACGAG            | 273 | CF445554 |
| ACM074 | 15 | CTGGAGACCCAAATCTGCAT     | CACTTGAAAACAGCGTCCAA           | 268 | CF439452 |
| ACM08  | 15 | GCGGATTGGATCATCAG        | TTCTTGATTCTCCGTTTG             | -   | CF43804  |

| 6          |    | ATT                        | G                        |     | 7            |
|------------|----|----------------------------|--------------------------|-----|--------------|
| ACM10<br>3 | 15 | CGAATTTGTAATTATCG<br>ATGGG | TCTCCTTCAGTTCTTGGCG<br>T | 266 | CF44447<br>6 |
| ACM10<br>6 | 18 | GACCCGAACCCATATTT<br>TCTC  | TTCTCGTGTGCACCTCTGA<br>C | 174 | CF44158<br>1 |
| ACM11<br>0 | 15 | GGGTATTGCGAGAAGCA<br>GAA   | GCTTTCTGGAGATTTGCGT<br>T | -   | CF44998<br>0 |
| ACM11<br>3 | 15 | ATCATTCACGTCGCCCTT<br>AG   | AGGGATCACCTGCATTTTT<br>G | 136 | CF45034<br>2 |
| ACM11<br>6 | 15 | AGCAAGAATTTAGTCCG<br>CGA   | CGAGGTGTACCTTCATCG<br>GT | 266 | CF43778<br>6 |
| ACM11<br>7 | 18 | CGCCATAGAACAAGGAG<br>AGC   | ATCTTGAAGAGCTTTGCC<br>GA | 248 | CF45158<br>3 |
| ACM11<br>8 | 18 | TAGCAGGCATCAACGAA<br>GAA   | TTCGGTTTTGGTTTCTGGT<br>C | 232 | CF44004<br>4 |
| ACM12<br>3 | 15 | AATTGCACCGGAAGAGT<br>TTG   | ATAGGGAGAGGGCGTTGA<br>AT | 237 | CF43759<br>0 |
| ACM12<br>5 | 20 | AAAAAGGGTTTTATCAG<br>TCGCA | CCGCTGTTGAAATATGGG<br>TT | 194 | CF44593<br>1 |

\*Referencia: Kuhl et al., 2004.

**Tabla 9.** Cebadores de ajo evaluados y publicados previamente\*

| Primer | Tamaño | Primer Forward (5'-3')   | Primer reverso (5'-3')   | Tamaño<br>o<br>espera<br>do (bp) | Nº de<br>accesión<br>(NCBI) |
|--------|--------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Asa04  | 42     | AGACTTTTGGAGGCTAGG<br>GC | CCCTGGTCTCTTTCAACCA<br>A | 264                              | JN08408<br>5                |
| Asa06  | 10     | GGGGTGTACATTCTCCCC<br>T  | ACCGCCTGATTTTGCATTA<br>G | 192                              | JN08408<br>6                |
| Asa07  | 14     | CTCGGAACCAACCAGCAT<br>A  | CCCAAACAAGGTAGGTCAG<br>C | 229-<br>235                      | JN08408<br>7                |
| Asa08  | 16     | TGATTGAAACGAATCCCA<br>CA | GGGGTACCTGAACCTGT<br>TA  | 209-<br>257                      | JN08408<br>8                |
| Asa10  | 14     | TTGTTGTTCTGCCATTTT       | GATCTAAGCCGAGAGAAA       | 225-                             | JN08408                     |

|                    |    |                            |                           |             |              |
|--------------------|----|----------------------------|---------------------------|-------------|--------------|
|                    |    |                            |                           | 239         | 9            |
| Asa14              | 14 | TCTATCTCGCTTCTCAGGG<br>G   | GCTGACAGAAGTAGTCTTT<br>CC | 220-<br>234 | JN08409<br>0 |
| Asa16              | 23 | CACGACTTTTCCTCCCATT<br>T   | GCTAATGTTTCATGTCCCA<br>GT | 148-<br>154 | JN08409<br>1 |
| Asa17              | 80 | TCCACGACACACACACAC<br>AC   | ATGCAGAGAATTTGGCATC<br>C  | 126-<br>196 | JN08409<br>2 |
| Asa18              | 16 | TCAAGCTCCTCCAAGTGT<br>CC   | TCGGGATATGACAGCATTT<br>G  | 254-<br>264 | JN08409<br>3 |
| Asa20              | 12 | GAAGCAGCAAAGATCCAA<br>GC   | CGTGCAGAACTTAACCTT        | 260         | JN08409<br>4 |
| Asa23              | 10 | TGGAGGGGGAAAAAGGA<br>TAG   | TGTGAAGCAAGTGGGATCA<br>A  | 271         | JN08409<br>5 |
| Asa24              | 24 | TTGTTGTGCCGAGTTCCAT<br>A   | CAGCAATTTACCAAAGCCA<br>AG | 149-<br>161 | JN08409<br>6 |
| Asa25              | 60 | GCACTTCACTTCCCCATT<br>C    | GGCGACGGTGAAGAGAGA<br>G   | 117-<br>127 | JN08409<br>7 |
| Asa27              | 44 | GGGAGAGAATGGCTTGAT<br>TG   | GGACAGCATCATCACCAC        | 127         | JN08409<br>8 |
| Asa31              | 21 | CAGAGACTAGGGCGAATG<br>G    | ATGATGATGACGACGACGA<br>G  | 237-<br>243 | JN08409<br>9 |
| Asa59              | 12 | CGCTTACTATGGGTGTGT<br>GTC  | CAAGTGGGAGACTGTTGGA<br>G  | 290         | JN08410<br>0 |
| GB-<br>ASM-<br>035 | 18 | TTGGACTGAATTCTGAAT<br>ACCT | GGGTGTGTGGTTCAAGGA        | 288-<br>302 | EU9091<br>32 |
| GB-<br>ASM-<br>040 | 50 | CACAGCAACATGCACCAT         | TGCCGGAACCTCGATATT        | 266-<br>436 | EU9091<br>33 |
| GB-<br>ASM-<br>053 | 46 | ACAAGGTCGACATCGTTT<br>G    | GGGCTTCACCTGAACACA        | 142-<br>294 | EU9091<br>34 |
| GB-<br>ASM-<br>059 | 32 | CTTGCCGGAACCTCGATAT<br>T   | CACAGCAACATGCACCAT        | 278-<br>478 | EU9091<br>35 |
| GB-<br>ASM-        | 58 | CACGCGAATCTTTCTTGG         | TGCAAAGCAATATGGCAG        | 194-<br>304 | EU9091<br>36 |

|            |    |                           |                             |             |              |
|------------|----|---------------------------|-----------------------------|-------------|--------------|
| 072        |    |                           |                             |             |              |
| GB-ASM-078 | 24 | TGTTCCAACCAGATTTAAT<br>GC | AAGTGGCGGTTGTGTCTG          | 194–<br>236 | EU9091<br>37 |
| GB-ASM-080 | 15 | AATCTCCCTCCAAAGTCC<br>C   | CCTGTATTTTGTGTAAAGC<br>ATCA | 171–<br>174 | EU9091<br>38 |
| GB-ASM-109 | 12 | GGTCTCCTCATCCACCGT        | GTGTGGGGCATGATTGAC          | 107–<br>245 | EU9091<br>39 |

\*Referencias: Cunha et al., 2012; KyungHo et al., 2009.

### 3.3. Resultados

Se realizó una búsqueda de microsatélites con seis o más unidades repetidas con una longitud total de 12 pares de bases en 79.191 secuencias transcritas no redundantes, que representaban el transcriptoma de ajo y en 37847 de cebolla, disponibles públicamente en NCBI. Se hallaron SSRs y se diseñaron 153 pares de cebadores flanqueando las secuencias microsatélites (Tabla 10).

**Tabla 10.** Características de cebadores y amplicones esperados para SSRs de ajo y cebolla

| Nom bre | Motivo repetido | Tama ño (nucle ótidos) | Com ienzo | Cebador directo (5'-3')    | Cebador reverso (5'-3')   | T m * | Tama ño esper ado (pb) | Nº de accesi ón (NCB I) |
|---------|-----------------|------------------------|-----------|----------------------------|---------------------------|-------|------------------------|-------------------------|
| GSS R-1 | (GGTTT)3        | 15                     | 484       | GCTGCTGGAGTACT<br>GTTATTCA | AGCACATGTGTGTGT<br>GGATCT | 59    | 248                    | CL76<br>6607.<br>1      |
| GSS R-2 | (TTG)9          | 27                     | 233       | GCCAATCAGTTGATT<br>ACGCTTT | AGCGTAAAAATGCA<br>AGAGTGC | 60    | 297                    | CG41<br>0149.<br>1      |
| ESSR -1 | (AGT)5          | 15                     | 150       | CAATTTTGTTCAGG<br>GATTCGTG | GGTTGGTTACTAGA<br>GAGCAGC | 58    | 343                    | FS212<br>622.1          |
| ESSR -3 | (AAAT)5         | 20                     | 406       | ACAGCATCAAACAGC<br>CCAAG   | CACAAATCCCTTGTT<br>TTCCA  | 59    | 424                    | FS212<br>598.1          |

|              |                      |    |     |                            |                             |    |     |                |
|--------------|----------------------|----|-----|----------------------------|-----------------------------|----|-----|----------------|
| ESSR<br>-14  | (TA)32               | 64 | 256 | TCAGTGAACCTTAGG<br>GGGTCT  | CCGTAATTGGTCACA<br>GTTAGGAA | 59 | 378 | FS212<br>352.1 |
| ESSR<br>-15  | (AAG)8               | 24 | 73  | CCCCTTCGGTTGTTTT<br>TCTT   | CTGGGTACGGTCGTT<br>ATTGG    | 60 | 296 | FS227<br>912.1 |
| ESSR<br>-26  | (CTGCTC)3            | 18 | 488 | GTGGTTAGGGGAACC<br>TTCAAA  | CCGCTTCCTTTACTT<br>CTTCTTC  | 59 | 346 | FS227<br>882.1 |
| ESSR<br>-46  | (GAAGAG)3(GA<br>G)7* | 36 | 110 | GGAGGACGAGGAAG<br>TCGAG    | TTAGAGATTCAGCG<br>GTGCTGT   | 59 | 275 | FS227<br>832.1 |
| ESSR<br>-48  | (AGA)8               | 24 | 406 | ATTCTGGAAACGACG<br>GCTTTA  | GCGTTGCATTATCGT<br>ACCTTC   | 59 | 384 | FS227<br>826.1 |
| ESSR<br>-49  | (AACGGC)4            | 24 | 235 | ACTCCCTCTCCAAC<br>TCCAAC   | CAAGGGTTACAAAG<br>TCGCTGA   | 59 | 379 | FS227<br>810.1 |
| ESSR<br>-50  | (AC)10               | 20 | 267 | TGAGATTCACGGGCA<br>ATTACT  | ATCCGATATCCCTTC<br>ACCATC   | 59 | 385 | FS227<br>804.1 |
| ESSR<br>-67  | (CTGCTC)4            | 24 | 357 | GCTGCTGCAGAAGAA<br>GTTGTTA | CCTCCTCGACCTTAG<br>CTTCCT   | 60 | 388 | FS227<br>738.1 |
| ESSR<br>-73  | (AGC)6               | 18 | 241 | ACAAGAGTCCGACG<br>AAACTGA  | CTATCCTTGCCCCTG<br>ACTTG    | 59 | 375 | FS226<br>526.1 |
| ESSR<br>-85  | (CATCTC)5            | 30 | 17  | CCAAAGCTCCCATCT<br>TCATC   | CGTCGGCTCTCTTAT<br>TTTGC    | 59 | 227 | FS226<br>478.1 |
| ESSR<br>-115 | (CTGCTC)3            | 18 | 317 | GTCGAAAGCGTAGCA<br>CCAGT   | AACCTCTTTTGGTGC<br>CTCCT    | 60 | 369 | FS226<br>352.1 |
| ESSR<br>-121 | (CTGCTC)3            | 18 | 351 | GTCGAAAGCGTAGCA<br>CCAGT   | TCTCGGCTTCTGCTT<br>CTTTC    | 59 | 352 | FS224<br>913.1 |
| ESSR<br>-151 | (GGT)4               | 12 | 188 | TGTTTTAGCCACCGT<br>TCTCC   | GTATCAGTGGCCAC<br>CACCA     | 60 | 264 | FS224<br>803.1 |
| ESSR<br>-156 | (AAATC)3             | 15 | 172 | CCCTACTGTGATGA<br>CTTAATGG | CTCCTCTCCAGCAAC<br>CAAAT    | 59 | 368 | FS224<br>797.1 |
| ESSR<br>-176 | (CTGCTC)4            | 24 | 354 | GTCGAAAGCGTAGCA<br>CCAGT   | TTGACATCTTCTCCA<br>GCCTCT   | 59 | 392 | FS227<br>980.1 |
| ESSR<br>-206 | (GAG)5               | 15 | 189 | GGACTCGTCTTTG<br>AATGG     | GGCCTTAGCAGTGC<br>AGACT     | 59 | 384 | FS226<br>885.1 |
| ESSR<br>-230 | (TCC)5               | 15 | 69  | TCATTGCACTCGCAA<br>ATGTC   | GGTTTCGTCGTCGGC<br>TTTAC    | 60 | 300 | FS226<br>833.1 |
| ESSR<br>-247 | (TCC)5               | 15 | 69  | GAACACCACCTCATT<br>GCATTC  | TCCGAGAAGAAGAC<br>GTACCC    | 59 | 375 | FS226<br>779.1 |
| ESSR<br>-256 | (CTT)4               | 12 | 366 | TTCTCTCCGTCTGTTT<br>CTATCC | TGAAATATTGCACGT<br>ATCTGGTG | 59 | 397 | FS226<br>761.1 |
| ESSR<br>-272 | (CTCC)3              | 12 | 163 | ACGTCTCTTCTCGT<br>CCACTT   | CCCTTCACCTCGTCC<br>TTGA     | 60 | 376 | FS226<br>729.1 |
| ESSR         | (TAG)5               | 15 | 152 | CAATTTTGTTCAGG             | ATTGCCATTGGGAG              | 60 | 391 | FS226          |

|              |                          |    |     |                               |                               |    |     |                |
|--------------|--------------------------|----|-----|-------------------------------|-------------------------------|----|-----|----------------|
| -279         |                          |    |     | GATTCGT                       | AGAATG                        |    |     | 691.1          |
| ESSR<br>-284 | (CCTC)3                  | 12 | 220 | CGAACAAACAACATTC<br>AAAGCTC   | TATCGTTCATGCCAC<br>TCTTCTG    | 60 | 392 | FS226<br>671.1 |
| ESSR<br>-309 | (TA)26(TG)8(CG)<br>)9    | 86 | 205 | CCACTCATGGTAAAT<br>GCAGGT     | ACAGAAGGTATGCA<br>GCGTTCA     | 60 | 350 | FS226<br>611.1 |
| ESSR<br>-350 | (TCT)5                   | 15 | 109 | TCCTATGAAAGTAAC<br>GGCTCAA    | AGGGATCTTCTCTTC<br>CTTTGCT    | 59 | 290 | FS216<br>518.1 |
| ESSR<br>-351 | (AGC)6                   | 18 | 155 | CCAGACAGATTGGGT<br>ATGTCC     | CTGCTTCCACAAGAT<br>GAAGATG    | 59 | 377 | FS216<br>516.1 |
| ESSR<br>-382 | (TTG)6                   | 18 | 305 | AGACCGATCCCTAAC<br>ACGAAC     | CAACAGTTCAAACA<br>TGGCAGA     | 60 | 326 | FS212<br>742.1 |
| ESSR<br>-384 | (CAG)5                   | 15 | 437 | AATAACCCGCAACCC<br>ATTTTC     | TCGGAACATACTGT<br>GAGTTCGT    | 60 | 250 | FS212<br>720.1 |
| ESSR<br>-387 | (CTT)6                   | 18 | 390 | TTTCTGCTCAGAAA<br>CTTCCA      | GGCCATTTGCTAGA<br>CATTAAAG    | 60 | 285 | FS212<br>656.1 |
| ESSR<br>-388 | (AGA)4                   | 12 | 54  | GAGCATCTATCAATC<br>TAGCACGTAA | GGATGCGCATTAAAC<br>TTTCTGT    | 59 | 248 | FS212<br>642.1 |
| ESSR<br>-389 | (ATT)5                   | 15 | 107 | ACTGTACATGTTTCC<br>CAGCTTT    | TGCTCGAATGAATG<br>AACCTCT     | 59 | 391 | FS212<br>640.1 |
| ESSR<br>-391 | (CAA)5                   | 15 | 480 | CAGATTCCTTTCTATT<br>CGTTGC    | TCTTTCTTCTCCCTCT<br>TTCAGTAAC | 58 | 298 | FS212<br>628.1 |
| ESSR<br>-424 | (CTC)5                   | 15 | 220 | ACAGCCATCACTTCC<br>AAACAT     | AAGTAGGAAGCGAG<br>CTTCTGG     | 60 | 295 | FS222<br>872.  |
| ESSR<br>-427 | (TCC)5actctctc(C<br>TT)4 | 35 | 84  | TTATCTCCATCGACC<br>CTTTCC     | GAGGAGAGAGAGGA<br>GATCATGC    | 60 | 291 | FS222<br>864.1 |
| ESSR<br>-444 | (GCT)6                   | 18 | 407 | GTGACACACCCCAT<br>CATGC       | GCTGGAGAAGATGT<br>CAAGGAA     | 59 | 246 | FS222<br>820.1 |
| ESSR<br>-490 | (AAG)7                   | 21 | 301 | GTCGAAATGGAAGAT<br>GGGTCT     | TGAAAAGGCGCTTG<br>TATACTG     | 59 | 297 | FS222<br>682.1 |
| ESSR<br>-494 | (TCC)6(TTC)5             | 33 | 91  | TTATCTCCGTCGACC<br>CTTTC      | GAACGGAGGAGAGA<br>GAGGAGA     | 59 | 293 | FS222<br>676.1 |
| ESSR<br>-498 | (GTGCCG)3                | 18 | 318 | CTCCCATCTCCTCTTC<br>CAAA      | TCGTAGTGGCACCTC<br>TTGTG      | 59 | 285 | FS222<br>662.1 |
| ESSR<br>-527 | (GCA)5                   | 15 | 315 | TAGTTACCAGCTTTG<br>GGCTGA     | TCCCCACATGTAAG<br>GATGAGT     | 59 | 399 | FS216<br>025.1 |
| ESSR<br>-557 | (AAAAAAT)3(A<br>AAAAT)3* | 33 | 27  | TAAAATCGCTTGCCC<br>CAAAG      | ACGGAGGCGAGTAG<br>TCGTG       | 61 | 242 | FS223<br>434.1 |
| ESSR<br>-562 | (GT)7(TGCA)3*            | 25 | 51  | AACACTGTTTGGGTG<br>CTTTTG     | GTTGCAACATGGCTT<br>TCTTGA     | 60 | 272 | FS223<br>424.1 |
| ESSR<br>-566 | (AGC)5                   | 15 | 505 | GCAGCAGTAGAAGA<br>ACCTGCT     | AACCTCTTTTGGTGC<br>CTCCT      | 59 | 273 | FS223<br>418.1 |

|              |                       |    |     |                               |                            |    |     |                |
|--------------|-----------------------|----|-----|-------------------------------|----------------------------|----|-----|----------------|
| ESSR<br>-589 | (CGC)5                | 15 | 350 | CGCTTCTTCACCTC<br>ACGA        | GGCATCACGCTCCA<br>CTTAT    | 60 | 285 | FS223<br>338.1 |
| ESSR<br>-596 | (CACG)14              | 56 | 35  | TGGTTCAGACTTCAC<br>ATAAGCA    | TGGAGGAGAGAGAT<br>AGTGGAAA | 58 | 285 | FS217<br>139.1 |
| ESSR<br>-600 | (TAAA)4               | 16 | 215 | AGGGATGTCAGGGA<br>ATTTTT      | CCCATGATTTGATTT<br>CCAAG   | 57 | 280 | FS217<br>061.1 |
| ESSR<br>-602 | (AGAAG)3              | 15 | 189 | ATCAGTGGTAGGCAT<br>GTCGTC     | TTAGGTACAACACC<br>CGACTGAA | 60 | 375 | FS217<br>031.1 |
| ESSR<br>-609 | (AGC)10               | 30 | 362 | CACCCAACAACGACA<br>AAACC      | CATCATCATTGTTCG<br>ATGTGG  | 60 | 400 | FS215<br>392.1 |
| ESSR<br>-612 | (TTGAAT)4             | 24 | 291 | GGATAGGTTTTTCCA<br>GTTGGATTC  | CTGCTCCTTCCTCCC<br>TACAA   | 60 | 299 | FS213<br>698.1 |
| ESSR<br>-633 | (AAAAT)3              | 15 | 218 | TCAGTCAAATCCTGA<br>CTTCATAACC | CAGTCACGACACTG<br>GATTGG   | 60 | 248 | FS214<br>281.1 |
| ESSR<br>-650 | (GA)9                 | 18 | 212 | GCCTCTGCCCTAAAT<br>CAGTG      | TGAAACAGCGATGA<br>AGAAGC   | 59 | 296 | FS213<br>915.1 |
| ESSR<br>-677 | (TTC)5                | 15 | 216 | CCTCCTCTCCTCCTCC<br>ATCT      | AAGTCTGCGGCTGA<br>TACGTT   | 59 | 240 | FS227<br>395.1 |
| ESSR<br>-685 | (GCTTCT)3             | 18 | 574 | CGCTGTTCATCCCTG<br>TCTAT      | CAAGTGCTATCGCTG<br>TGGAG   | 60 | 222 | FS227<br>363.1 |
| ESSR<br>-700 | (AAG)5                | 15 | 525 | AACCGTTGCAACATC<br>TCCAC      | AAGCCTCGGCATTCT<br>CACT    | 60 | 299 | FS226<br>082.1 |
| ESSR<br>-718 | (AATGC)3              | 15 | 299 | CCTCTTCCTTCCAGT<br>GCAAA      | TACCAGTTCACCCCC<br>ATACC   | 60 | 245 | FS225<br>982.1 |
| ESSR<br>-769 | (CCG)5                | 15 | 137 | CATGCGATCACCACA<br>CAATTA     | ACCAGCAACTTCTTC<br>CGATCT  | 60 | 225 | FS224<br>368.1 |
| ESSR<br>-807 | (AGCAGG)4             | 24 | 501 | ACCGCTTCTTCCTTG<br>ACATCT     | GCAGCAGTAGAAGA<br>ACCTGCT  | 60 | 206 | FS223<br>081.1 |
| ESSR<br>-828 | (GGC)4agcta(TG<br>G)5 | 32 | 434 | ACTGCCATGAATGCT<br>ATGGAT     | CAGTTACCAACCAC<br>CACCCT   | 59 | 216 | FS222<br>959.1 |
| ESSR<br>-851 | (GAG)8                | 24 | 343 | CCTTTTTCGTCTTCGC<br>CTAGT     | GGAATGGTGATTCTT<br>CTCCTG  | 59 | 295 | FS216<br>717.1 |
| ESSR<br>-855 | (TC)8                 | 16 | 61  | CAACCTTATTCTAAA<br>CCTGCTGTC  | GCACATGTTTCTCAT<br>CTTGTGA | 58 | 242 | FS216<br>697.1 |
| ESSR<br>-862 | (GCA)5                | 15 | 294 | GCAGAGGAATATATA<br>ACCGAGGAA  | TATGGAGACATAAG<br>GGGCTGA  | 60 | 296 | FS212<br>321.1 |
| ESSR<br>-865 | (AAG)5                | 15 | 306 | GGTTTGAGACCAGCG<br>TTACCT     | CGCTTTGTTGGGTGA<br>TGTAGT  | 60 | 267 | FS212<br>273.1 |
| ESSR<br>-871 | (TCT)5                | 15 | 172 | TCTTCCACCTTAAAC<br>CCATCC     | TCCCCCTACGTTTTC<br>AAACTC  | 60 | 365 | FS216<br>666.1 |
| ESSR         | (GATT)3               | 12 | 442 | CAAAGCGTGA CTCT               | AACCAGGTCTTCTTA            | 59 | 236 | FS216          |

|               |                       |    |     |                             |                            |    |     |                |
|---------------|-----------------------|----|-----|-----------------------------|----------------------------|----|-----|----------------|
| -872          |                       |    |     | CTATTATGC                   | AAGTCCA                    |    |     | 662.1          |
| ESSR<br>-874  | (TCT)5                | 15 | 361 | GAAAGCAGCACTAG<br>GCAGGTA   | ACAATTTCCATGTCC<br>GTGAAC  | 60 | 396 | FS216<br>624.1 |
| ESSR<br>-891  | (CCCTTT)3             | 18 | 315 | TCTCCCCTTTAAACC<br>AAAACC   | CTACCGGTGGTGCTA<br>AAGATG  | 59 | 384 | FS213<br>233.1 |
| ESSR<br>-920  | (ACTGGA)3             | 18 | 559 | AGTTCAGCTCTTCG<br>GAGGAT    | TCCATCATCCCCTTC<br>TTCTC   | 60 | 287 | FS225<br>834.1 |
| ESSR<br>-960  | (CCCTAG)3             | 18 | 170 | CGAGGTCCAATGCAT<br>CATC     | TTGATCTCCCTCAAA<br>GCCTTA  | 59 | 295 | FS225<br>730.1 |
| ESSR<br>-988  | (AGC)5                | 15 | 507 | GCAAATGATTAGAGG<br>CATCAGG  | CTGGGTAAAGCTAG<br>GCGAAGT  | 60 | 243 | FS224<br>263.1 |
| ESSR<br>-1038 | (ATCCC)3              | 15 | 381 | TACATCCAACCTCTCC<br>GACTCC  | CAGAGGTGGCAGAC<br>ATGACA   | 60 | 295 | FS221<br>121.1 |
| ESSR<br>-1074 | (TGCTCC)6             | 36 | 623 | TTTAGTGGCATTTC<br>GACTGG    | CAGAAGCAGGAACA<br>GGAACAG  | 60 | 240 | FS219<br>530.1 |
| ESSR<br>-1082 | (CAC)5                | 15 | 284 | CGATATAGCCACTCT<br>TGACCGTA | ATCTCAGCCGCAAA<br>TTTACCC  | 61 | 288 | FS218<br>266.1 |
| ESSR<br>-1097 | (TTC)5                | 15 | 531 | AGTCGGGTAGCATCC<br>AAACAC   | GGTTCGATCGTGCT<br>AAGTAGA  | 61 | 265 | FS218<br>168.1 |
| ESSR<br>-1100 | (AAAAG)3              | 15 | 258 | CGTTGTAATTCTTA<br>CCCTTCC   | ACCGTAAATCTCAG<br>CCCATTT  | 59 | 297 | FS218<br>142.1 |
| ESSR<br>-1102 | (TCA)5                | 15 | 176 | CATGGCACCTTTATC<br>GACATT   | TGAACTCCTCTATCG<br>TTGCAC  | 59 | 263 | FS210<br>711.1 |
| ESSR<br>-1107 | (GGC)5                | 15 | 506 | CGTCCCGTACACAAT<br>CGTAGA   | GGTCTGCAGCCAA<br>ATCAAT    | 61 | 243 | FS210<br>513.1 |
| ESSR<br>-1108 | (CAT)5                | 15 | 103 | CGAATAACCCCGAT<br>ACATGA    | CCTTCAAGCAACCG<br>ATAAACA  | 60 | 250 | FS210<br>499.1 |
| ESSR<br>-1244 | (GAGT)3gtgta(T<br>G)7 | 31 | 210 | CCGATAAGGCATGCT<br>TTGTTTA  | GCTTCGACAGAGGA<br>CTGTAC   | 60 | 390 | FS212<br>619.1 |
| ESSR<br>-1249 | (TTG)8                | 24 | 191 | CTCACTTCTCCCCAG<br>ATCTACC  | CAGTGGTTATCCAAT<br>CACCTCA | 59 | 250 | FS212<br>591.1 |
| ESSR<br>-1264 | (AC)10                | 20 | 435 | TCTTTGCATCTCTGTC<br>TTGCAT  | GGGGATGCCTTCCAT<br>CTAATA  | 60 | 374 | FS227<br>859.1 |
| ESSR<br>-1393 | (AGTCG)3              | 15 | 313 | TCGATTTTCGGTTGAG<br>AAGAGA  | CAACAGATGTTGGA<br>TGGAAATG | 60 | 342 | FS224<br>764.1 |
| ESSR<br>-1404 | (AT)8                 | 16 | 135 | CGATGACTCCTCAAA<br>AAGTGC   | CACACACCGAGGAT<br>CGACTAT  | 60 | 388 | FS227<br>929.1 |
| ESSR<br>-1407 | (GT)9                 | 18 | 405 | CAGGATTTCAACAAC<br>ACATCG   | GAGTATGGGGTCAA<br>CATGTGC  | 60 | 281 | FS227<br>929.1 |
| ESSR<br>-1466 | (AAAT)5               | 20 | 162 | CCTAAATTCAATGCG<br>CTTCAC   | TAAATCCACCAAAG<br>AGCCTGA  | 59 | 298 | FS226<br>730.1 |

|               |                |    |     |                            |                            |    |     |                |
|---------------|----------------|----|-----|----------------------------|----------------------------|----|-----|----------------|
| ESSR<br>-1484 | (AGC)5         | 15 | 427 | CGTCCGCCAATTGAA<br>TACTTA  | ACAACCTGCTGCTAT<br>GGTCAC  | 60 | 298 | FS226<br>674.1 |
| ESSR<br>-1506 | (TCC)5         | 15 | 72  | CAACTCATTCTTCT<br>CCTCCTC  | AGCCTCGGATTTGGT<br>CAGT    | 59 | 244 | FS226<br>634.1 |
| ESSR<br>-1507 | (TTTGT)3       | 15 | 285 | CGGGATAGGGTTTTG<br>TTGAGA  | TTGATTTTGGGCAAC<br>TCACAG  | 61 | 291 | FS226<br>630.1 |
| ESSR<br>-1551 | (TTCAAA)3      | 18 | 92  | AACAGGCCTTCGCAT<br>ATACA   | TACGTGGTCGTCACC<br>GTCA    | 60 | 250 | FS225<br>912.1 |
| ESSR<br>-1554 | (AT)12         | 24 | 560 | CATATCATTGGCCTC<br>ACCTCT  | GACTGGAAGTCCGA<br>ACCAGTA  | 59 | 295 | FS216<br>483.1 |
| ESSR<br>-1557 | (AT)25         | 50 | 314 | ACCTCTTTGTGTGCT<br>CTTTTCG | CGGTGGTGGTAATT<br>AACGAAG  | 59 | 335 | FS216<br>429.1 |
| ESSR<br>-1561 | (AT)18         | 36 | 217 | ATCAGCGTTCCACTA<br>CACCTG  | ACATATATGGTCAG<br>GGCTCCA  | 59 | 381 | FS216<br>395.1 |
| ESSR<br>-1562 | (TA)9          | 18 | 454 | TACAGCACCCCTTTA<br>GCCTTC  | AGAGGTGGAAATCA<br>GGTGGAT  | 60 | 284 | FS216<br>395.1 |
| ESSR<br>-1567 | (CCTCCG)3      | 18 | 51  | CCTCATCCCTTTGAA<br>CAGACC  | GGCTTCGATTTCTCC<br>TTCG    | 60 | 250 | FS214<br>868.1 |
| ESSR<br>-1568 | (TCTT)4        | 16 | 547 | GGTGGCAAGGGTCAT<br>TCTACT  | GTCACAAGCTAAAC<br>AGCTCCA  | 59 | 300 | FS214<br>806.1 |
| ESSR<br>-1569 | (CCTCCG)3      | 18 | 94  | GCCTTAATTTCCGTC<br>CTCATC  | GTATGGATCCGGTTT<br>GACATC  | 59 | 300 | FS214<br>790.1 |
| ESSR<br>-1580 | (CAAATC)4      | 24 | 240 | GTTCTCCGTTGCGTC<br>AATC    | GAATTTGCATCTTTC<br>CCCTTC  | 59 | 294 | FS214<br>608.1 |
| ESSR<br>-1581 | (TA)7tg(TA)21  | 58 | 110 | GTTGCAAGCAACAAA<br>TTCACC  | CCTGGGAGATAGAA<br>AAACAACC | 59 | 296 | FS214<br>554.1 |
| ESSR<br>-1589 | (AAAT)4        | 16 | 203 | CTACGCAAGCTCCTG<br>AACAAC  | CTACCCCTTTCCTT<br>GCCATT   | 60 | 294 | FS213<br>051.1 |
| ESSR<br>-1590 | (AATAG)3       | 15 | 548 | GGGGTAGCTGTTTGT<br>ATTGGTG | CGAGCCAGCTACTC<br>AACCAT   | 60 | 300 | FS213<br>051.1 |
| ESSR<br>-1602 | (AAGCTA)3      | 18 | 566 | TGTCGGTGTGTGCAA<br>GTTAAA  | GCCAAAATGTTGTTG<br>CAAATC  | 60 | 281 | FS212<br>867.1 |
| ESSR<br>-1751 | (AT)21acg(TA)7 | 59 | 468 | AAAAGCCAAGGGAA<br>AGAAGC   | CGGTGTATTACATGT<br>GGCAAG  | 59 | 356 | FS216<br>156.1 |
| ESSR<br>-1752 | (TTTTA)3       | 15 | 274 | ATTCTTCCTCCTTGGT<br>CTGCT  | GCTGCCACTGTTTAG<br>GCATAC  | 59 | 399 | FS216<br>138.1 |
| ESSR<br>-1756 | (ATC)5(TTC)4   | 27 | 443 | TCATAATTGCCTCCT<br>CACCAG  | ACATCATCTGGTCGT<br>CCTTCA  | 60 | 384 | FS215<br>938.1 |
| ESSR<br>-1779 | (CCCTAG)3      | 18 | 176 | GCGAGGTCCAATGTA<br>GCAG    | TTGATCTCCCTCAAA<br>GCCTTA  | 59 | 296 | FS223<br>429.1 |
| ESSR          | (TCT)5         | 15 | 54  | ATCGCTGCACCAACA            | TAAGGATTGACGAC             | 60 | 345 | FS223          |

|               |              |    |     |                             |                              |    |     |                                  |
|---------------|--------------|----|-----|-----------------------------|------------------------------|----|-----|----------------------------------|
| -1786         |              |    |     | GTAATC                      | CGGAAC                       |    |     | 395.1                            |
| ESSR<br>-1807 | (TA)10       | 20 | 323 | GATTGCACCTCCATC<br>CTCTTC   | AATCTGTCTGGGTGA<br>ATGGTG    | 59 | 397 | FS217<br>030.1                   |
| ESSR<br>-1821 | (TAAAA)3     | 15 | 219 | CAAGGAGCGACACA<br>TAAAAGAA  | GGGAGAATTCAAAC<br>TGTACGAAG  | 59 | 399 | FS213<br>633.1                   |
| ESSR<br>-1823 | (TATTTT)5    | 30 | 289 | GGTACTTACCGATCT<br>TGGTGCT  | TCAGGTGGACATGC<br>ATCTAATC   | 59 | 426 | FS213<br>561.1                   |
| ESSR<br>-1832 | (AAG)5       | 15 | 90  | CAAAATCAACCAGTAG<br>CTTTCGT | ACCTTTTTGTTGCAC<br>AACCTG    | 59 | 375 | FS214<br>938.1                   |
| ESSR<br>-1837 | (GCG)5       | 15 | 132 | CCGAGCTCCCCTACT<br>ACTCAC   | CCTTCGAAGACCTCG<br>CTATAC    | 59 | 300 | FS214<br>286.1                   |
| ESSR<br>-1839 | (TCT)5       | 15 | 109 | ACTTCTCATGCCCT<br>TCAGAT    | TCCCCCTACGTTTTT<br>AAACTC    | 60 | 291 | FS214<br>264.1                   |
| ESSR<br>-1850 | (CTTTT)3     | 15 | 195 | TCTGACAGACGACCT<br>GGAGAT   | ATCACTGCCTCTCCA<br>CAAGAA    | 59 | 278 | FS214<br>084.1                   |
| ESSR<br>-1874 | (GCTCCT)3    | 18 | 419 | GTCCATGTCTTCAAC<br>CGCTTT   | CAGGAGGAGGGATA<br>GGAGCTA    | 60 | 299 | FS227<br>440.1                   |
| ESSR<br>-1882 | (GAT)6       | 18 | 142 | TCTGAAGAGGAGGTC<br>GACGAT   | GCGCACATCAATAA<br>TTTCACC    | 60 | 375 | FS227<br>362.1                   |
| ESSR<br>-1951 | (ATTAAA)3    | 18 | 593 | AGCTAGGAAGCAAG<br>GATACGG   | AAGCAAGCAGTCAG<br>CAGTAGC    | 59 | 372 | FS224<br>503.1<br>FS225<br>499.1 |
| ESSR<br>-2010 | (TTGAAT)4    | 24 | 265 | CTCCGAGTACAAGGA<br>ACAGGA   | CCAAGTTTTTGTCAA<br>CGCTCT    | 59 | 249 | FS222<br>980.1                   |
| ESSR<br>-2024 | (AAT)5       | 15 | 134 | CTCCCTAAACCCCAA<br>TAATCAA  | AGCGGAAGAGGATA<br>TCAGAGC    | 59 | 320 | FS213<br>766.1                   |
| ESSR<br>-2026 | (TTC)4(TGC)4 | 24 | 131 | TCGCTTCTCAACAT<br>AACTGA    | TCCAAGACCCAAT<br>AACATCA     | 59 | 346 | FS213<br>752.1                   |
| ESSR<br>-2039 | (TA)25       | 50 | 425 | CGTTCCTCCATCAAC<br>CATCTA   | CAGGCCTTATTACAC<br>TGAACCA   | 59 | 399 | FS216<br>565.1                   |
| ESSR<br>-2052 | (TCTT)4      | 16 | 547 | GGTGGCAAGGGTCAT<br>TCTACT   | GCCGACTAGAGCAA<br>CCATACA    | 60 | 238 | FS213<br>264.1                   |
| ESSR<br>-2061 | (TAAA)4      | 16 | 221 | TGTCAGTATGGGATG<br>ATGAAGC  | GTTCATAATAACACC<br>AGGATACCG | 59 | 278 | FS225<br>881.1                   |
| ESSR<br>-2083 | (CAC)5       | 15 | 226 | TAGCTCCTGCTCCAT<br>CACCA    | GGTGGAGGTAGAGC<br>TATGGTTG   | 60 | 394 | FS225<br>841.1                   |
| ESSR<br>-2177 | (TG)10       | 20 | 486 | GGTCAGACCATCAAA<br>CACTCAA  | GTGTACTAACCAGA<br>AGAGGAACG  | 58 | 340 | FS221<br>200.1                   |
| ESSR<br>-2184 | (TGGATC)3    | 18 | 101 | ATTGATTTCCGTCGC<br>TTAGAC   | GCAATCTGGATCCTG<br>TTCTCA    | 59 | 421 | FS221<br>140.1                   |

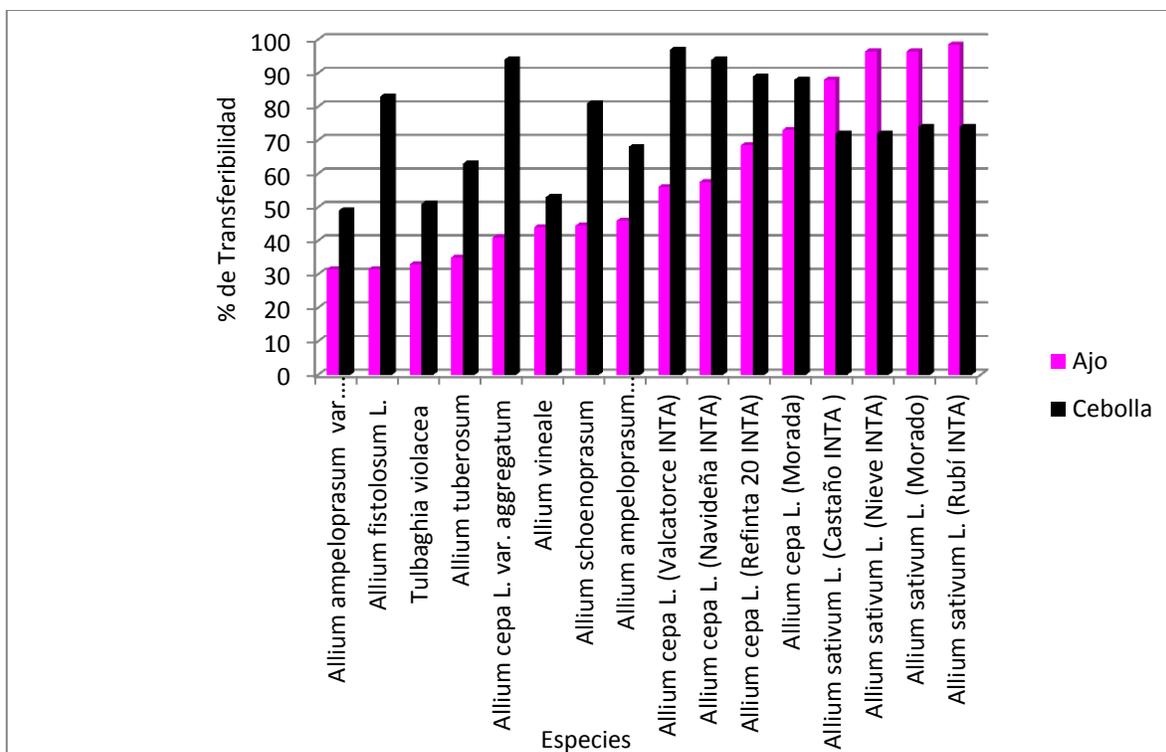
|               |                                 |    |     |                            |                            |    |     |                |
|---------------|---------------------------------|----|-----|----------------------------|----------------------------|----|-----|----------------|
| ESSR<br>-2243 | (AT)26                          | 52 | 326 | CGCACTAATCTTGGC<br>ACAAA   | TGTATAAGGACACT<br>GCGACCA  | 59 | 345 | FS210<br>674.1 |
| ESSR<br>-2246 | (TTC)6                          | 18 | 320 | GGTTGTTTGAAGGC<br>ATGTTA   | CAATCTAGGAAACA<br>AAGGCTCA | 59 | 362 | FS210<br>562.1 |
| ESSR<br>-2311 | (TTTAAT)3                       | 18 | 512 | AGCAAGCAGTCAGC<br>AGTAACA  | GCGTAGTACGGGGA<br>TACGTAGA | 59 | 340 | FS225<br>263.1 |
| ESSR<br>-2337 | (CGACC)3cgggccc<br>ggcc(CGGTT)3 | 40 | 181 | GAATAGTCCCACGTC<br>ATGGATT | TTCATGGGAAAGTC<br>AGCTCAG  | 60 | 331 | FS225<br>121.1 |
| ESSR<br>-2385 | (TTAAA)3                        | 15 | 143 | CAATCATATCTGCCC<br>TAACCTT | CGTAGATGATCGGG<br>GTTGTTA  | 58 | 332 | FS224<br>944.1 |
| ESSR<br>-2387 | (TTTC)5                         | 20 | 141 | TTTCGATACCCTGAT<br>TCACCA  | TGAGTTAAAGGGGA<br>CGGTGAC  | 60 | 361 | FS224<br>940.1 |
| ESSR<br>-2451 | (GAG)5                          | 15 | 361 | CCGATTCAACCGAAT<br>CCAT    | CTTCTTCTCGTCCT<br>GCCATT   | 60 | 267 | FS224<br>071.1 |
| ESSR<br>-2566 | (GGTTCG)3                       | 18 | 438 | CGGATGGTACAGCAG<br>ATCAC   | CACATTGCACTCCAA<br>GACTCC  | 59 | 272 | FS223<br>541.1 |
| ESSR<br>-2607 | (TCC)4acctcc(TC<br>T)4          | 30 | 90  | ATTCCACTTAACCCC<br>CAAATC  | CGCAGGTGAAGTGA<br>GTAGGAG  | 59 | 276 | FS223<br>142.1 |
| ESSR<br>-2632 | (CTGCCA)3                       | 18 | 365 | CGCTTCTTGTCTGAT<br>CGACTG  | CCAGTTCGAGGCTG<br>ATTACAG  | 60 | 288 | FS217<br>210.1 |
| ESSR<br>-2634 | (TCC)6                          | 18 | 192 | ATCACGTATGGAGAC<br>CACTGC  | TGAATGAGTTGATTG<br>TCCTTGG | 60 | 288 | FS217<br>156.1 |
| ESSR<br>-2636 | (TCT)6                          | 18 | 327 | GAAGCCTTGATCAGA<br>GAAGCA  | TGCATTGATCTCCTC<br>TTCCAT  | 59 | 385 | FS212<br>126.1 |
| ESSR<br>-2640 | (AC)28                          | 56 | 476 | TGGCACTACAGTTTC<br>TGGAAGA | CCTGCAAGCAAAGA<br>ATCTGTC  | 60 | 315 | FS212<br>018.1 |
| ESSR<br>-2652 | (TTC)5                          | 15 | 243 | CGATAAGTCACCATC<br>CACGAC  | CATGGTCTCGCCAAT<br>TATCTG  | 60 | 387 | FS211<br>924.1 |
| ESSR<br>-2680 | (CCT)5                          | 15 | 259 | CAACGGCTACGCATC<br>TCAGTA  | CCAAGCTCGTCAACT<br>CCAATA  | 60 | 384 | FS227<br>618.1 |
| ESSR<br>-2693 | (GA)12                          | 24 | 341 | TCACCCATCCACTAT<br>TCAACTT | ATCCCATCACAATCT<br>TCTCCA  | 58 | 244 | FS227<br>582.1 |
| ESSR<br>-2726 | (ATCAGA)3                       | 18 | 330 | TGCATCCTAGCTCCA<br>GTCCTA  | CCTTGAAAGCACGA<br>AGAACAG  | 60 | 383 | FS215<br>715.1 |
| ESSR<br>-2746 | (ATAAA)3                        | 15 | 261 | CACCGACGCTTATAG<br>AATCCA  | TGTAGCTGCAGTTGC<br>ATCTTTT | 60 | 385 | FS213<br>495.1 |
| ESSR<br>-2757 | (GTTCGG)3                       | 18 | 439 | CGGATGGTACAGCAG<br>ATCAC   | ATGTAATTCCGTTAC<br>CCTCAAG | 58 | 241 | FS227<br>250.1 |
| ESSR<br>-2790 | (GAA)5                          | 15 | 155 | GGCTTTGATTCTTTC<br>AAAGGTG | AGCAATTCACCAAC<br>AATCCTG  | 60 | 356 | FS227<br>124.1 |
| ESSR          | (CCT)6                          | 18 | 282 | AGCGATTTCTTGCCC            | CGGTTGTTGCTAGT             | 59 | 300 | FS225          |

|               |                           |    |     |                             |                           |    |     |                |
|---------------|---------------------------|----|-----|-----------------------------|---------------------------|----|-----|----------------|
| -2976         |                           |    |     | TAAACT                      | AAGCTC                    |    |     | 453.1          |
| ESSR<br>-2982 | (TTC)5                    | 15 | 249 | AAGAGGAGGAGCAG<br>TTGTGC    | CTCAACAGCACTTG<br>GGCAAC  | 60 | 299 | FS225<br>425.1 |
| ESSR<br>-2989 | (AAGGGG)3                 | 18 | 478 | ACAGCGGTTAGGGCA<br>CAG      | GGCGAATGCAACAA<br>GAAGC   | 60 | 247 | FS207<br>772.1 |
| ESSR<br>-2994 | (CTATA)3                  | 15 | 339 | TACATTGGCATCATT<br>GCACA    | TTACCGACATCGAG<br>GTAGCC  | 59 | 345 | FS207<br>676.1 |
| ESSR<br>-3017 | (TAAAAA)3                 | 18 | 151 | CACGTAATAAAGAGC<br>AGGGAAGA | TTCAAGTAGGGCAT<br>ACACCAG | 59 | 284 | FS207<br>288.1 |
| ESSR<br>-3021 | (CAA)3atgtcctg<br>(AAAC)3 | 32 | 180 | TCCATGTCTTATTGC<br>CTGTCA   | AGTGGTCGCCATATC<br>AGGTAG | 59 | 291 | FS207<br>210.1 |
| ESSR<br>-3044 | (TCC)5acctctc(C<br>TT)4   | 35 | 101 | CATACCTACTAAGGC<br>ACCACCA  | GAACGGAGGAGAGA<br>GAGGAGA | 59 | 323 | FS210<br>370.1 |

### 3.3.1. Transferibilidad

Se evaluaron un total de 261 pares de cebadores. Se obtuvieron amplificaciones positivas en 175 de los 261 marcadores evaluados (67%).

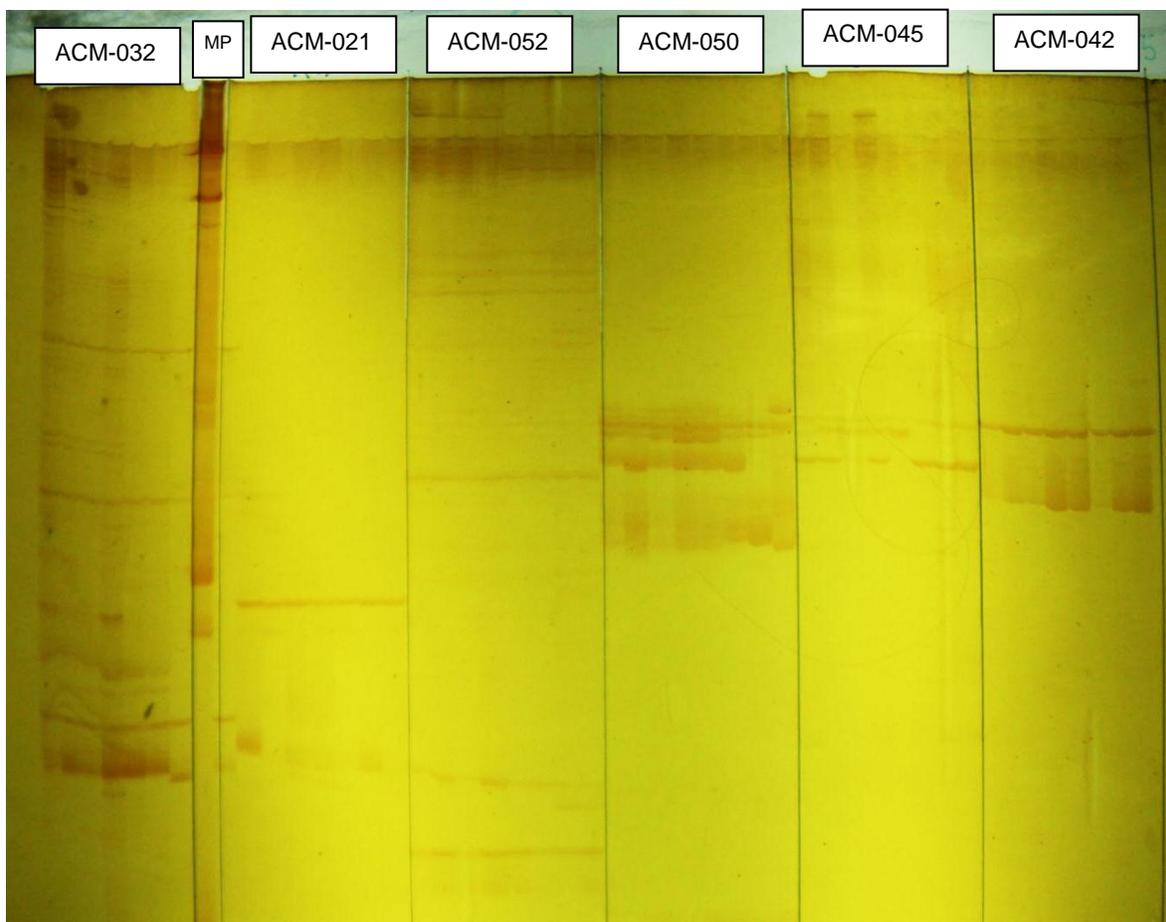
De estos, 175 marcadores, 86 fueron diseñados sobre ajo y 89 sobre cebolla. Considerando todos los marcadores que amplificaron positivamente, 41 de ellos amplificaron en todas las especies evaluadas. Se encontró que los marcadores fueron transferibles a otras especies de aliáceas en un rango de 27 -100%, siendo el menor valor correspondiente a marcadores diseñados a partir de secuencias de ajo (*A. sativum*) y amplificados en *A. ampreloprasum* var *ampresoprasum*, mientras que el mayor valor de transferibilidad (100%) correspondió a marcadores diseñados sobre secuencias de ajo y amplificados posteriormente en ajo. En promedio, el 75% los marcadores diseñados sobre cebolla y el 60 % de los diseñados sobre ajo amplificaron en las accesiones de aliáceas (Figura 35).



**Figura 35.** Porcentaje de transferibilidad de los marcadores diseñados sobre secuencias de ajo y sobre secuencias de cebolla en otras aliáceas.

### 3.3.2. Polimorfismo

El polimorfismo se evaluó en 4 materiales diferentes: 4 variedades de cebolla, en 4 variedades de ajo y en 2 poblaciones segregantes de cebolla tipo F<sub>2</sub>. Un ejemplo de cómo se evaluó el polimorfismo en las accesiones de ajo y cebolla en un gel de acrilamida se encuentra en la figura 36.



**Figura 36.** Análisis de polimorfismo en gel de acrilamida. En este caso el marcador ACM-032 se resultó polimórfico dominante para ajo y monomórfico para cebolla; los marcadores ACM-021, ACM-052 y el ACM-042 resultaron monomórficos tanto para ajo como para cebolla, el marcador ACM-050 resultó polimórfico dominante para ajo y monomórfico para cebolla y el marcador ACM-045 resultó polimórfico dominante para ajo y para cebolla. MP: marcador de peso molecular.

De los 175 marcadores que resultaron positivos (es decir, que amplificaron amplicones de tamaño cercano al esperado según el análisis de secuencia y diseño de cebadores), se evaluó el polimorfismo en 101 de ellos en variedades de ajo y cebolla, y 84 de ellos en las poblaciones segregantes de cebolla. El 42,6 % fue polimórfico para ajo y el 30,3 % para cebolla. En las poblaciones segregantes de cebolla, el 39,28 % fue polimórfico para la población RxA (Refinta 20 x Angaco INTA) y el 42,8 % para la población RxN (Refinta 20 x Navideña INTA). Los resultados respecto al número de marcadores polimórficos y tipo de polimorfismo para cada material se presentan en las tablas 11 y 12.

**Tabla 11.** Presencia y tipo de polimorfismo en marcadores microsatélites en ajo y cebolla.

| Marcador   | Producto esperado |         | Polimórfico |         | Tipo de polimorfismo |             | Presencia de bandas secundarias |
|------------|-------------------|---------|-------------|---------|----------------------|-------------|---------------------------------|
|            | Ajo               | Cebolla | Ajo         | Cebolla | Ajo                  | Cebolla     |                                 |
| ACM-016    | si (4)            | si (4)  | si          | no      | codominante          |             | si                              |
| ACM-018    | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | si                              |
| ACM-023    | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | no                              |
| ACM-031    | no                | si (4)  | no          | si      |                      | nd          | si                              |
| ACM-039    | si (4)            | si (4)  | si          | si      |                      | nd          | si                              |
| ACM-081    | si (4)            | si (2)  | no          | si      |                      | codominante | no                              |
| ACM-091    | si (4)            | si (4)  | no          | si      |                      | nd          | si                              |
| ACM-012    | si (4)            | si (4)  | si          | no      | dominante            |             | no                              |
| ACM-017    | si (4)            | si (4)  | no          | si*     |                      | dominante   | si                              |
| ACM-020    | si (4)            | si (4)  | si          | si      | nd                   | dominante   | si                              |
| ACM-093    | si (4)            | si (4)  | si          | no      | dominante            |             | si                              |
| ACM-027    | si (4)            | si (4)  | si*         | si*     | codominante          | codominante | si                              |
| ACM-029    | si (4)            | si (4)  | si          | si      | codominante          | dominante   | si                              |
| ACM-035    | si (4)            | si (2)  | nd          | nd      |                      |             | si                              |
| ACM-101    | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | si                              |
| ACM-104    | si (4)            | si (4)  | si          | no      | nd                   |             | si                              |
| ACM-107    | si (4)            | si (4)  | si          | si      | dominante            | dominante   | si                              |
| ACM-115    | si (4)            | si (4)  | si*         | no      | codominante          |             | si                              |
| ACM-118    | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | si                              |
| ACM-125    | si (4)            | si (4)  | no          | si      |                      | codominante | si                              |
| Asa-04     | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | si                              |
| Asa-06     | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | no                              |
| Asa-07     | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | si                              |
| Asa-08     | si (4)            | nd      | si          | nd      | dominante            |             | si                              |
| ACM-086    | si (4)            | no      | si*         | no      |                      | codominante | si                              |
| ESSR-309   | si (4)            | si (4)  | si          | si      | nd                   | dominante   | si                              |
| ESSR-596   | no                | si      | no          | nd      |                      |             | no                              |
| ESSR-2243  | si (4)            | si (4)  | no          | no      |                      |             | si                              |
| Asa-23     | si (4)            | si (3)  | no          | no      |                      |             | no                              |
| GB-ASM-035 | si (4)            | no      | no          | no      |                      |             | no                              |
| ESSR-828   | si (4)            | no      | no          | no      |                      |             | si                              |

|           |        |        |     |    |             |             |    |
|-----------|--------|--------|-----|----|-------------|-------------|----|
| ESSR-3021 | si (4) | no     | si  | no | dominante   |             | no |
| ESSR-1244 | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-2607 | si (4) | no     | si  | no | dominante   |             | no |
| ESSR-609  | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-85   | si (4) | si (4) | si  | no | codominante |             | si |
| GSSR-2    | si (4) | si (4) | si  | no | codominante |             | si |
| ESSR-2337 | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-15   | si (4) | no     | si  | no | codominante |             | no |
| ESSR-46   | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-1074 | si (4) | si (4) | si  | no | dominante   |             | si |
| ESSR-427  | si (4) | si (4) | si  | no | codominante |             | no |
| ESSR-557  | si (4) | si (4) | no  | si |             | codominante | si |
| ESSR-494  | si (4) | si (2) | si  | no | codominante | nd          | no |
| ESSR-851  | no     | si(1)  | no  | no |             |             | no |
| ESSR-2177 | si (4) | si (2) | si  | si | codominante | nd          | no |
| ESSR-1264 | si (4) | no     | si  | no | codominante |             | no |
| ESSR-50   | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-1551 | si (4) | no     | si  | no | codominante |             | si |
| ESSR-73   | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-1249 | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-382  | si (4) | si     | no  | si |             | nd          | si |
| ESSR-2311 | si (4) | si (2) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-1951 | si (2) | no     | no  | no |             |             | no |
| ESSR-2010 | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-612  | si (4) | no     | si* | no | dominante   |             | si |
| ESSR-1580 | si (4) | si (2) | si  | si | codominante | nd          | no |
| ESSR-2693 | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | no |
| ESSR-2566 | si (4) | si (2) | si  | no | dominante   |             | si |
| ESSR-2757 | si (4) | no     | no  | no |             |             | si |
| ESSR-498  | si (2) | si (2) | si  | si | dominante   | dominante   | no |
| ESSR-2636 | si (4) | si (4) | no  | si |             | nd          | si |
| ESSR-650  | si (4) | no     | si  | no | nd          |             | si |
| ESSR-2246 | si (4) | si (3) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-2634 | si (4) | si (4) | no  | no |             |             | si |
| ESSR-1874 | si (4) | si (2) | si  | no | codominante |             | si |
| ESSR-444  | si (4) | si (4) | si  | si | codominante | codominante | si |

|           |        |        |     |     |             |             |    |
|-----------|--------|--------|-----|-----|-------------|-------------|----|
| ESSR-2184 | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-3017 | si (4) | si (4) | si  | no  | nd          |             | si |
| ESSR-1407 | si (2) | no     | no  | no  |             |             | no |
| ESSR-351  | si (4) | si (4) | si  | si  | codominante | codominante | si |
| ESSR-351  | si (4) | si (4) | no  | si  |             | dominante   | si |
| ESSR-1567 | si (3) | no     | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-855  | si (4) | si (2) | no  | si  |             | codominante | si |
| ESSR-2052 | si (4) | no     | si  | no  |             | codominante | si |
| ESSR-2982 | si (4) | si (4) | no  | si* |             | dominante   | si |
| ESSR-424  | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-891  | si (2) | no     | no  | no  |             |             | no |
| ESSR-1839 | no     | si (4) | no  | si  |             | nd          | si |
| ESSR-1097 | si (4) | no     | no  | no  |             |             | no |
| ESSR-602  | si (4) | si (4) | si  | no  | nd          |             | si |
| ESSR-1786 | si (4) | si (4) | no  | si* |             | dominante   | si |
| ESSR-10   | si (4) | no     | no  | no  |             |             |    |
| ESSR-600  | no     | si (2) | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-1102 | si (4) | si (4) | si* | si* |             | nd          | si |
| ESSR-589  | si (4) | no     | si  | no  | nd          |             | si |
| ESSR-1107 | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | no |
| ESSR-1821 | si (4) | si (4) | si  | no  | codominante |             | si |
| ESSR-1484 | si (4) | si (4) | si  | si  | codominante | codominante | si |
| ESSR-2790 | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             |    |
| ESSR-1590 | si (4) | si (3) | no  | si  |             | dominante   | si |
| ESSR-865  | si (4) | si (2) | si  | no  | codominante |             | si |
| ESSR-1038 | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | no |
| ESSR-2083 | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | no |
| ESSR-2024 | si (4) | si (3) |     |     |             |             | si |
| ESSR-1850 | si (4) | no     | si  | no  |             | codominante |    |
| ESSR-874  | si (4) | no     | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-988  | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-566  | si (4) | si (4) | si  | si  | codominante | dominante   | si |
| GSSR-1    | si (4) | si (2) | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-206  | si (4) | si (4) | no  | no  |             |             | si |

\*Denota polimorfismo en bandas secundarias. nd se refiere a que no es posible determinar el tipo de polimorfismo debido a múltiples bandas o a poca resolución del gel.

**Tabla 12.** Presencia y tipo de polimorfismo en marcadores microsatélites en dos poblaciones segregantes de cebolla.

| Marcador  | Producto esperado |     | Polimórfico |     | Tipo de polimorfismo |             | Presencia de bandas secundarias |
|-----------|-------------------|-----|-------------|-----|----------------------|-------------|---------------------------------|
|           | RxA               | RxN | RxA         | RxN | RxA                  | RxN         |                                 |
| ACM-072   | si                | si  | si          | si  | dominante            | codominante | si                              |
| ACM-010   | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| ACM-022   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ACM-035   | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| ESSR-1580 | si                | si  | si          | si  | dominante            | dominante   | si                              |
| ACM-077   | si                | si  | si          | si  | dominante            | dominante   | si                              |
| ACM-047   | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| ACM-049   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ACM-104   | si                | si  | no          | si  |                      | dominante   | no                              |
| ACM-055   | si                | si  | si          | si  | dominante            | dominante   | si                              |
| ACM-043   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ACM-062   | si                | si  | si          | si  | nd                   | nd          | si                              |
| ACM-106   | si                | si  | no          | si  |                      | dominante   | si                              |
| GSSR-2    | si                | si  | si          | si  | dominante            | dominante   | si                              |
| ESSR-2387 | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ESSR-498  | si                | si  | si          | si  | nd                   | nd          | si                              |
| ACM-027   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| Asa-04    | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ACM-051   | si                | si  | si          | si  | dominante            | dominante   | si                              |
| ESSR-85   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ESSR-49   | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| ESSR-2976 | si                | si  | si          | si  | dominante            | dominante   | si                              |
| ACM-110   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ACM-116   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |
| ACM-118   | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| Asa-06    | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| ACM-064   | si                | si  | no          | no  |                      |             | no                              |
| ACM-054   | si                | si  | no          | no  |                      |             | si                              |

|         |    |    |     |     |             |             |    |
|---------|----|----|-----|-----|-------------|-------------|----|
| ACM-056 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-060 | si | si | si  | si  | codominante | codominante | si |
| ACM-011 | si | si | si  | no  | dominante   |             | si |
| ACM-012 | si | si | no  | si* |             | dominante   | si |
| ACM-017 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-061 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-063 | si | si | si  | si  | codominante | codominante | si |
| ACM-065 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-066 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-068 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-033 | si | si | si  | si  | nd          | nd          | no |
| ACM-036 | si | si | si* | si* | nd          | nd          | si |
| ACM-038 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-040 | si | si | no  | no  |             |             | no |
| ACM-041 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-081 | si | si | no  | no  |             |             | no |
| ACM-096 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-086 | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | si |
| ACM-021 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-032 | si | si | si  | si  | nd          | nd          | si |
| ACM-042 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-045 | si | si | no  | si  |             | dominante   | si |
| ACM-050 | si | si | si  | si  | nd          | nd          | si |
| ACM-052 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-016 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-008 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-009 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-013 | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | si |
| ACM-018 | si | si | si  | si  | codominante | codominante | si |
| ACM-003 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-004 | si | si | si  | si  | codominante | codominante | no |
| ACM-080 | si | si | si  | si  | nd          | nd          | si |
| ACM-105 | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | no |
| ACM-107 | si | si | no  | no  |             |             | no |
| ACM-115 | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | si |
| ACM-074 | si | si | no  | no  |             |             | si |

|           |    |    |     |     |             |             |    |
|-----------|----|----|-----|-----|-------------|-------------|----|
| ACM-019   | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-117   | si | si | si  | si  | nd          | nd          | si |
| ACM-123   | si | si | si* | si* | dominante   | dominante   | si |
| ACM-015   | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | si |
| ACM-058   | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-1249 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-2634 | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ESSR-73   | si | si | si  | si  | codominante | codominante | no |
| ESSR-2566 | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | no |
| ESSR-2451 | si | si | si  | si  | codominante | codominante | no |
| ESSR-988  | si | si | si  | si  | codominante | codominante | si |
| ACM-024   | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | no |
| ACM-002   | si | si | no  | no  |             |             | si |
| ACM-125   | si | si | si  | si  | dominante   | dominante   | si |

\*Denota polimorfismo en bandas secundarias. nd se refiere a que no es posible determinar el tipo de polimorfismo debido a múltiples bandas o a poca resolución del gel.

### 3.4. Discusión

Los resultados del presente estudio indican que una fracción significativa (un 27% en adelante) de los marcadores desarrollados para ajo y cebolla es transferible hacia otras especies de aliáceas, incluyendo especies para las cuales hoy no hay SSRs disponibles y eso contribuye a las herramientas moleculares disponibles para esa especie. Además, se encontró que el grado de transferibilidad disminuyó a medida que las especies se alejaban filogenéticamente de la especie en la cual se desarrollaron los marcadores.

Los marcadores desarrollados y/o evaluados en el presente estudio en las distintas especies de aliáceas podrían servir para genotipado, para estudios de diversidad, para caracterizar y luego identificar variedades, para mapeo comparativo o para selección asistida por marcadores, tanto los marcadores polimórficos en nuestros materiales, como aquellos monomórficos, debido a que el polimorfismo depende del material analizado.

Por otro lado, se encontraron entre 33 y 36 marcadores que resultaron polimórficos en las poblaciones segregantes, los cuales serían útiles para generar mapas genéticos en cebolla, y ya que estas poblaciones ya están caracterizadas fenotípicamente (Capítulo 2 de esta tesis) será posible encarar mapeo de QTL de los caracteres y relacionados al sabor de interés nutraceutico. Además, como muchos de estos marcadores resultaron transferibles entre ajo y cebolla, será posible también obtener mapas genéticos para estas especies y compararlos, ya que tendrán marcadores en común. Así, se podrán hacer comparaciones en cuanto la distribución genómica con los mapas como el de Cavagnaro (2007) en ajo y el de Galmarini (2001) en cebolla.

### **3.5 Conclusiones**

En el presente trabajo se desarrollaron y caracterizaron 161 marcadores microsatélites para ajo y cebolla. Se evaluó la transferibilidad de estos marcadores en ajo, cebolla, puerro, shallot, cebolla de verdeo, una especie de aliacea ornamental y otras especies de menor importancia económica de esta familia. Del total de marcadores desarrollados, el 67% amplificó en alguna de las especies evaluadas. Los marcadores fueron transferibles a otras especies de aliáceas en un rango de un 27 a un 100%, Además se evaluó que marcadores resultaban polimórficos en 4 variedades de ajo, 4 de cebolla y 2 poblaciones segregantes de cebolla, encontrando entre 30 y 43 marcadores polimórficos según el material considerado. Estos marcadores en el caso de las variedades de ajo y cebolla pueden servir para caracterizar y diferenciar variedades de estas hortalizas y en el caso de las poblaciones segregantes se utilizaran para construir mapas de ligamiento y mapear caracteres cuantitativos estudiados en esta tesis (Capítulo 2).

En conclusión los resultados arrojados por este trabajo permitirán contribuir a los planes de mejoramiento genético y caracterización molecular de varias especies del género *Allium*. Además, los marcadores desarrollados y/o evaluados en el presente estudio podrían servir para genotipado, para estudios de diversidad, para mapeo comparativo o para selección asistida por marcadores.

## CAPÍTULO 4

### **Relación entre compuestos funcionales y las propiedades antioxidantes y anti-agregantes en especies comestibles de Aliáceas\***

\*Basado en el artículo: “Relationships among functional compounds and antioxidant and antiplatelet activities in edible *Allium* species” Hebe Vanesa Beretta, Florencia Bannoud, Federico Berli, Marina Insani, Pablo Hirschegger, Claudio Rómulo Galmarini and Pablo Federico Cavagnaro. Enviado a la revista *Food Technology and Biotechnology* para su publicación.

#### 4.1. Introducción

Las aliáceas, como la cebolla (*Allium cepa* L.), el ajo (*Allium sativum* L.), el puerro (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.), el shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*), el ciboulette (*Allium schoenoprasum* L.) y la cebolla de verdeo (*Allium fistulosum* L.) son cultivados y consumidos en todo el mundo, tanto como especies medicinales como para saborizar otras preparaciones. Según Bystrická (2013), especies del género *Allium* se consumen en más de 135 países y son aceptadas por casi todas las culturas del mundo. La cebolla ocupa el segundo lugar en valor después del tomate en la lista de hortalizas cultivadas en todo el mundo (Randle & Lancaster, 2002). Los miembros de esta familia tienen un olor y sabor característico, y debido a ello, son comúnmente utilizados como condimentos para mejorar el sabor de los alimentos. Además, también se consumen por sus propiedades beneficiosas para la salud. Propiedades como anti-hipertensivas, antioxidantes, anti-inflamatorias, antimicrobianas, hipolipidémicas, hipoglucémicas, anticancerígenas y antiplaquetarias (AA), se han atribuido a especies del género *Allium* (Corzo-Martínez, Corzo, & Villamiel, 2007). Estas propiedades benéficas para la salud –extensivamente documentadas en la literatura científica- han llevado al reconocimiento de los *Allium* como alimentos funcionales.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. Alimentos con compuestos antioxidantes y antiplaquetarios disminuyen el riesgo de ECV a través de su participación central en la hemostasis, trombosis y estrés oxidativo (Vazquez-Prieto, Rodriguez Lanzi, Lembo, Galmarini, & Miatello, 2011; McEwen, 2014). Entre las propiedades funcionales que pueden evitar las ECV la actividad antiplaquetaria es una de las más estudiadas en ajo y cebolla (Goldman, Schwartz, & Kopelberg, 1995; Bordia, Mohammed, Thomson, & Ali, 1996; Briggs, Xiao, Parkin, Shen, & Goldman, 2000; Galmarini, Goldman, & Havey, 2001; Block, 2010). Agentes antiplaquetarios han sido encontrados también en puerro (Liakopoulou-Kyrakdes, M., A Sinakos, 1992) y en cebolla de verdeo (Chen, Chen, Tsai, & Jen, 2000). En estos estudios previos se usaron especies individuales de *Allium* para el análisis de la AA y se usaron además condiciones experimentales muy diferentes (por ejemplo: diferentes fuentes de plaquetas, agonistas y aparatos utilizados, materiales frescos

vs compuestos puros, entre otros) lo que hace que sus resultados sean casi imposible de comparar entre sí. Por lo tanto un análisis comparativo de la eficacia antiplaquetaria de las principales aliáceas sería de gran interés. Además, la AA no ha sido estudiada en otras aliáceas ampliamente consumidas tales como el ciboulette y el shallot. Estos vegetales tienen importancia en ciertas regiones y culturas, tales como Eurasia para el ciboulette y Europa y América para el shallot, por lo que el conocimiento de su efecto antiagregante es interesante.

La actividad antioxidante en *Allium* es otra propiedad benéfica que ha sido asociada a los compuestos organoazufrados y fenólicos (Bernaert et al., 2012; Block, 2010). Efectos antioxidantes han sido reportados en cebolla (Lee, Patil, & Yoo, 2015), en ajo (Benkeblia, 2005) shallot (Lu et al., 2011) y puerro (Bernaert et al., 2012), pero no en ciboulette y cebolla de verdeo. Además la comparación del potencial antioxidante entre las principales aliáceas usando las mismas condiciones experimentales no ha sido reportada.

Se ha propuesto que los compuestos fenólicos y organoazufrados presentes en *Allium* son los responsables de su actividad antiplaquetaria y antioxidante (Queiroz, Ishimoto, Bastos, Sampaio, & Torres, 2009; Briggs, Xiao, Parkin, Shen, & Goldman, 2000; Hubbard et al., 2006). Briggs (2000) evaluó la actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV) de cuatro tiosulfatos (TS) y encontró que todos ellos inhibían la agregación plaquetaria diferencialmente y que la combinación de TS no resultó en una AAIV aditiva, indicando que el potencial antiplaquetario en extractos de *Allium* no puede ser fácilmente predicho mediante la cuantificación de compuestos organoazufrados. En cuanto a los compuestos fenólicos, Hubbard (2003) reportó la capacidad antioxidante de la quercetina, el principal flavonoide hallado en cebolla y shallot (Slimestad, Fossen, & Vågen, 2007; Leighton et al., 1992). Además, Zhang (2012) reportó una fuerte capacidad antioxidante de la quercetina. Interesantemente, la quercetina está ausente en ajo (Nuutila, Puupponen-Pimiä, Aarni, & Oksman-Caldentey, 2003; Sultana & Anwar, 2008), en el cual se ha demostrado una capacidad antioxidante superior a la cebolla (Benkeblia, 2005) sugiriendo que hay compuestos diferentes a la quercetina en ajo con actividad antioxidante y probablemente en otras aliáceas.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Investigar la actividad antiplaquetaria en alliums no caracterizados hasta la actualidad para este carácter; 2) Realizar un análisis comparativo del potencial antiplaquetario y antioxidante de las principales especies de aliáceas; 3) Caracterizar el contenido de compuestos bioactivos azufrados y fenólicos en estas especies y examinar posibles asociaciones entre estos compuestos y las propiedades funcionales en las principales especies de *Allium*.

## **4.2. Materiales y Métodos**

Seis especies de *Allium* fueron obtenidas en un mercado local en Mendoza, Argentina. Se realizaron tres repeticiones para cada especie. Cada repetición consistió en 10 bulbos de cebolla (peso promedio por bulbo = 85g), 10 bulbos de shallot (peso promedio por bulbo = 40g), 10 dientes de ajo (un diente por bulbo de 10 bulbos diferentes; peso promedio por diente = 2.5g), 10 unidades de puerro por repetición (parte blanca comestible) y para ciboulette y cebolla de verdeo, fueron tomados 10g (tallos) y 20g (bulbos + tallos) de tejido fresco por repetición respectivamente.

### **4.2.1 Procesamiento de las muestras**

El procesamiento y preparación de los extractos acuosos de cada especie de *Allium*, fueron realizados como lo descrito previamente por Galmarini (2001). Para cebolla, ajo y shallot, las hojas secas exteriores fueron removidas y los bulbos fueron cortados en cuartos longitudinalmente. Para ciboulette, cebolla de verdeo y puerro, la parte comestible fue cortada en finas rebanadas. Los bulbos pelados y las hojas finamente cortadas de cada especie de *Allium* fueron procesados con agua destilada en una proporción 1:2 (peso/volumen), excepto para el ciboulette el cual fue preparado en una proporción 1:4 utilizando una licuadora manual (Braun MR 400 Plus). Los homogenatos resultantes se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente (26°C) para permitir la hidrólisis completa de los S-alk(en)il-L- sulfóxidos de cisteína (ACSOs). Los homogenatos fueron luego filtrados, centrifugados, y el sobrenadante clarificado fue almacenado a -20°C.

### **4.2.2. Determinación de las propiedades funcionales**

#### **4.2.2.1. Determinación de actividad anti-plaquetaria *in vitro* (AAIV)**

Para la determinación de AAIV los extractos de cada una de las especies de aliáceas se utilizaron tal cual fueron obtenidos (sin dilución) tal como se realizó previamente en ajo (Cavagnaro, Camargo, Galmarini, & Simon, 2007) y en cebolla (Cavagnaro & Galmarini, 2012) utilizando un agregómetro electrónico de impedancia (Chrono-log Corp, Havertown, Penn) en sangre entera (Cardinal & Flower, 1980) tal como fue detallado en el capítulo 2 de la presente tesis, sección 2.2.6. La dosis de extracto agregado varió para cada especie de acuerdo a las curvas dosis-respuesta (de 5 a 400  $\mu$ L de jugo de cada especie). La  $IC_{50}$  se expresó en mg de peso fresco/mL de sangre entera.

#### **4.2.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante (AOXA)**

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó a través del método ORAC (capacidad de absorbancia del radical oxígeno) siguiendo la metodología de Prior (2003) con modificaciones de Berli et al. (2014). Las muestras de aliáceas se diluyeron 1:500 v/v en buffer (75mM fosfato de potasio pH 7). En placas de 96 pocillos se agregaron 50  $\mu$ L de cada muestra o de TROLOX (compuesto antioxidante de referencia). Luego, se agregaron 100  $\mu$ L of fluoresceína (20 nM) y 50  $\mu$ L del generador de radicales libres 2,2'-azobis[2-amidinopropano]di-hidrocloruro (AAPH) 140mM y las muestras se incubaron a 37°C por 7 minutos. La fluorescencia fue monitoreada a 485 nm (excitación) y a 538 nm (emisión) en intervalos de 1 minuto durante 90 minutos en un fluorómetro de microplacas (Fluoroskan Ascent FL; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Finalmente, se calculó el área bajo la curva según Huang (2005) y la capacidad antioxidante se expresó en  $\mu$ mol equivalentes de Trolox (TE) % g peso fresco.

#### **4.2.3. Análisis composicional**

##### **4.2.3.1. Determinación de sólidos solubles y totales**

Las determinaciones de SS y ST se realizaron según lo detallado en el capítulo 2 de la presente tesis, sección 2.2.2.

##### **4.2.3.2. Determinación de piruvato**

Después de descongelar y centrifugar los extractos de *Allium*, fueron diluidos 80 veces en agua destilada. La determinación de piruvato (PV) fue realizada según lo detallado en el

capítulo 2 de la presente tesis, en la sección 2.2.3. El contenido de piruvato se expresó en mmol PV % g pf.

#### **4.2.3.3. Determinación de polifenoles totales**

Para esta determinación las muestras se usaron tal cual fueron obtenidas (sin diluciones posteriores). Se realizaron las determinaciones según lo detallado en el capítulo 2 de la presente tesis, en la sección 2.2.5. El contenido de fenoles totales (FTs) se expresó en mg ácido gálico % g pf.

#### **4.2.3.4. Análisis por HPLC de fenoles individuales**

Para la determinación de fenoles individuales los extractos de cada una de las especies de aliáceas se utilizaron tal cual fueron obtenidos (sin diluciones posteriores). Se analizaron 11 compuestos diferentes utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (Thermo Separation Products Inc., USA). La cromatografía se llevó a cabo con un equipo marca TSP (Thermo Separation Products, Inc., USA) que incluye: bomba cuaternaria (P4000), unidad desgasificadora de solventes (SCM 1000), auto-muestreador (AS 3000) con válvula de inyección de 100  $\mu$ L y detectores de Fluorescencia (FL 3000) y UV-Visible con arreglo de diodos (UV 6000 LP). El sistema se encuentra acoplado mediante un módulo de interfase (SN 4000) al software específico de comando ChromQuest, Versión 4.0 (ThermoFinnigan, USA). La columna analítica utilizada fue una ODS-Hypersil C18, 250 mm x 4.6 mm con partícula de 5  $\mu$ m y una pre-columna del mismo material (Alltech). La columna se mantuvo termostata a 25°C. Se inyectaron 20  $\mu$ L de jugo de cada aliácea-o de los estándares comerciales de alta pureza de los compuestos de interés- previamente centrifugado a 5000 rpm durante 10 min a 10°C en centrífuga refrigerada y filtrado por membrana de PTFE de 0,45  $\mu$ m de poro. La fase móvil consistió en un gradiente lineal de 2 mezclas de solventes: A (Agua:Ácido Trifluoroacético en una relación 99,9:0,1) y B (Acetonitrilo:solvente A en una relación 80:20), el gradiente comenzó con 85% del solvente A y 15% del solvente B, los primeros 10 minutos, luego 82/18% (A/B) del minuto 11 al 15; luego 77/23% del minuto del 16 al 23; luego 68/32% del minuto 24 al 29; luego 60/40% del minuto 30 al 39 y 0/100% del minuto 40 al 46. Los solventes utilizados fueron todos de calidad HPLC marca Baker (J.T. Baker, USA). El flujo

de corrida se mantuvo en 1 mL/min. Los compuestos analizados fueron: catequina, epigallocatequina galato (EGCg), epicatequina galato (ECg), epigallocatequina (EGC), rutina, miricetina, quercetina, kaemferol, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico. El contenido de EGC y de ECg se reportan juntos como EGC + ECg. El contenido de cada compuesto fue expresado como mg % g pf.

#### **4.2.3.5. Contenido total de compuestos flavonoides y no flavonoides**

El contenido total de compuestos flavonoides (FL) se calculó como la sumatoria de cada uno de los compuestos flavonoides presentes en cada especie de aliáceas (por ejemplo: quercetina + catequina + EGCg + ECg + EGC + rutina + miricetina + kaempferol) obtenidos mediante lo detallado en la sección anterior. El contenido de FL se expresó como mg % g pf. El contenido total de compuestos no flavonoides (NFL) se calculó como la sumatoria de cada uno de los compuestos no flavonoides presentes en cada especie de aliáceas. El contenido de NFL se expresó como mg % g pf.

#### **4.2.3.6. Determinación de tiosulfinatos**

Para la determinación de tiosulfinatos solo los extractos de ajo se diluyeron 20x, los extractos de las demás especies se usaron tal como fueron extraídos. El contenido de tiosulfinatos se determinó siguiendo la técnica de Han (1995). Brevemente, a 1125  $\mu$ L de cada extracto de *Allium* se le adicionaron 1875  $\mu$ L de cisteína 0,8 mM. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, 900  $\mu$ L de la mezcla -muestra + cisteína- se le agregaron 6,6 mL de DTNB (ácido 5,5'-Ditiobis 2-nitrobenzoico) 200  $\mu$ M. Como referencia, se reemplazó el extracto de *Allium* por agua destilada y se realizó la metodología de manera similar a lo descrito previamente para las muestras. Se midió la absorbancia a 412 nm. El contenido de tiosulfinatos se expresó en mmol TS % g pf.

#### **4.2.4. Análisis estadísticos**

Los análisis de la varianza (simple y multifactorial) y las correlaciones se ejecutaron utilizando el software InfoStat versión 2013 para Windows 4.0 (Di Rienzo et al., 2013). Las comparaciones de medias se realizaron según LSD Fisher (diferencia mínima significativa). Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos. El análisis de componentes

principales (ACP) se realizó utilizando todos los datos de todas las variables medidas (AOXA, AAIIV, FTs, FL; NFL; PV; SS y ST) en las 6 especies (ACP 1) y utilizando los valores de los compuestos fenólicos individuales y cada especie (ACP 2).

### **4.3. Resultados y Discusión**

#### **4.3.1. Variación entre las especies de aliáceas por su actividad antiplaquetaria**

Las respuestas *in vitro* de las plaquetas humanas a dosis crecientes de 6 especies de *Alliaceae* se midieron y compararon. Las 6 especies estudiadas mostraron acción inhibitoria de la agregación plaquetaria, pero la fuerza antiplaquetaria de cada una de ellas varió amplia y significativamente (más de 30 veces), tal como lo indican los valores de IC<sub>50</sub> de la tabla 13. En ambos donantes de sangre, el ajo resultó el antiplaquetario más fuerte seguido por el shallot y el ciboulette, mientras que el puerro y la cebolla de verdeo fueron los más débiles. En promedio para ambos donantes, la IC<sub>50</sub> del ajo resultó ser 5, 13, 23, 31 y 32 veces mayor que la del shallot, ciboulette, la cebolla, la cebolla de verdeo y el puerro, respectivamente (Tabla 13).

La AAIIV varió de una manera dosis-dependiente para todas las especies estudiadas. Los extractos acuosos de ajo y shallot inhibieron la actividad antiplaquetaria en todas las dosis ensayadas ( $p < 0,05$ ), desde 5 hasta 15 y 50  $\mu\text{L}$  de extracto/ mL de sangre entera, respectivamente. Las dosis inhibitorias mínimas para el resto de las especies fueron de 40 a 60 veces mayores (200-300  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de sangre entera) a la del ajo. La AAIIV en ciboulette y shallot no ha sido estudiada previamente. En el presente trabajo, se reporta por primera vez AAIIV significantes para estas especies. El análisis comparativo reveló que el shallot y el ciboulette, en ese orden y luego del ajo, son potentes antiagregantes plaquetarios (Tabla 13.).

**Tabla 13.** Propiedades antiplaquetarias y antioxidantes y contenido de compuestos bioactivos en 6 especies de aliáceas.

| Especie                  | AAIV                | 1                 | AAIV                | 2                 | AAIV              | AOXA                  | PV                 | TS                | FTs              | FL                | NFL              | SS                | ST               |
|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
|                          | (IC <sub>50</sub> ) |                   | (IC <sub>50</sub> ) |                   | media             |                       |                    |                   |                  |                   |                  |                   |                  |
| <b>Ajo</b>               | 3,24 ± 0,94<br>c    |                   | 3,99 ± 1,10<br>d    |                   | 3,62              | 134,50 ± 17,70 c      | 3,05 ± 0,01<br>a   | 5,85 ± 0,16<br>a  | 78,95 ± 11,85 b  | 10,79 ± 0,57 de   | 3,99 ± 0,37<br>b | 30,33 ± 1,52 a    | 29,95 ± 0,86 a   |
| <b>Shallot</b>           | 6,87 ± 0,54<br>c    |                   | 30,88 ± 4,15 c      |                   | 18,88             | 1527,70 ± 121,6 b     | 1,77 ± 0,11<br>c   | 0,29 ± 0,004 cd   | 130,16 ± 19,48 a | 142,41 ± 13,89 a  | nd               | 15,03 ± 0,05 b    | 15,42 ± 1,08 b   |
| <b>Ciboulette</b>        | 45,39 ± 0,42 b      |                   | 50,10 ± 0,99 b      |                   | 47,75             | 2088,20 ± 15,90 a     | 2,01 ± 0,20<br>b   | 0,43 ± 0,01<br>b  | 122,41 ± 24,62 a | 64,70 ± 4,24 b    | 12,25 ± 1,11 a   | 6,00 ± 0,00<br>e  | 16,35 ± 0,45 b   |
| <b>Cebolla</b>           | 46,71 ± 12,22 b     |                   | 116,65 ± 0,98 a     |                   | 81,68             | 361,80 ± 147,90 d     | 0,53 ± 0,04<br>f   | 0,04 ± 0,02<br>e  | 22,23 ± 7,69 c   | 26,22 ± 0,99 c    | 0,21 ± 0,01<br>d | 8,13 ± 0,64<br>d  | 7,81 ± 0,22<br>c |
| <b>Cebolla de verdeo</b> | 113,82 ± 2,47 a     |                   | 113,22 ± 2,18 a     |                   | 113,52            | 294,90 ± 77,80 d      | 1,04 ± 0,02<br>e   | 0,20 ± 0,04<br>d  | 25,79 ± 4,02 c   | 16,69 ± 1,18 cd   | 1,33 ± 0,21<br>c | 10,66 ± 1,28 c    | 12,83 ± 6,04 b   |
| <b>Puerro</b>            | 114,89 ± 3,29 a     |                   | 117,26 ± 7,42 a     |                   | 116,08            | 247,5 ± 16,70 d       | 1,34 ± 0,07<br>d   | 0,33 ± 0,01<br>bc | 26,26 ± 2,98 c   | 0,94 ± 0,01<br>e  | 2,01 ± 0,07<br>c | 8,66 ± 0,30<br>cd | 15,74 ± 2,33 b   |
| <b>Flavonoides</b>       |                     |                   |                     |                   |                   | <b>No Flavonoides</b> |                    |                   |                  |                   |                  |                   |                  |
| Especie                  | EGCg                | EGC + ECg         | Rutina              | Quercetina        | Kaempferol        | Catequina             | Miricetina         |                   |                  |                   |                  |                   |                  |
|                          |                     |                   |                     |                   |                   |                       |                    | Ácido Clorogénico | Ácido Coumarico  | Ácido Ferúlico    | Ácido Cafeico    |                   |                  |
| <b>Ajo</b>               | nd                  | 9,14 ± 0,58 b     | nd                  | nd                | 0,50 ± 0,07<br>c  | 1,15 ± 0,02<br>b      | nd                 | nd                | nd               | 0,22 ± 0,01<br>bc | 1,99 ± 0,22<br>b | 1,79 ± 0,14<br>a  |                  |
| <b>Shallot</b>           | 14,80 ± 2,92<br>a   | 22,21 ± 4,44<br>a | nd                  | 52,12 ± 7,60<br>a | 2,90 ± 0,26<br>b  | 0,38 ± 0,10<br>c      | 50,00 ± 10,93<br>a | nd                | nd               | nd                | nd               | nd                |                  |
| <b>Ciboulette</b>        | nd                  | 24,83 ± 2,96<br>a | 1,41 ± 0,07<br>b    | 3,86 ± 0,42<br>bc | 15,24 ± 2,97<br>a | 1,42 ± 0,08<br>a      | 17,94 ± 1,58<br>b  | 1,08 ± 0,11<br>a  | 0,44 ± 0,08<br>a | 10,56 ± 1,24<br>a | 0,18 ± 0,01<br>b |                   |                  |

|                          |                  |                    |                  |                  |                   |                   |               |                  |                  |                   |                  |
|--------------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| <b>Cebolla</b>           | 7,99 ± 0,73<br>b | 4,46 ± 0,67 c      | 0,17 ± 0,09<br>c | 8,53 ± 2,31<br>b | 1,05 ± 0,24<br>b  | 0,18 ± 0,004<br>d | 3,85 ± 0,12 c | nd               | 0,01 ± 0,01<br>d | 0,20 ± 0,00<br>d  | nd               |
| <b>Cebolla de verdeo</b> | nd               | 5,32 ± 0,002<br>bc | 8,69 ± 0,88<br>a | 0,19 ± 0,04<br>c | 2,04 ± 0,38<br>b  | 0,44 ± 0,04<br>c  | nd            | 0,31 ± 0,08<br>b | 0,20 ± 0,01<br>c | 0,83 ± 0,12<br>c  | nd               |
| <b>Puerro</b>            | nd               | nd                 | nd               | 0,07 ± 0,01<br>c | 0,30 ± 0,001<br>c | 0,24 ± 0,02<br>d  | 0,32 ± 0,01 d | nd               | 0,29 ± 0,05<br>b | 1,62 ± 0,13<br>bc | 0,09 ± 0,02<br>b |

Los datos están expresados como media ± desviación estándar. Para cada variable, letras diferentes indican valores significativamente distintos según Fisher ( $P < 0,05$ ). El contenido de piruvato (PV) se expresó como mmol % g pf; los fenoles totales (FTs) como mg ácido gálico % g pf; los sólidos soluble (SS) como °Brix; los sólidos totales (ST) como %; los tiosulfatos (TS) como mmol TSs % g pf; los flavonoides totales (FL) y no-flavonoides totales (NFL) como mg % g pf; la actividad antioxidante (AOXA) en  $\mu\text{mol TE \% g pf}$ ; la actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV) para ambos donantes como  $\text{IC}_{50}$  (mg pf/ mL sangre entera). La concentración de los compuestos fenólicos está en mg % g pf. nd: no detectado.

A pesar de que las condiciones experimentales difirieron significativamente respecto de los estudios previos, y por lo tanto los resultados no son directamente comparables, los valores de IC<sub>50</sub> presentados en este estudio para ajo y cebolla están en concordancia con reportes previos tales como los de Ali (1999), que utilizó plasma rico en plaquetas (PRP) en lugar de sangre entera para medir la AAIV. En ese estudio, la fuerza antiplaquetaria en ajo y cebolla resultó ser ~ 16 veces diferente, con valores de IC<sub>50</sub> de 6,6 a 90 mg / mL PRP para ajo y cebolla, respectivamente, mientras que en el presente estudio el ajo resultó ser ~ 22 veces más potente inhibidor de la agregación plaquetaria que la cebolla, mientras que los valores de IC<sub>50</sub> fueron de 3,6 a 81,6 mg pf/ mL de sangre entera, respectivamente (Tabla 13). Las actividades antiplaquetarias reportadas aquí para ajo y cebolla son también comparables con los valores hallados en otros estudios previos (Gonzalez, Soto, Sance, Camargo, & Galmarini, 2009; Sance, González, Soto, & Galmarini, 2008; Galmarini et al., 2001; Pablo F. Cavagnaro et al., 2007; Pablo F. Cavagnaro & Galmarini, 2012).

A pesar de que en este estudio el análisis de la varianza arrojó que no existían interacciones donante-AAIV, si se encontraron diferencias significativas en la agregación plaquetaria para ambos donantes en dos especies. Para el donante 2, la AAIV inducida por extractos de cebolla y shallot fue más débil que para el donante 1. La variación en la respuesta a la agregación entre donantes ha sido previamente reportada (Galmarini, 2000) frente a la adición de extractos de cebolla, pero no para shallot.

#### **4.3.2. Variación en las propiedades antioxidantes entre Alliums**

Se detectó actividad antioxidante (AOXA) en los 6 *Allium* estudiados y se encontraron variaciones significativas para la AOXA entre las especies. Los valores medios de AOXA variaron más de 8 veces y fueron de 247 μmol TE % g pf (para puerro) a 2088 μmol TE % g pf (para ciboulette) (Tabla 13).

El orden decreciente para AOXA fue ciboulette > shallot > ajo > cebolla < cebolla de verdeo > puerro. El ciboulette resultó ser –significativamente– más potente antioxidante que el resto de las especies (p < 0,05), con valores de AOXA entre 5,8 a 8,4 veces mayor que los antioxidantes más débiles cebolla, cebolla de verdeo y puerro (Tabla 13).

Nuestros resultados de AOXA están en concordancia con reportes previos. Morales-Soto (2014) encontró rangos de AOXA de 830-4300  $\mu\text{mol TE \% g}$  peso seco y de 520-13000  $\mu\text{mol TE \% g}$  peso seco para ajo y cebolla, respectivamente. Para puerro, los valores de ORAC variaron de 27 a 88  $\mu\text{mol TE \% g}$  peso seco de acuerdo a Bernaert (2012) y Kameya (2014) reportó un valor de ORAC para cebolla de verdeo de  $\sim 50 \mu\text{mol TE \% g}$  peso seco. Los rangos para AOXA previamente reportados para puerro y cebolla de verdeo son levemente superiores a los reportados aquí, estas discrepancias podrían deberse a diferencias composicionales entre los cultivares estudiados, a diferencias en el contenido de agua (o el contenido de materia seca) y a diferentes prácticas agronómicas y condiciones ambientales del cultivo en cada estudio.

Este estudio constituye el primer reporte de actividad antioxidante para puerro y cebolla de verdeo. Además, representa el primer análisis comparativo de AOXA entre las principales hortalizas del género *Allium* bajo las mismas condiciones experimentales (ORAC).

#### **4.3.3 Relaciones entre las propiedades funcionales de aliáceas y el contenido de compuestos bioactivos**

Los datos del análisis composicional de las partes comestibles de las 6 aliáceas estudiadas se exponen en la tabla 13. Para estudiar las relaciones entre el contenido de cada uno de los compuesto bioactivos y las propiedades antioxidantes y antiplaquetarias de cada *Allium*, se realizaron análisis de correlación entre AAIIV, AOXA y la concentración de cada compuesto (Tablas 14 y 15.). Se encontraron correlaciones significativas y positivas entre AAIIV y piruvato ( $r = 0,74$ ), fenoles totales ( $r = 0,73$ ), y tiosulfatos ( $r = 0,60$ ), mientras que no se encontró asociación entre AAIIV y el contenido de compuestos no flavonoides (Tabla 14).

**Tabla 14.** Valores de correlación (r) entre piruvato (PV), fenoles totales (FTs), sólidos solubles (SS), sólidos totales (ST), tiosulfinatos (TS), flavonoides totales (FL), no-flavonoides totales (NFL), actividad antioxidante (AOXA) y actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV).

|                | PV      | FTs     | SS      | ST      | TS      | AOXA    | AAIV 1 (IC 50) | AAIV 2 (IC 50) |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------|----------------|
| FTs            | 0,57 *  |         |         |         |         |         |                |                |
| SS             | 0,77**  | 0,20    |         |         |         |         |                |                |
| ST             | 0,95**  | 0,35    | 0,84**  |         |         |         |                |                |
| TS             | 0,83**  | 0,14    | 0,93**  | 0,91**  |         |         |                |                |
| AOXA           | 0,67**  | 0,91**  | 0,22    | 0,44    | 0,27    |         |                |                |
| AAIV 1 (IC 50) | 0,58 *  | 0,68**  | 0,59*   | 0,47*   | 0,51*   | 0,70 ** |                |                |
| AAIV 2 (IC 50) | 0,89 ** | 0,78 ** | 0,83 ** | 0,78 ** | 0,69 ** | 0,82 ** | 0,84 **        |                |
| AAIV media     | 0,74    | 0,73    | 0,78    | 0,63    | 0,60    | 0,76    |                |                |
| FL             | 0,09    | 0,77 ** | - 0,07  | - 0,12  | - 0,29  | 0,60 *  | 0,55 *         | 0,45           |
| NFL            | 0,43    | 0,49 *  | - 0,15  | 0,28    | 0,11    | 0,69 ** | 0,11           | 0,33           |

\* p < 0,05 y \*\* p < 0,01

Las diferencias halladas son debidas posiblemente a las variaciones composicionales en los compuestos antiplaquetarios entre las especies de *Allium* estudiadas. Las aliáceas difieren en sus perfiles de compuestos organoazufrados, tanto en las concentraciones como en el tipo de compuestos (Block, 2010) y se ha comprobado que los tiosulfinatos aislados en diferentes *Alliums* tienen AAIV diferencial, siendo la alicina, el tiosulfinato predominante en ajo, el inhibidor más fuerte de la agregación plaquetaria (Briggs et al., 2000). En este estudio, el ajo resultó ser el agente antiagregante más potente, con valores de AAIV de 6 a 40 veces mayores respecto de las demás especies estudiadas aquí. Además, el ajo posee significativamente mayor contenido de piruvato y de tiosulfinatos que el resto de las especies. Estos datos, junto con las correlaciones positivas encontradas entre AAIV y PV (r = 0,74) y entre AAIV y TS (r = 0,60) sugieren que los compuestos organoazufrados están implicados en la AAIV de las especies del género *Allium*.

Se han reportado actividades antiplaquetarias en compuestos fenólicos tales como los flavonoides (Hubbard et al., 2006; Ro, Ryu, Park, & Cho, 2015). Concordantemente, en este estudio se encontraron correlaciones positivas y significativas entre AAIV y fenoles totales (r = 0,78) y entre AAIV y seis compuestos fenólicos (r = 0,49-0,68), sugiriendo que los compuesto fenólicos también estarían implicados en la AAIV de los *Allium*. Las

mayores asociaciones se encontraron con el ácido cafeico ( $r = 0,68$ ), con la catequina ( $r = 0,67$ ), y con EGC + ECg ( $r = 0,59-0,64$ ) (Tabla 15). En conjunto, nuestros datos sugieren que tanto los compuestos fenólicos como los azufrados están involucrados en la actividad antiplaquetaria de los Alliums. Además, es posible que las interacciones entre muchos de estos compuestos pueda jugar un rol importante al determinar la actividad antiplaquetaria total de aliáceas.

La actividad antioxidante de las especies estudiadas se correlacionó positivamente con el contenido de fenoles totales ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,001$ ) sugiriendo que los compuestos fenólicos están muy implicados en la capacidad antioxidante en especies de Aliáceas. Concordantemente, la actividad antioxidante se correlacionó además positivamente con flavonoides totales ( $r = 0,60$ ) y con los compuestos no flavonoides totales ( $r = 0,69$ ) (Tablas 14 y 15).

**Tabla 15.** Valores de correlación ( $r$ ) entre las capacidades antioxidantes y antiplaquetarias de aliáceas y el contenido de 11 compuestos fenólicos.

|                                     | ECGg  | EGC +<br>ECg | Rutina    | Quer<br>cetina | Kaem<br>pferol | Cate<br>quina | Mirice<br>tina | Ácido<br>Cloro<br>génico | Ácido<br>Cumá<br>rico | Ácido<br>Cafei<br>co | Ácido<br>Ferúli<br>co |
|-------------------------------------|-------|--------------|-----------|----------------|----------------|---------------|----------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>AOXA</b>                         | 0,13  | 0,91<br>**   | 0,33      | 0,33           | 0,71 **        | 0,80 **       | 0,55 **        | 0,57 *                   | 0,32                  | 0,28                 | 0,67 **               |
| <b>AAIV 1<br/>(IC<sub>50</sub>)</b> | 0,49* | 0,59 *       | 0,57<br>* | 0,51<br>*      | 0,13           | 0,41          | 0,50           | 0,07                     | 0,31                  | 0,50 *               | 0,06                  |
| <b>AAIV 2<br/>(IC<sub>50</sub>)</b> | 0,16  | 0,64<br>**   | 0,38      | 0,35           | 0,23           | 0,67 **       | 0,43           | 0,10                     | 0,07                  | 0,68 **              | 0,25                  |

\*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$

Estos resultados están en concordancia con estudios previos en puerro (Bernaert et al., 2012) y en otra aliáceas (Nencini, Menchiari, Franchi, & Micheli, 2011) que reportaron correlaciones positivas significativas entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Adicionalmente se realizaron análisis de correlación entre fenoles individuales y actividad antioxidante encontrándose correlaciones positivas significativas entre AOXA y EGC + ECg ( $r = 0,91$ ), catequina ( $r = 0,80$ ), kaempferol ( $r = 0,71$ ), ácido ferúlico ( $r = 0,67$ ), ácido

clorogénico ( $r = 0,57$ ) y miricetina ( $r = 0,55$ ). Concordantemente, en ciboulette, la especie más antioxidante, se hallaron concentraciones de EGC + ECg, catequina, kaempferol, ácido ferúlico y ácido clorogénico significativamente superiores respecto del resto de las especies estudiadas.

Interesantemente, las especies más antioxidantes fueron ciboulette y shallot, pero sus perfiles fenólicos resultaron muy diferentes (Tabla 13) sugiriendo que los compuestos fenólicos individuales difieren en la fuerza antioxidante. Balasundram (2006) propuso que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura química, en particular el número y la naturaleza de los sustituyentes en los anillos aromáticos. Nuestros resultados sugieren que la capacidad antioxidante de las aliáceas depende no solo de su estructura química, sino también de la concentración de cada compuesto y de las combinaciones e interacciones entre ellos.

Estudios futuros que consideren el efecto antioxidante de compuestos fenólicos individuales, sus combinaciones y posibles interacciones entre sí, serían interesantes para clarificar la contribución de cada compuesto en la AOXA total de cada especie del género *Allium*.

Además del rol aparente de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante de aliáceas, se encontraron correlaciones significativas entre AOXA y el contenido de piruvato ( $r = 0,67$ ) (Tabla 14), sugiriendo que los compuestos organoazufrados podrían también estar involucrados en la AOXA. A pesar de que (Block, 2010) reportó que la allicina y otros tiosulfatos son antioxidantes, no se encontraron correlaciones entre AOXA y los TSs.

#### **4.3.4. Análisis de componente principales (ACP)**

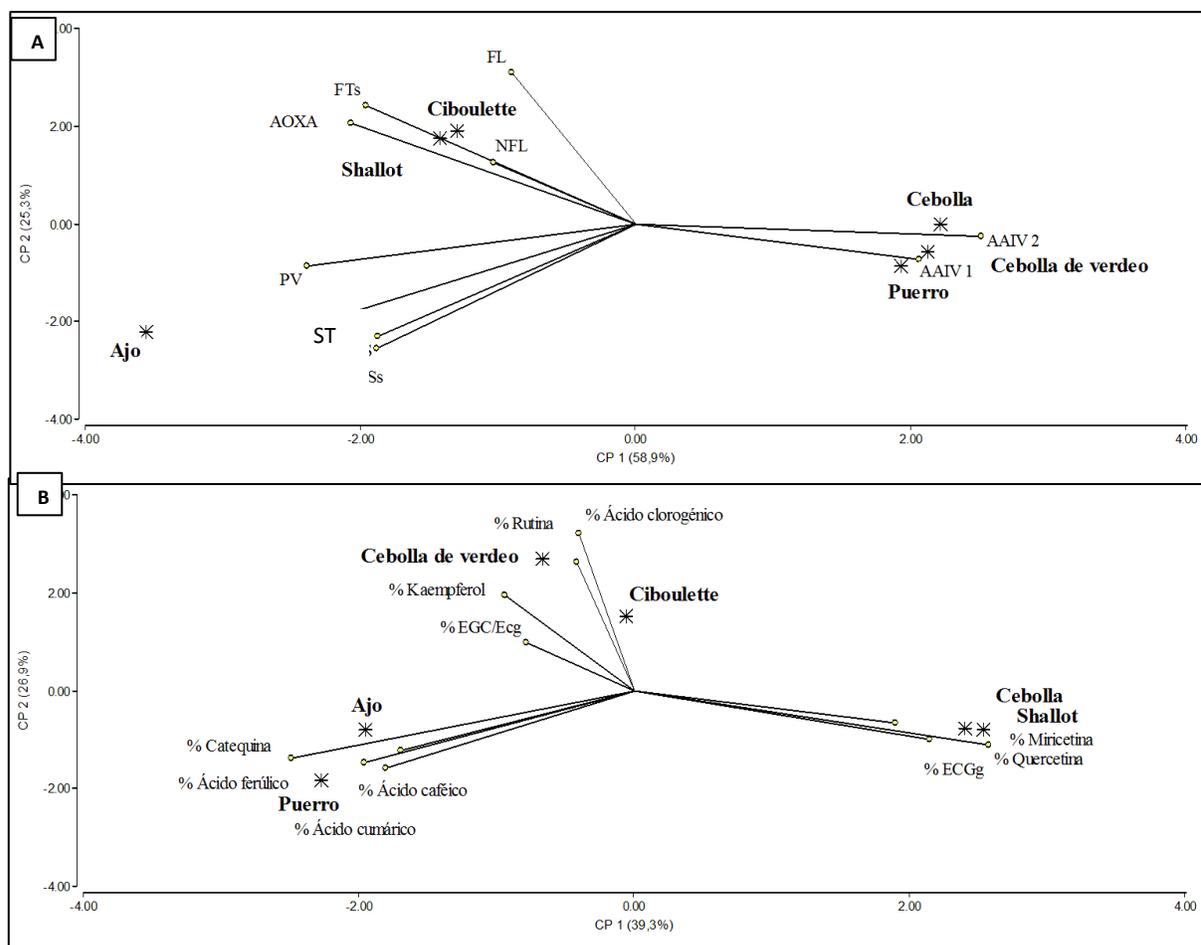
El ACP se realizó en el conjunto de variables estudiadas en las 6 especies de *Allium*. La dimensionalidad de los datos se redujo de 8 variables parcialmente correlacionadas a 2 componentes principales (CP) no correlacionados denominados CP1 y CP2, explicando el 84,2% de la variabilidad observada. Los autovectores, autovalores y el % de variabilidad explicada se presentan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Autovalores, autovectores y % de varianza acumulada para el análisis de componentes principales del conjunto total de datos (ACP1) y del perfil fenólico (ACP2) para las 6 especies de *Allium* analizadas.

|             | <b>Variable</b>                     | <b>CP 1</b>                 | <b>CP 2</b>  |
|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------|
| <b>ACP1</b> | Actividad antiplaquetaria donante 2 | 0,41                        | -0,13        |
|             | Piruvato                            | -0,39                       | -0,09        |
|             | Materia seca                        | -0,35                       | -0,29        |
|             | Actividad antioxidante              | -0,34                       | 0,47         |
|             | Actividad antiplaquetaria donante 1 | 0,33                        | -0,21        |
|             | Fenoles totales                     | -0,32                       | 0,53         |
|             | Tiosulfatos                         | -0,31                       | -0,43        |
|             | Sólidos solubles                    | -0,30                       | -0,40        |
|             | Flavonoides totales                 | -0,15                       | 0,50         |
|             | No flavonoides totales              | -0,17                       | 0,20         |
|             |                                     | <b>% varianza acumulada</b> | <b>58,9%</b> |
|             | <b>Variable</b>                     | <b>CP 1</b>                 | <b>CP 2</b>  |
| <b>ACP2</b> | % Quercetina                        | 0,45                        | -0,19        |
|             | % Catequina                         | -0,43                       | -0,24        |
|             | % EGCg                              | 0,37                        | -0,17        |
|             | % Ácido Ferulico                    | -0,34                       | -0,26        |
|             | % Miricetina                        | 0,33                        | -0,12        |
|             | % Ácido Cumárico                    | -0,31                       | -0,28        |
|             | % Ácido Caféico                     | -0,30                       | -0,21        |
|             | % Kaempferol                        | -0,16                       | 0,34         |
|             | % EGC + ECg                         | -0,14                       | 0,17         |
|             | % Rutina                            | -0,07                       | 0,46         |
|             | % Ácido Clorogénico                 | -0,07                       | 0,56         |
|             | <b>% varianza acumulada</b>         | <b>39,3%</b>                | <b>66,2%</b> |

El CP1 se correlacionó positivamente con AAIV y negativamente con las siguientes variables en orden decreciente: piruvato, materia seca, AOXA, fenoles totales, tiosulfatos, sólidos solubles y flavonoides totales. El CP2 se correlacionó con fenoles totales, flavonoides y AOXA. La variación de los datos está explicada principalmente por AAIV, piruvato, materia seca, tiosulfatos y sólidos solubles y, en menor medida por el contenido de fenoles totales y AOXA. La representación gráfica de los autovectores y autovalores se visualiza en la figura 37 A, revelando una clara segregación de las especies de *Allium*

analizadas. El ajo se ubicó en el cuadrante inferior izquierdo, el cual está caracterizado por altos contenidos de piruvato, sólidos y tiosulfatos y alta AAIIV. La cebolla, el puerro y la cebolla de verdeo se ubicaron en el cuadrante inferior derecho, caracterizado por valores bajos de AAIIV, piruvato, sólidos, materia seca y tiosulfatos. El shallot y el ciboulette se diferenciaron claramente del resto de las especies presentando alta actividad antioxidante y contenido de fenoles totales. El análisis de componentes principales corroboró las fuertes correlaciones halladas previamente entre AOXa y fenoles totales y entre AAIIV y piruvato, sólidos solubles y totales y tiosulfatos (Tabla 14).



**Figura 37.** Análisis de componentes principales. (A) Análisis de componentes principales del conjunto de datos(ACP1) incluyendo piruvato (PV), compuestos fenólicos totales (FTs), sólidos solubles (SS), sólidos totales (ST), tiosulfatos (TS), flavonoides totales (FL), no flavonoides totales (NFL), actividad antioxidante (AOXA), actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV) para ambos donantes analizada como IC<sub>50</sub>. (B) Análisis de

componentes principales del perfil fenólico (ACP2) expresado como proporción relativa (%) de cada compuesto.

La figura 37 B representa el ACP del perfil fenólico de las especies de *Allium* estudiadas. Los autovectores, autovalores y el % de variabilidad explicada se presentan en la tabla 16. Once variables parcialmente correlacionadas se redujeron a 2 componentes principales que explicaron el 66% de la variación. El CP1 se correlacionó principalmente con el contenido de quercetina, catequina, EGCg, ácido ferúlico y miricetina. El CP2 se correlacionó principalmente con ácido clorogénico, rutina y kaempferol. Se observó una clara separación de las especies estudiadas de acuerdo al perfil fenólico. La cebolla y el shallot se ubicaron en el cuadrante inferior derecho del gráfico, caracterizado por alta proporción de quercetina y EGCg. El ajo y el puerro se ubicaron en el cuadrante inferior izquierdo, caracterizado principalmente por alta contenido relativo de catequina. Además el ciboulette y la cebolla de verdeo se ubicaron en los cuadrantes superiores caracterizados por altos contenidos de ácido clorogénico, rutina y kaempferol. La figura 37 B muestra una clara separación de las especies estudiadas de acuerdo a su perfil fenólico, permitiendo agrupar a las especies por perfiles similares.

#### **4.4. Conclusiones**

Seis especies de *Allium* se caracterizaron comparativamente por sus actividades antioxidantes y antiplaquetarias y su contenido de compuestos bioactivos. Bajo nuestras condiciones experimentales, el ajo y el shallot resultaron ser los agentes antiplaquetarios más potentes, consistentemente para ambos donantes de sangre, mientras que el ciboulette y el shallot exhibieron la mayor capacidad antioxidante. El puerro, la cebolla de verdeo y la cebolla resultaron ser las especies antiplaquetarias y antioxidantes más débiles. Los resultados del análisis de correlación sugieren fuertemente que los compuestos organoazufrados y fenólicos están involucrados, en diferente medida, en ambas propiedades funcionales. Mientras que los compuestos organoazufrados y fenólicos contribuyen de manera equitativa en la actividad antiplaquetaria, los compuestos fenólicos contribuyen mucho más que los azufrados al determinar la actividad antioxidante de las aliáceas. Estudios futuros que consideren las propiedades antiplaquetarias y antioxidantes de cada compuesto fenólico y azufrado de manera individual y las combinaciones entre

ellos (que revelen posibles efectos sinérgicos) serían muy útiles para clarificar el rol y la contribución de estos compuestos en las propiedades funcionales de las aliáceas. Por otro lado, determinar la capacidad antioxidante de esta especie de aliáceas por diferentes metodologías también sería importante, ya que existe evidencia de que la actividad de los antioxidantes en alimentos y sistemas biológicos depende de una multitud de factores, incluyendo la composición del sistema, los tipos de sustratos oxidables, las propiedades coloidales de los sustratos, las condiciones, los estados de oxidación y la localización de antioxidantes en las diferentes fases del sistema y el método de determinación y cuantificación de la oxidación, entre otros (Frankel & Meyer, 2000).

En este estudio, la capacidad antiplaquetaria para shallot y ciboulette y la antioxidante para ciboulette y cebolla de verdeo son reportadas por primera vez.

## CAPÍTULO 5

### **Interferencias en la determinación espectrofotométrica de piruvato en cebolla.\***

\*Basado en el artículo: “Errors in spectrophotometric pyruvate analyses for predicting onion pungency and nutraceutical value” Hebe Vanesa Beretta, Florencia Bannoud, Claudio Rómulo Galmarini and Pablo Federico Cavagnaro. Enviado a la revista *Food Chemistry* para su publicación.

## 5.1. Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una especie cultivada y consumida en todo el mundo, principalmente debido a su distintivo sabor. Además, la cebolla y otros alliums, como el ajo (*Allium sativum* L.) y el puerro (*Allium porrum* L.) son consumidos por sus propiedades benéficas para la salud. Entre ellas se han descrito propiedades antiplaquetarias, hipolipidémicas, hipotensivas, antioxidantes, hipoglucémicas, anticancerígenas y antimicrobianas en diferentes especies del género *Allium* (revisión por Corzo-Martínez, Corzo, & Villamiel, 2007) las cuales han permitido el reconocimiento de los alliums como alimentos funcionales.

Una importante característica de los alliums es su pungencia, la cual ha sido descrita como sensaciones de picor y quemazón (Macpherson et al., 2005). Los compuestos responsables de la pungencia se forman luego de la interacción entre la allinasa y los precursores del sabor S-alquencil-L-cistein sulfóxidos (ACSOs) luego de la disrupción de los tejidos frescos (Lancaster & Boland, 1990). Esta reacción da origen a ácidos sulfénicos, amonio y piruvato. Estos ácidos sulfénicos son muy inestables y rápidamente reaccionan de a pares para formar los tiosulfatos (TSs) (Block, 2010). Los tiosulfatos son responsables de la pungencia de las aliáceas (Macpherson et al. 2005) y junto con otros compuestos azufrados derivados de la degradación de los tiosulfatos, contribuyen en gran medida a las propiedades benéficas de los alliums (Corzo-Martínez et al., 2007). Debido a que tanto el piruvato como los tiosulfatos se forman en cantidades equimolares en la reacción ACSOs-allinasa, el contenido de piruvato se correlaciona positivamente con la intensidad de la pungencia (Wall & Corgan, 1992) y es comúnmente usado como un estimador del contenido total de TSs (Goldman, Schwartz, & Kopelberg, 1995). Debido a esto, el contenido de piruvato es tradicionalmente usado (por productores, mejoradores y empresas) para predecir tanto el sabor como el valor nutracéutico del ajo y la cebolla.

Actualmente, la metodología más comúnmente utilizada para la determinación de piruvato en aliáceas ha sido el método de Schwimmer & Weston (1961) (SW). A modo de ejemplo, solo en ajo y cebolla existen por lo menos 56 reportes científicos en los que ha sido usado este protocolo (Tabla 17).

**Tabla 17.** Lista de publicaciones científicas que utilizan el método SW para determinar el contenido de piruvato en cebolla.

| Materiales vegetales | Número de cultivares blancos | Rango de piruvato * | Número de cultivares coloreados § | Rango de piruvato * | Referencias                         |
|----------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 1 cultivares         | 1                            | 0.5 - 9             | 0                                 | 0                   | Freeman & Mossadeghi, 1970          |
| 6 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,5 - 7,5           | Wall & Corgan, 1992                 |
| 62 cultivares        | nd                           | nd                  | nd                                | 3,3 - 13,0          | Randle, 1992                        |
| 16 cultivares        | nd                           | nd                  | nd                                | 2,2 - 5,6           | Randle & Bussard, 1993              |
| 6 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 2,2 - 3,4           | Vavrina & Smittle, 1993             |
| 1 cultivares         | 0                            | 0                   | 1                                 | 3,0 - 7,1           | Croci, Banek, & Curzio, 1995        |
| 3 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 0,2 - 0,8           | Yoo Kil-Sun, Pike, & Hamilton, 1995 |
| 36 poblaciones       | nd                           | nd                  | nd                                | 8,0 – 13,0          | Lin, Watson, & Baggett, 1995        |
| 8 poblaciones        | nd                           | nd                  | nd                                | 4,2 – 13,0          | Simon, 1995                         |
| 1 cultivares         | 0                            | 0                   | 1                                 | 9,2 - 20,3          | Hanum, 1995                         |
| 58 poblaciones       | nd                           | nd                  | nd                                | 3,03 - 4,85         | Wall, Mohammad, & Corgan, 1996      |
| 8 cultivares         | 2                            | 7.5 - 12.8          | 6                                 | 6,3 - 12,4          | Kopsell, 1997                       |
| 6 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 1,5 - 6,9           | Hamilton, Pike, & Yoo, 1997         |
| 4 cultivares         | 1                            | 06-jul              | 3                                 | 5,0 – 8,0           | Boyhan et al., 1999                 |
| 13 cultivares        | nd                           | nd                  | nd                                | 3,9 - 7,9           | Alcala, K.S., Pike, & Jones, 1998   |
| 1 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 2,5 - 5,9           | Hamilton, Sun Yoo, & Pike, 1998     |
| 2 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 2,8 - 8,5           | Lancaster et al., 1998              |
| 5 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,5 - 8,0           | Yoo & Pike, 1999                    |
| 3 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 4 - 11              | Bacon et al., 1999                  |
| 4 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,3 - 8,8           | Debaene et al., 1999                |
| 1 cultivares         | 0                            | 0                   | 1                                 | 6,4 - 7,9           | Randle, 2000                        |
| 1 cultivares         | 0                            | 0                   | 1                                 | 3,2 - 6,0           | Benkeblia, 2000                     |
| 54 poblaciones       | nd                           | nd                  | nd                                | 3,6 - 12,2          | Galmarini et al., 2001              |
| 2 cultivares         | 0                            | 0                   | 2                                 | 6,6 - 13,9          | Abbey et al., 2001                  |
| 6 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,6 - 10,9          | Havey et al., 2002                  |
| 1 cultivares         | 0                            | 0                   | 1                                 | 3,7 - 5,2           | Randle et al., 2002                 |
| 1 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,8 - 7,2           | Coolong & Randle, 2003a             |
| 2 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,52 - 5,5          | Coolong & Randle, 2003b             |
| 1 cultivares         | 0                            | 0                   | 1                                 | 6,41 - 7,11         | Uddin & MacTavish, 2003             |
| 16 cultivares        | nd                           | nd                  | nd                                | 4,5 - 9,5           | Resemann et al., 2004               |
| 9 cultivares         | nd                           | nd                  | nd                                | 3,0 - 9,0           | Crowther et al., 2005               |

|                |    |           |    |            |                                  |
|----------------|----|-----------|----|------------|----------------------------------|
| 2 cultivares   | nd | nd        | nd | 0,3 - 0,6  | McCallum et al., 2005            |
| 3 cultivares   | nd | nd        | nd | 9,3 - 15,8 | Pezzutti et al., 2005            |
| 8 cultivares   | nd | nd        | nd | 0,4 - 1,0  | Abayomi et al., 2006             |
| 60 individuos  | nd | nd        | nd | 5 - 12,8   | Guo et al., 2006                 |
| 15 cultivares  | nd | nd        | nd | 1,8 - 6,3  | Kil Sun Yoo et al., 2006         |
| 3 cultivares   | nd | nd        | nd | 3,3 - 8,8  | Dhume et al. 2007                |
| 4 cultivares   | nd | nd        | nd | 4,4 - 7,08 | McCallum et al., 2007            |
| 8 cultivares   | 2  | 4.8 - 7.4 | 6  | 2,7 - 5    | Sance et al., 2008               |
| 6 cultivares   | nd | nd        | nd | 5,2 - 1,6  | Galdon et al., 2008              |
| 4 cultivares   | nd | nd        | nd | 2,0 - 8,5  | Liu, He, Feng, & Chen, 2009      |
| 9 cultivares   | 1  | 7.2 - 8.3 | 8  | 1,9 - 7.2  | Lee, Yoo, Jifon, & Patil, 2009   |
| 2 cultivares   | 0  | 0         | 2  | 4,6 - 8,6  | Slimestad & Vågen, 2009          |
| 2 cultivares   | 1  | 8.24      | 1  | 11,37      | Elhassaneen & Sanad, 2009        |
| 4 cultivares   | 1  | 6.5 - 9   | 3  | 3,8 - 6,5  | Lee et al., 2009                 |
| 5 cultivares   | 1  | 0.5 - 18  | 4  | 0,4 - 8    | Abrameto et al., 2010            |
| 9 cultivares   | nd | nd        | nd | 2,9 - 4,7  | Moon et al., 2000                |
| 28 cultivares  | 11 | 6.7 - 8.2 | 17 | 3,8 - 11,6 | Kil Sun Yoo, Lee, & Patil, 2011  |
| 3 cultivares   | 1  | 3.7       | 2  | 6,4 - 11,8 | Kil Sun Yoo, Lee, & Patil, 2011b |
| 86 cultivares  | nd | nd        | nd | 2,7 - 13,1 | Mallor et al., 2011              |
| 97 poblaciones | 26 | 4.3 - 7.8 | 71 | 4,6 - 11,7 | Gallina et al., 2012             |
| 1 cultivares   | nd | nd        | nd | 3,7 - 7,0  | Bolandnazar et al., 2012         |
| 7 cultivares   | 1  | 8.78      | 6  | 0,4 - 0,9  | Kim et al., 2012                 |
| 1 cultivares   | nd | nd        | nd | 3,1 - 7,0  | Kil S. Yoo, Lee, & Patil, 2012   |
| 18 cultivares  | nd | nd        | nd | 6,8 - 15,3 | Chattopadhyay et al., 2013       |
| 6 cultivares   | nd | nd        | nd | 2,3 - 3,3  | Jeon, Kim, Lee, & Kim, 2014      |

\*Los valores de piruvato están expresados en ( $\mu\text{mol} / \text{g}$  peso fresco (pf)). <sup>§</sup> Los cultivares coloreados incluyen variedades amarillas y rojas.

Este método basado en espectrofotometría, es relativamente rápido y económico, y debido a esto ha sido adoptado ampliamente. Este método determina los grupos carbonilos derivados de las moléculas de piruvato que reaccionan con DNPH (2,4-dinitrofenil-hidracina) en extractos acuosos de cebolla o ajo. La unión de los grupos carbonilos con la DNPH da origen a un complejo coloreado que absorbe luz a 420 nm.

Anthon & Barrett (2003), (AB) propusieron modificaciones al comúnmente usado método SW, consistentes en cambios en las concentraciones de los reactivos y en la longitud de

onda de la medición, a 515 nm en lugar de a 420 nm. Los autores propusieron que estas modificaciones aumentaban la linealidad y la sensibilidad de los ensayos y que eliminaban la interferencia por compuestos coloreados presentes en cebolla que absorbían luz a 420 nm diferentes del piruvato.

Dada la amplia utilización del método SW a nivel mundial, el objetivo del presente trabajo fue corroborar la existencia de compuestos interferentes, tal como fue planteado por Anthon y Barrett y en caso de hallarla, dilucidar su importancia y naturaleza en diferentes materiales y condiciones de ensayo. Para esto, se comparan dos metodologías basadas en espectrofotometría para la determinación de piruvato denominadas método SW y método AB en una colección diversa de cultivares de cebolla durante tres años de cultivo con el objetivo de identificar la metodología que arrojará los mejores resultados en cada material de estudio. Se identificaron interferencias utilizando el método SW y su magnitud en cebollas de diferente color.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Material vegetal**

Once cultivares de cebolla de diferente coloración y pertenecientes a distintos grupos ecofisiológicos (Tabla 18) fueron caracterizados por sus niveles de piruvato durante tres años utilizando los métodos SW y AB. Nueve de ellos fueron cultivados en la estación experimental de INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) La Consulta, Mendoza, Argentina (33°44'S, 69°07'W) utilizando prácticas agronómicas tradicionales durante las temporadas: 2011-2012, 2013-2014 y 2014-2015 (llamadas de ahora en más 2012, 2014 and 2015 respectivamente). Los cultivares Morada 1 y Morada 2, dos variedades fenotípicamente diferentes, fueron adquiridas en un comercio local en los años 2012 y 2014.

### **5.2.2. Procesado de las muestras**

La preparación de los extractos acuosos a partir de bulbos de cebolla se realizó según (Galmarini et al., 2001). Se utilizaron 3 repeticiones de 5 bulbos cada una. Los bulbos se pelaron y se cortaron longitudinalmente en mitades. Una mitad de cada bulbo se procesó

con agua destilada en una relación 1:1 (peso: volumen) utilizando un procesador hogareño (Braun MR 400 Plus). Los homogenatos se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa hidrólisis de los ACSOs. Luego se filtraron y centrifugaron. Los sobrenadantes claros se recuperaron y se almacenaron a -20°C. El resto de las mitades se utilizó para el análisis de sólidos totales (ST). Para determinar el contenido de ST el material fresco se pesó y se llevó a estufa a 60°C hasta peso constante. Los valores se expresaron como % de materia seca.

### **5.2.3 Determinación de piruvato**

El día del análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron y se diluyeron 80 veces en agua destilada.

Método SW: se siguieron los lineamientos de Schwimmer and Weston (1961). Brevemente, a 2 mL del extracto acuoso diluido se le adicionó 1mL de 0,0125% de DNPH (2,4-dinitrofenilhidracina) (Sigma ultra 99%) en 2N HCl. Las muestras se incubaron a 37°C por 10 minutos. Luego, se les agregaron 5mL de NaOH 0,6 N. La absorbancia se midió a 420 nm en un espectrofotómetro Beckman DU Series 500 UV/Visible. Se construyeron curvas de calibración utilizando soluciones estándar de piruvato de sodio (Sigma ultra 99%). El contenido de piruvato se expresó como  $\mu\text{mol} / \text{g}$  de peso fresco (pf).

Método AB: se siguieron los lineamientos de Anthon y Barrett (2003). El procedimiento fue el mismo que en el método anterior, pero con las siguientes modificaciones: la concentración del DNPH pasó de 0,0125% a 0,25% en 1 N HCL y se agregó 1mL de NaOH 1,5N en lugar de 5 mL 1,5N. Las absorbancias se midieron a 515 nm.

### **5.2.4 Determinación de flavonoides**

El contenido total de flavonoides fue determinado en las 11 variedades de cebolla durante los años 2012 y 2015, de acuerdo a (Yang, Meyers, van der Heide, & Liu, 2004). Se construyeron curvas de calibración utilizando soluciones estándar de quercetina de sodio (Sigma ultra 99%). El contenido de flavonoides se expresó como mg de quercetina % g de peso fresco.

### **5.2.5. Absorbancia de compuestos interferentes**

Para cuantificar la absorbancia de compuestos diferentes al piruvato (es decir, la absorbancia de compuestos que interfieren en la determinación de piruvato), se utilizaron extractos acuosos de 3 cebollas blancas (Refinta 20, Alfredo INTA, y Antártica INTA), 3 amarillas (Grano de Oro, Valcatorce INTA y Navideña INTA) y 2 rojas (Morada1 and Morada2). Se hicieron 5 repeticiones por cultivar, y los extractos acuosos se prepararon como se explicó previamente. Se midió la absorbancia en muestras preparadas siguiendo la metodología de determinación de piruvato, pero sin agregar DNPH para evitar la formación del complejo coloreado DNPH-piruvato. Ya que la molécula de piruvato no absorbe luz en las longitudes de onda utilizadas en ambos métodos, solo compuestos que absorban luz en esas longitudes de onda serán registrados en el espectrofotómetro. Dichos compuestos que están naturalmente presentes en los bulbos de cebolla representan una interferencia en la determinación de piruvato. Se compararon los valores de absorbancia obtenidos por ambos métodos. En todos los casos se utilizó como blanco una muestra a la que se le adicionó agua destilada en lugar del extracto acuoso de cebolla y los mismos reactivos y se siguió el mismo procedimiento analítico que en las muestras de cebolla. Por otro lado, se realizó un barrido espectral (de 400 nm a 550 nm) de extractos de cebollas blancas, amarillas y rojas y de una solución de quercetina con y sin la adición de NaOH en las concentraciones usadas por ambos métodos (0,6N y 1,5N).

### **5.2.6. Identificación de los compuestos interferentes**

Para evaluar si la absorbancia observada en las determinaciones de piruvato de extractos de cebolla coloreadas se debía a compuestos flavonoides, se realizó un experimento complementario. Al extracto acuoso de una cebolla blanca (Refinta 20), caracterizada por su bajo contenido de polifenoles, se le adicionó cantidades de quercetina y antocianos de una concentración equivalente a las cantidades halladas en variedades amarillas y rojas. Se usaron en este experimento las variedades Valcatorce INTA que posee 41,7 mg de quercetina en 100 g de peso fresco y como referencia de cebolla roja se usó a Morada1 cuyo contenido de quercetina es de 269,12 mg % g pf y de cianidina de 23 mg % g pf. Se usaron estándares comerciales de cianidina 3-glucósido y de quercetina aglicona (Sigma ultra 99%). Se midieron las absorbancias a 420 nm. El contenido total de flavonoides y de antocianos se midió espectrofotométricamente de acuerdo a (Yang et al., 2004) y a (Fuleki

& Francis, 1968). Se consideró que la quercetina representaba el 85% del total de flavonoides de acuerdo a lo reportado previamente por (Slimestad, Fossen, & Vågen, 2007).

### **5.2.7 Precisión, linealidad, sensibilidad y exactitud**

Para analizar la precisión de cada método, veinte muestras de un cultivar amarillo se analizaron de acuerdo a los métodos AB y SW, luego se calcularon los coeficientes de variación. El método con menor coeficiente de variación fue considerado el más preciso de acuerdo a Quattrocci (1992).

Para comparar la linealidad de cada método se prepararon soluciones estándar de piruvato en concentraciones de 0,01 a 0,9mM. El rango de concentraciones en cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación con una curva estándar fue determinado utilizando el coeficiente de correlación lineal ( $r$ ) y posteriormente se evaluó la significancia del coeficiente de correlación mediante un test estadístico calculando un valor de  $t_r$  con  $n-2$  grados de libertad y comparado con  $t$  tabulado en un nivel de confianza de 0,05. Si  $t_r < t_{\text{tabla}}$  la correlación lineal resulta significativa (Miller, 2002). Además, la pendiente de la curva de regresión fue utilizada como un indicador de la sensibilidad de cada método. La exactitud de cada método fue calculada de acuerdo a Quattrocci (1992) como % de recuperación (R), calculado como  $\%R = \text{valor hallado/valor real} \times 100$ .

### **5.2.6 Análisis estadísticos**

Análisis de varianza (ANOVA) y de correlación se realizaron usando el software InfoStat versión 2013 para Windows 4.0 (Di Rienzo et al., 2013). La comparación de medias se realizó por el análisis de la diferencia mínima de Fisher (LSD) y los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significantes.

## **5.3 Resultados y discusión**

### **5.3.1. Comparación de contenido total de piruvato usando ambos métodos**

La determinación del contenido de piruvato en cebolla es usada comúnmente como un factor de calidad asociado a la intensidad del sabor y a su valor como alimento funcional

debido a su procedimiento analítico simple y rápido. En este estudio, el contenido de piruvato fue medido por dos métodos espectrofotométricos diferentes (el método SW y el método AB) en cultivares de cebolla de diferente color, orígenes geográficos y composición bioquímica. El método SW arrojó valores de piruvato superiores al método AB en todas las variedades estudiadas durante los 3 años de cultivo (Tabla 18). Sin tener en cuenta el año y el cultivar, el método SW arrojó valores superiores al método AB en 10 de las 31 (32,2%) muestras analizadas. Las diferencias relativas (%) entre los métodos fueron de 3,6 al 65,6%, dependiendo del cultivar y del año. En promedio, los contenidos de piruvato medidos por el método SW fueron 33,6%, 18,5% y 15,7% mayores respecto de los contenidos medidos por el método AB para los años 2012, 2014 y 2015. Estas diferencias fueron siempre significativas (los p valores fueron de 0,0001 a 0,045).

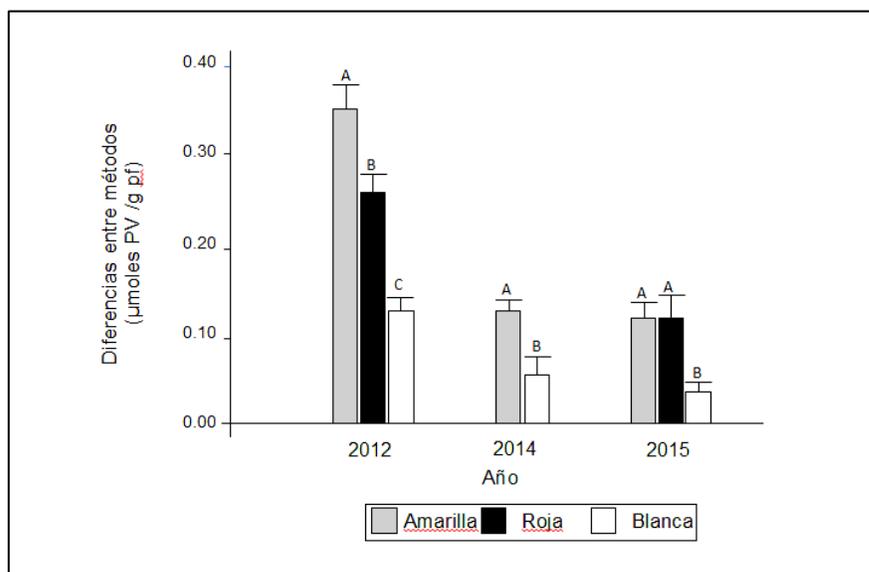
**Tabla 18.** Comparación del contenido de piruvato determinado por el método SW y el método AB para 11 cultivares de cebolla en tres años de cultivo.

|              |          | Concentración de piruvato ( $\mu\text{moles/g pf}$ ) |       |         |          |             |             |      |          |      |             |             |          |        |   |             |             |
|--------------|----------|--|-------|---------|----------|-------------|-------------|------|----------|------|-------------|-------------|----------|--------|---|-------------|-------------|
|              |          | 2012   |       |         |          |             |             | 2014 |          |      |             | 2015        |          |        |   |             |             |
| Cultivar     | Color*   | Req. Fotop. §  | SW    | AB      | (SW- AB) | %R D        | SW          | AB   | (SW- AB) | %R D | SW          | AB          | (SW- AB) | %R D   |   |             |             |
| Refinta 20   | blanco   | día  | 13.50 | ± 12.30 | ±        | 1.20        | 10.2        | 13.0 | ± 11.70  | ±    | 1.40        | 11.9        | 10.18    | ± 9.82 | ± | 0.36        | 3.6         |
|              |          | largo  | 0.65  | 1.06    |          |             |             | 0.20 | 0.50     |      |             |             | 0.41     | 0.60   |   |             |             |
| Antártica    | blanco   | día  | 12.40 | ± 11.10 | ±        | 1.30        | 12.0        | 8.00 | ± 7.00   | ±    | 10.20       | 14.5        | 9.04     | ± 8.60 | ± | 0.44        | 5.1         |
|              |          | largo  | 0.91  | 0.85    |          |             |             | 0.29 | 1.22     |      |             |             | 2.02     | 1.81   |   |             |             |
| Alfredo      | blanco   | día  | 11.70 | ± 10.60 | ±        | 1.20        | 11.0        | 9.75 | ± 9.03   | ±    | 0.72        | 7.9         | 9.06     | ± 8.83 | ± | 0.22        | 2.5         |
|              |          | intermedio   | 0.08  | 0.09    |          |             |             | 1.01 | 0.84     |      |             |             | 0.17     | 0.17   |   |             |             |
| Cobriza      | amarillo | día  | 12.40 | ± 9.30  | ±        | <b>3.10</b> | <b>33.5</b> | 7.49 | ± 5.91   | ±    | <b>1.57</b> | <b>26.6</b> | 9.27     | ± 7.97 | ± | 1.29        | 16.2        |
|              |          | largo  | 1.01  | 0.61    |          |             |             | 0.45 | 0.33     |      |             |             | 1.15     | 0.42   |   |             |             |
| Grano de oro | amarillo | día  | 10.50 | ± 7.20  | ±        | <b>3.20</b> | <b>45.3</b> | 6.56 | ± 5.91   | ±    | 0.64        | 10.9        | 6.64     | ± 5.75 | ± | 0.89        | 15.6        |
|              |          | largo  | 1.02  | 0.97    |          |             |             | 0.46 | 0.57     |      |             |             | 0.89     | 0.67   |   |             |             |
| Valcatorce   | amarillo | día  | 11.80 | ± 7.40  | ±        | <b>4.40</b> | <b>61.0</b> | 8.89 | ± 7.25   | ±    | 1.63        | 22.5        | 7.98     | ± 6.71 | ± | <b>1.27</b> | <b>18.9</b> |
|              |          | largo  | 0.61  | 0.62    |          |             |             | 1.62 | 1.41     |      |             |             | 0.42     | 0.50   |   |             |             |
| Valuno       | amarillo | día  | 11.20 | ± 6.80  | ±        | <b>4.50</b> | <b>65.6</b> | 6.74 | ± 5.73   | ±    | 0.10        | 17.5        | 6.41     | ± 5.87 | ± | 0.53        | 9.0         |
|              |          | largo  | 0.26  | 0.68    |          |             |             | 0.68 | 0.69     |      |             |             | 0.56     | 0.58   |   |             |             |
| Navideña     | amarillo | día  | 11.50 | ± 9.50  | ±        | 2.00        | 21.3        | 6.03 | ± 5.10   | ±    | 0.93        | 18.2        | 5.64     | ± 4.78 | ± | <b>0.86</b> | <b>17.9</b> |

|          |          |         |       |   |      |   |             |             |      |   |      |   |             |             |      |      |      |   |      |      |
|----------|----------|---------|-------|---|------|---|-------------|-------------|------|---|------|---|-------------|-------------|------|------|------|---|------|------|
|          |          | interme | 1.01  |   | 0.86 |   |             |             | 0.47 |   | 0.23 |   |             | 0.23        |      | 0.29 |      |   |      |      |
|          |          | dio     |       |   |      |   |             |             |      |   |      |   |             |             |      |      |      |   |      |      |
| Angaco   | amarillo | día     | 10.22 | ± | 7.90 | ± | <b>2.30</b> | <b>29.6</b> | 5.66 | ± | 4.14 | ± | <b>1.51</b> | <b>36.4</b> | 6.75 | ±    | 4.52 | ± | 2.23 | 49.3 |
|          |          | corto   | 0.93  |   | 0.69 |   |             |             | 0.72 |   | 0.28 |   |             |             | 0.08 |      | 0.03 |   |      |      |
| Morada 1 | rojo     | nd      | 9.40  | ± | 6.60 | ± | <b>2.80</b> | <b>43.0</b> | nd   |   | nd   |   | nd          | nd          | 9.19 | ±    | 7.64 | ± | 1.55 | 20.2 |
|          |          |         | 0.55  |   | 0.11 |   |             |             |      |   |      |   |             |             | 1.43 |      | 1.10 |   |      |      |
| Morada 2 | rojo     | nd      | 8.50  | ± | 6.20 | ± | 2.30        | 37.0        | nd   |   | nd   |   | nd          | nd          | 6.54 | ±    | 5.73 | ± | 0.81 | 14.1 |
|          |          |         | 1.34  |   | 1.04 |   |             |             |      |   |      |   |             |             | 0.51 |      | 0.32 |   |      |      |

Los valores están expresados como media ± desviación estándar. Diferencias significativas entre ambos métodos están en negrita. % RD = Diferencia relativa porcentual calculada como:  $(SW-AB) \times 100 / AB$ . \* Se refiere al color de las catáfilas externas. § Clasificación basada en los requerimientos fotoperiódicos para bulbificar (día largo: 14 horas, día intermedio: 13 horas y día corto 12 horas). Nd: datos no disponibles

Se realizó un análisis comparativo de ambos métodos por color de bulbo (sin considerar la variedad de cebolla). La figura 38 muestra las diferencias en la concentración de piruvato medidas por los métodos SW y AB, para las cebollas de diferente color. Las diferencias entre métodos (SW - AB) fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) para cebollas coloreadas en comparación con cebollas blancas para los tres años en estudio.

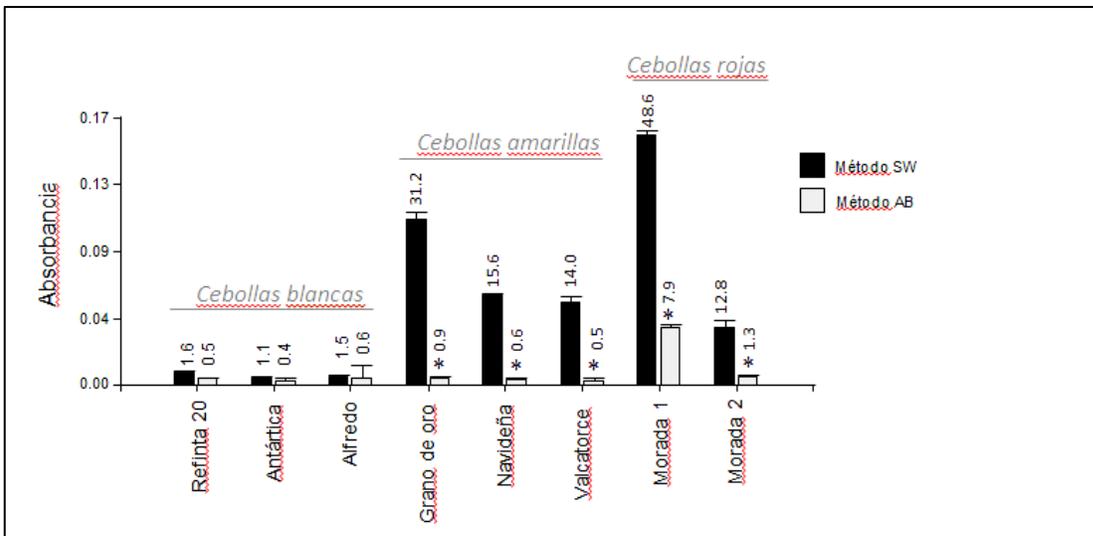


**Figura 38.** Diferencias en los niveles de piruvato obtenidos por los métodos SW y AB para cebollas de diferente color en tres años de cultivo. Las diferencias se calcularon como SW – AB.

Las diferencias en los resultados fueron de 2 a 3 veces mayores en cebollas coloreadas respecto de las cebollas blancas. Estos resultados sugieren fuertemente que las cebollas amarillas y rojas poseen compuestos diferentes del piruvato que absorben luz a 420 nm (la longitud de onda usada en el método SW), pero no lo hacen a 515nm (la longitud de onda usada por el método AB). Presumiblemente, en cebollas blancas el nivel de estos compuestos (aquellos que absorben luz principalmente a 420 nm) es menor que en cebollas coloreadas ya que los niveles de piruvato por ambos métodos fueron más similares en las primeras (Fig. 38). La magnitud de las diferencias encontradas entre ambos métodos se correlacionó positiva y significativamente con el contenido de flavonoides, para los años 2012 ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,003$ ), 2014 ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,041$ ) y 2015 ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,001$ ) sugiriendo que los flavonoides interfieren con las determinaciones de piruvato al utilizar el método SW.

Para estimar la absorbancia de los compuestos diferentes del piruvato, los cuales están naturalmente presentes en bulbos de cebolla y pueden interferir en la determinaciones de piruvato, extractos acuosos de cebollas blancas amarillas y rojas se analizaron como en un “análisis de piruvato” por ambos métodos pero sin agregar DNPH en la mezcla de reacción para evitar la formación del complejo amarillo piruvato-DNPH.

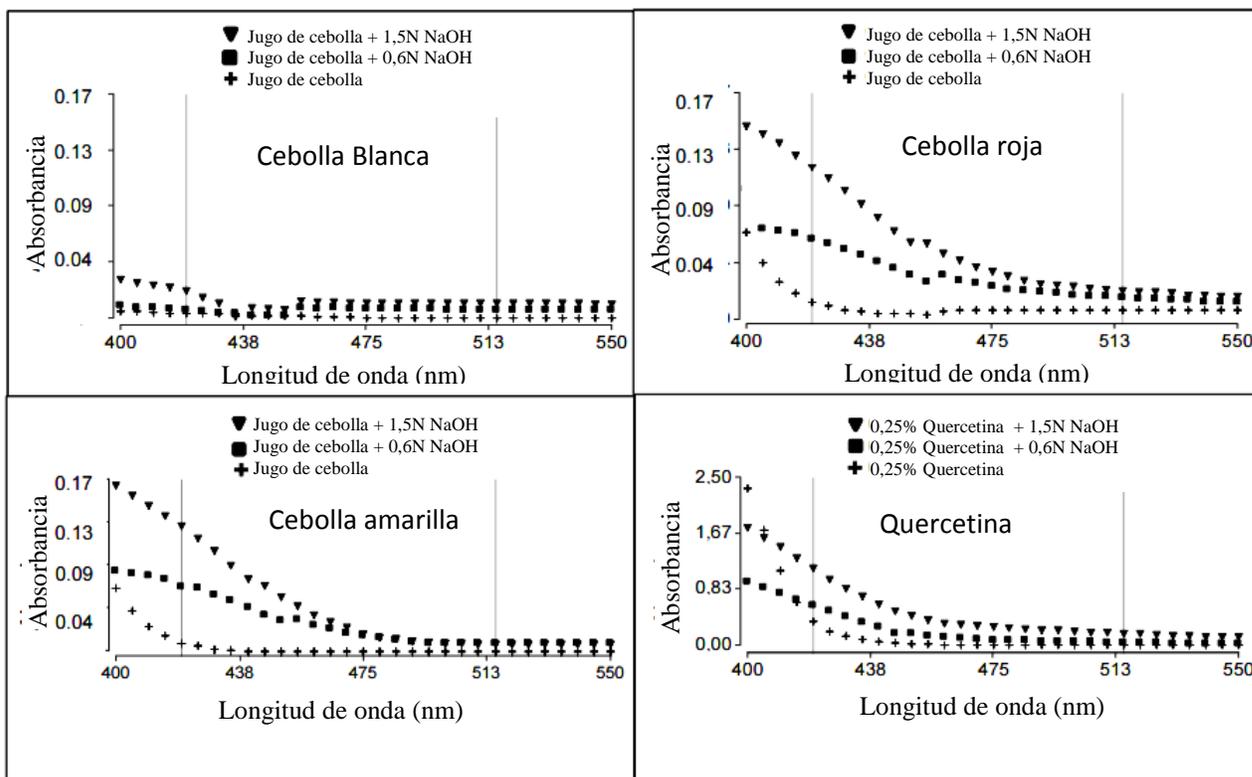
Ya que el piruvato libre, es decir, no unido a DNPH, es incoloro y no absorbe luz a las longitudes de onda usadas por ambos métodos, solo aquellos compuestos diferentes del piruvato que absorban luz a 420 nm (SW) y a 515 nm (AB) generan lecturas en el espectrofotómetro. Como resultado, nosotros observamos que la absorbancia de luz en esos extractos de cebolla difieren substancial y significativamente ( $p < 0,05$ ) entre ambos métodos analíticos para los cultivares amarillos y rojos. Para estas cebollas coloreadas, las absorbancias usando el método SW fueron de 4 veces (para la cultivar Morada 1) a 22 veces (para la cultivar Grano de Oro INTA) mayores que las absorbancias obtenidas utilizando el método AB. Inversamente, para cebollas blancas, las absorbancias obtenidas por ambos métodos fueron pequeñas y no diferentes significativamente entre sí. También es interesante notar que, con solo una excepción (Morada 1) todas las absorbancias medidas a 515 nm, usando el método AB fueron pequeñas y estadísticamente similares sin importar el color del bulbo, es decir, considerando cebollas blancas, amarillas y rojas. Considerando lo anterior, estos datos sugieren que las cebollas amarillas y rojas poseen altos niveles de compuestos diferentes al piruvato que absorben luz a 420 nm, la misma longitud de onda usada para medir piruvato en el método SW. Por lo tanto, estos valores de absorbancia en extractos de cebollas coloreadas que representan entre un 12,8 a un 48,6% de la absorbancia total obtenida en las determinaciones de piruvato total (Figura 39) representan una fuente de error considerable en las determinaciones de piruvato por el método SW.



**Figura 39.** Valores de absorbancia de extractos acuosos de cebolla debida a compuestos diferentes de piruvato, en longitudes de onda utilizadas por el método SW (420 nm) y por el método AB (515 nm). Los asteriscos indican diferencias significativas entre métodos para cada cultivar ( $p < 0,05$ ). Los números sobre las barras indican el porcentaje que cada valor de absorbancia representa respecto de la absorbancia total obtenida utilizando el método estándar de piruvato, es decir, con la adición de DNPH, para cada método y cultivar.

Los errores observados, que podrían llevar a una sobreestimación substancial en los contenidos de piruvato en cebollas amarillas y rojas analizadas por el método SW, no se observaron en cebollas blancas, sugiriendo que las cebollas blancas carecen de compuestos interferentes a 420 nm.

Las absorbancias diferenciales observadas en cebollas blancas y coloreadas debidas a compuestos diferentes del piruvato fueron investigadas en un rango de longitudes de onda de 400 a 550 nm. La figura 40 muestra el espectro de absorción para extractos de cebollas blancas, amarillas y rojas y para el compuesto flavonoide quercetina con y sin la adición de NaOH en concentraciones usadas por el método SW (0,6N) y por el método AB (1,5N).



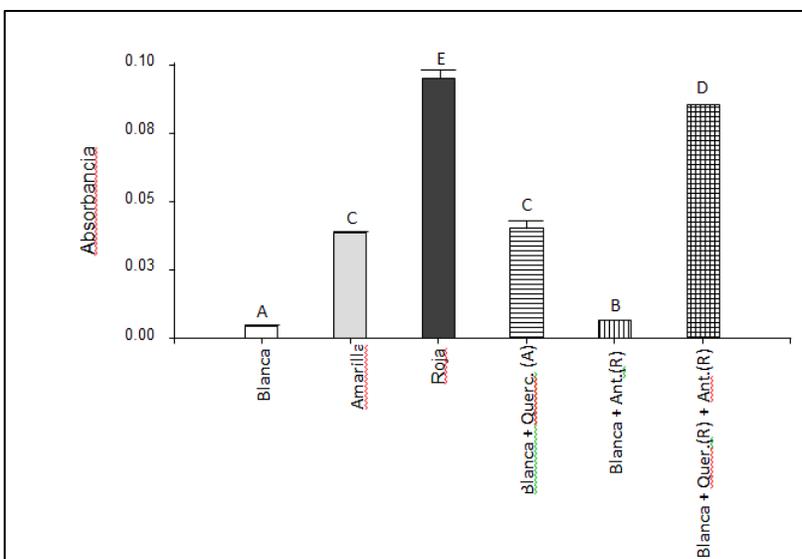
**Figura 40.** Espectros de absorbancia para cebollas blancas, amarillas y rojas y para el compuesto flavonoide quercetina con y sin la adición de NaOH en concentraciones utilizadas por los métodos SW (0,6N) y AB (1,5N). Las líneas verticales indican las longitudes de onda utilizadas por los métodos SW (420nm) y AB (515 nm).

En extractos de cebollas amarillas y rojas, un aumento substancial y progresivo en la absorbancia se observó para longitudes de onda menores a 475 nm cuando el extracto de cebolla fue alcalinizado, y este incremento se asoció al nivel de alcalinización (Figura 40). Para longitudes de onda superiores a 475 nm, las absorbancias fueron progresivamente decreciendo, tanto para los extractos acuosos sin el agregado de NaOH como en aquellos a los que si se les agregó, con diferencias mínimas en absorbancias en ambos casos a 515nm. La misma tendencia se observó en el espectro de absorción de la quercetina, el flavonoide más abundante en cebollas amarillas y rojas. Estos resultados sugieren que la quercetina podría interferir con las determinaciones de piruvato al utilizar longitudes de onda menores a 475 nm, tal como se usa en el método SW. Inversamente, en extractos de cebollas blancas, se observaron variaciones de absorbancia mínimas y estadísticamente no significativas en el rango de longitudes de onda estudiado y esto no fue afectado por la alcalinización. En total, estos datos indican que a 515 nm, la longitud de onda usada por el

método AB existe poca interferencia por compuesto diferentes al piruvato, sin importar el color del bulbo ni la alcalinización, mientras que a 420 nm, la longitud de onda usada por el método SW, hay una interferencia substancial en extractos de cebollas amarillas y rojas (pero no así en las blancas) presumiblemente debida a quercetina y quizás a otros flavonoides hallados predominantemente en cebollas coloreadas.

### **5.3.2. Identificación de compuestos interferentes**

El color amarillo en bulbos de cebolla es debido principalmente a quercetina (Rhodes & Price, 1996) mientras que cebollas rojas acumulan antocianos además de quercetina (Fossen, Andersen, Øvstedal, Pedersen, & Raknes, 1996). Para probar la hipótesis de que la interferencia en cebollas coloreadas, al usar 420 nm como longitud de onda de medición es debida principalmente a estos flavonoides se realizó el siguiente experimento complementario: a extractos de cebollas blancas, caracterizadas por su bajo contenido de estos compuestos, se les adicionó quercetina y/o antocianos en una concentración equivalente a aquellas encontradas para estos dos flavonoides en una cebolla amarilla (Valcatorce INTA) y en una roja (Morada 1), respectivamente y se midió la absorbancia resultante. Se encontró que la concentración de quercetina puede explicar toda la interferencia medida en una cebolla amarilla Valcatorce INTA, tal como se evidencia en las absorbancias estadísticamente similares entre la cebolla Vacatorce y la cebolla Refinta 20 adicionada con el contenido de quercetina de Valcatorce INTA (Figura 41). En la cebolla roja Morada 1, el contenido de quercetina combinado con el de antocianinas explicaron la mayor parte de la interferencia, pero no toda, tal como se puede apreciar en el mayor nivel de interferencia de Morada 1 en comparación con Refinta 20 adicionada con quercetina + antocianos. Interesantemente, las antocianinas poseen mínima contribución en la interferencia (Figura 41).



**Figura 41.** Absorbancia a 420 nm de extractos acuosos de una cebolla blanca (Refinta 20), una amarilla (Valcatorce INTA), una roja (Morada 1) y del extracto de una cebolla blanca adicionado con quercetina y/o con antocianinas a una concentración equivalente a la hallada en cebollas amarillas y rojas, respectivamente. Las letras distintas indican diferencias significativas  $p < 0,05$ . Querc. (A) = cantidad de quercetina presente en la variedad amarilla; Querc. (R) = cantidad de quercetina presente en la variedad roja; Ant. (R) = cantidad de antocianos presentes en la variedad roja.

De esta manera, la estimación de la interferencia se realizó en todas las cebollas coloreadas. El contenido de antocianinas + quercetina explicó del 89 al 96% de la interferencia, siendo quercetina el principal compuesto interferente tanto en cebolla amarillas como rojas, mientras que las antocianinas representan ~ 7% de la interferencia de las cebollas rojas (las cebollas amarillas no contienen antocianos).

### 5.3.3. Precisión, linealidad, sensibilidad y exactitud

El método AB tuvo un coeficiente de variación de 0,88%, y resultó menos variable y por lo tanto más preciso que el método SW cuyo coeficiente de variación resultó de 4,97 %. Al evaluar la linealidad de ambos métodos se obtuvieron coeficientes de regresión superiores a 0,99 en ambos casos y al realizar las pruebas estadísticas adecuadas (prueba t) resultó que la correlación lineal era significativa al nivel de significancia de 0,05 y de 0,01 para ambas metodologías. Además, al analizar comparativamente la pendiente de las curvas de regresión para cada método se encontró que el método AB poseía una mayor pendiente, lo

que indicaría que este método posee mayor sensibilidad que el SW. Al analizar la exactitud de cada método, se obtuvieron valores semejantes para ambos métodos ( ).

Tradicionalmente, el método SW ha sido el más común y más ampliamente usado para estimar los niveles de piruvato en cebolla. De hecho, una búsqueda en la literatura científica reveló más de 56 publicaciones que utilizan el método SW para determinar ácido pirúvico en cebolla (Tabla 17). A pesar de que la información concerniente al color de bulbo de las cebollas utilizadas en estos estudios no estaba disponible siempre, es altamente probable que utilizaran variedades amarillas entre los materiales evaluados, ya que las cebollas amarillas son las más consumidas a nivel mundial.

El presente estudio demostró que el usar el método SW siempre lleva a una sobreestimación en los niveles de piruvato en cebollas amarillas y rojas, y que esta fuente de error puede ser significativa, tal como fue observado en el casi 42% de las muestras coloreadas analizadas y sustancial llegando al 65% en algunas muestras de cebolla (Tabla 18). El método AB introduce modificaciones al método original SW, las cuales, basados en nuestro análisis comparativo, reducen significativamente la interferencia de compuestos presentes en cebolla diferentes al piruvato, lo que a su vez mejora la especificidad y también la reproducibilidad y la linealidad de los análisis.

#### **5.4. Conclusiones**

Nuestros datos sugieren fuertemente que la quercetina es el principal compuesto interferente con las determinaciones de piruvato al utilizar el método SW tanto en cebollas amarillas como en rojas y que las antocianinas tienen una contribución mínima en la interferencia.

En conjunto, estos datos apuntan a la importancia de la elección del método para determinar piruvato basándose en los materiales vegetales a ser analizados. Mientras que para cebollas blancas, con poco contenido de quercetina y nulo de antocianos no encontramos diferencias significativas entre ambos procedimientos analíticos, para cebollas coloreadas, el método AB es recomendable respecto al método SW, ya que minimiza las fuentes de error halladas en estos materiales.

Debido a que el nivel de piruvato en cebolla es comúnmente usado como un indicador de la intensidad de la pungencia y de la actividad antiplaquetaria, la selección de un método analítico puede contribuir a minimizar errores en programas de mejoramiento tendientes a aumentar –o a disminuir según los objetivos- el flavor y el valor nutracéutico en cebolla. Nuestra caracterización de los niveles de piruvato en el germoplasma argentino de cebolla por ambos métodos (SW y AB) durante tres años contribuirá a este fin.

## **CAPÍTULO 6**

### **Discusión general y perspectivas a futuro**

En esta tesis se estudiaron el perfil cuali-cuantitativo de compuestos bioactivos responsables del sabor y las propiedades funcionales de la cebolla (*Allium cepa* L.), como también aspectos genéticos que determinan la expresión de estos caracteres. También se evaluaron composicional y funcionalmente otras aliáceas como el ajo, el ciboulette, el puerro, el shallot y la cebolla de verdeo. Además se desarrollaron y evaluaron marcadores moleculares transferibles entre especies de *Allium* y se puso a punto una técnica de determinación de piruvato, un indicador de la pungencia y contenido total de compuestos organoazufrados en cebolla.

### **Análisis genético de caracteres de interés agronómico y funcional en cebolla, heredabilidad ( $H^2$ ), número de genes involucrados y relaciones entre caracteres.**

Se estudió la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ), el tipo de segregación y el número mínimo de genes involucrados para caracteres de interés agronómico y funcional en cebolla, utilizando 22 poblaciones  $F_2$  segregantes para estos caracteres y sus respectivos parentales. Se analizaron los siguientes caracteres: actividad antiplaquetaria *in vitro* (AAIV), contenido de sólidos, compuestos azufrados, compuestos fenólicos, carbohidratos (por HPLC) y piruvato.

La mayoría de las poblaciones mostraron amplia variabilidad fenotípica para los caracteres estudiados. La amplia variabilidad fenotípica observada en algunas  $F_2$  para algunos caracteres cuantitativos, sumado a un adecuado tamaño poblacional de las mismas, sugiere que estos materiales son adecuados para realizar análisis de QTL para dichos caracteres. Se detectaron individuos transgresivos en múltiples  $F_2$  para la mayoría de los caracteres evaluados. Estos individuos son de interés para su incorporación en los planes de mejoramiento de cebolla. Por ejemplo, los individuos transgresivos con AAIV superior al progenitor Refinta 20, la variedad argentina con mayor poder antiagregante reportada hasta el momento, serían valiosos -para los programas de mejoramiento- a fin de incrementar las propiedades antiplaquetarias en variedades de cebollas nacionales.

Los valores de  $H^2$  encontrados para los caracteres evaluados sugieren un importante componente genético (y no ambiental) para el control del contenido de SS, ST, PV, AAIV

y carbohidratos. Estos resultados sugieren que dichos caracteres son heredables y que la selección para dichos caracteres en planes de mejoramiento será bastante efectiva. Esto, asociado a los individuos transgresivos ‘superiores’ identificados en las  $F_2$ , es de gran interés para el mejoramiento, ya que si se deseara aumentar los niveles de estos compuestos sería imprescindible partir de materiales con valores altos de dichos compuestos.

Por otro lado, los valores bajos de  $H^2$  observados para el carácter ‘peso de bulbo’ son esperables debido al gran impacto que las prácticas de cultivo tienen sobre el tamaño de bulbo y rendimiento del mismo. El contenido de compuestos fenólicos también presentó valores bajos de  $H^2$ , lo cual es coherente con reportes previos que indican que estos compuestos se sintetizan como respuesta a diversos tipos de estrés en plantas.

La existencia de correlaciones fenotípicas positivas significativas entre sólidos, tiosulfatos y actividad antiplaquetaria indican que será difícil desarrollar variedades de cebollas suaves –poco pungentes- con alta actividad antiplaquetaria. Las correlaciones inversas observadas entre los caracteres previos y el peso de bulbo sugieren una asociación entre cebollas de alto valor antiplaquetario y bulbos pequeños.

Por lo antedicho se concluye que se cumple parcialmente la hipótesis 1, ya que no todos los caracteres evaluados son heredables, pero si presentaron alta variabilidad, distribución normal y acciones génicas explicadas por un modelo simple de aditividad-dominancia.

### **Desarrollo y evaluación de marcadores moleculares microsatélites (SSRs)**

El desarrollo de herramientas moleculares como son los marcadores microsatélites en aliáceas es importante para encarar planes de mejoramiento asistidos por marcadores, para caracterizar y posteriormente identificar variedades de aliáceas y en estudios de diversidad. En la actualidad, se cuenta con pocos marcadores de este tipo, y en los disponibles, solo en una fracción de ellos se conoce su transferibilidad hacia otras especies de la familia *Alliaceae*, lo que dificulta su uso en especies menos estudiadas. En la presente tesis se desarrollaron, evaluaron y caracterizaron cerca de 200 marcadores microsatélites en

variedades de ajo, cebolla y otras 8 especies de aliáceas. Además se evaluó el polimorfismo de estos marcadores en dos poblaciones segregantes de cebolla. En total se obtuvo que ~70% de los marcadores evaluados amplificaba en alguno de los materiales analizados. Entre el 30 y 42% de los marcadores evaluados fue polimórfico en ajo, cebolla, o en las poblaciones segregantes de cebolla. Los marcadores desarrollados polimórficos en las dos poblaciones F2 se utilizarán para la identificación y mapeo de QTL para los caracteres evaluados en el capítulo 2 de esta tesis. Además, estos marcadores servirán estudios de genotipado, diversidad genética y selección asistida por marcadores (SAM) en cebolla y –posiblemente- otras aliáceas.

Por lo antedicho se concluye que se cumple totalmente la hipótesis 2, ya que fue posible desarrollar marcadores moleculares nuevos a partir de las secuencias disponibles públicamente.

### **Relación entre compuestos funcionales y las propiedades antioxidantes y antiagregantes en especies comestibles de *Allium***

Las propiedades funcionales más estudiadas y reportadas en ajo y cebolla son la actividad antiplaquetaria y antioxidante, pero la información acerca de estas propiedades en otras aliáceas es escasa. Los compuestos presentes en aliáceas propuestos como responsables de estas propiedades son los azufrados y los fenólicos, pero la contribución relativa de cada uno de estos grupos de compuestos y la contribución individual de compuestos aislados en cada una de estas propiedades benéficas no han sido establecidas. En esta tesis se evaluó el poder antiplaquetario (AAIV) y antioxidante de las seis hortalizas más importantes del género *Allium*. El ajo y el shallot resultaron ser los agentes antiplaquetarios más potentes, consistentemente para ambos donantes de sangre, mientras que el ciboulette y el shallot exhibieron las mayor capacidades antioxidantes. El puerro, la cebolla y la cebolla de verdeo fueron las hortalizas con menor AAIV y actividad antioxidante. Los resultados del análisis de correlación entre compuestos bioactivos y AAIV y actividad antioxidante sugieren fuertemente que los compuestos organoazufrados y fenólicos están involucrados, en diferente medida, en ambas propiedades funcionales. Mientras que los compuestos organoazufrados y fenólicos contribuyen de manera equitativa en la actividad antiplaquetaria, los compuestos fenólicos contribuyen mucho más que los azufrados en la

actividad antioxidante de las aliáceas. Estudios futuros que consideren las propiedades antiplaquetarias y antioxidantes de los compuesto fenólicos y azufrados individuales y las combinaciones entre ellos (que revelen posibles efectos sinérgicos) serían muy útiles para clarificar el rol y la contribución de estos compuestos en las propiedades funcionales de las aliáceas. Además, la determinación de la capacidad antioxidante por diferentes metodologías también sería interesante, ya que es posible que el orden de las especies respecto a su potencial antioxidante cambie al determinar esta propiedad por otra metodología diferente.

Por lo antedicho se concluye que se cumple totalmente la hipótesis 3, ya que se encontraron diferencias y variabilidad interespecífica en las principales hortalizas del género *Allium*. Y se cumple parcialmente la hipótesis 4, ya que se hallaron correlaciones entre compuestos fenólicos y organoazufrados y las propiedades funcionales en las distintas aliáceas, pero no todas esas correlaciones resultaron positivas.

#### **Fuentes de error en la determinación espectrofotométrica de piruvato en cebolla**

En cebolla, el contenido de piruvato se correlaciona positivamente con la intensidad de la pungencia, el contenido de compuestos organoazufrados y la AAIV, y es comúnmente usado como un estimador de estos caracteres de calidad en cebolla.

Tradicionalmente, el método de Schwimmer y Weston (1961) (SW) ha sido el más común y más ampliamente usado para estimar los niveles de piruvato en cebolla. En esta tesis se analizaron comparativamente dos métodos de determinación de piruvato y se investigó y cuantificaron los compuestos interferentes. Este estudio demostró que usar el método de SW siempre conlleva a una sobreestimación en los niveles de piruvato en cebollas amarillas y rojas, y que esta fuente de error puede ser significativa y sustancial, llegando al 65% en algunas muestras de cebolla. Se encontró que el método modificado, propuesto por Anthon y Barret (2003), reduce significativamente la interferencia, mejora la especificidad, la reproducibilidad y la linealidad de los análisis.

La selección criteriosa de un método analítico para medir piruvato puede contribuir a minimizar errores en programas de mejoramiento tendientes a aumentar –o a disminuir según los objetivos- el flavor y el valor nutracéutico en cebolla.

Por lo antedicho se concluye que se cumple parcialmente la hipótesis 5, ya que se obtuvieron diferencias respecto al % de interferencia, la sensibilidad y la precisión de ambas metodologías, pero no se hallaron diferencias respecto de la linealidad y la exactitud de calibración de los métodos.

En conclusión, los aportes fundamentales de esta tesis son:

- 1) La descripción de la estructura genética y herencia de los caracteres más importantes responsables del sabor y de la actividad antiplaquetaria en cebolla. Se encontró que la mayoría de los caracteres son de heredabilidad moderada a alta.
- 2) El desarrollo y evaluación de marcadores moleculares microsatélites que fueron transferibles a 8 especies de aliáceas, siete comestibles y una ornamental. Además, cerca de un 40% de ellos resultaron polimórficos en ajo, cebolla y en las poblaciones segregantes de cebolla posibilitando futuros estudios de caracterización, genotipado y mapeo por asociación en el caso de las variedades y de mapeo genético por ligamiento y detección de QTLs en el caso de las poblaciones segregantes.
- 3) La caracterización bajo las mismas condiciones experimentales del contenido de compuestos bioactivos y de las propiedades antioxidantes y antiplaquetarias de las principales especies comestibles de importancia económica de la familia *Alliaceae* (ajo, cebolla, shallot, puerro, ciboulette y cebolla de verdeo). Además se investigaron correlaciones fenotípicas entre las variables encontrando que tanto los compuestos azufrados como los fenólicos contribuyen aunque de manera diferencial en las dos propiedades benéficas de aliáceas analizadas.
- 4) La evaluación de las condiciones experimentales espectrofotométricas óptimas para aumentar la exactitud en las determinaciones de piruvato en cebolla. Además se investigó y cuantificó la naturaleza de la interferencia al utilizar el método tradicional y se especifican las condiciones y consideraciones para minimizar la interferencia en la determinación según el color de las cebollas analizadas.

Se espera que los resultados alcanzados en esta tesis contribuyan al mejoramiento genético de cebolla y otras aliáceas y a su aprovechamiento como alimentos funcionales.

## 6.2. Bibliografía

- Abayomi, L. A., Terry, L. A., White, S. F., & Warner, P. J. (2006). Development of a disposable pyruvate biosensor to determine pungency in onions (*Allium cepa* L.). *Biosensors and Bioelectronics*, 21(11), 2176–2179.
- Abbey, L., Aked, J., & Joyce, D. C. (2001). Discrimination amongst Alliums using an electronic nose. *Annals of Applied Biology*, 139(3), 337–342.
- Abrameto, M.A., Pozzo Ardizzi, C. M., Gil, M. I., Molina, L. M. (2010). Analysis of methodologies for the study of composition and biochemical carbohydrate changes in harvest and postharvest onion bulbs Análisis de metodologías para el estudio de la composición y cambios bioquímicos de. *Fyton*, 79, 123–132.
- Alcala, J., K.S., Y., Pike, L., & Jones, R. (1998). Comparison of three analytical methods for measurements of onion pungency. *Subtropical Plant Science*, 50, 41–44.
- Ali, M., Bordia, T., & Mustafa, T. (1999). Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 60(1), 43-47.
- Ali, M., Thomson, M., & Afzal, M. (2000). Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 62(2), 55-73.
- Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2003). Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1210–1213.
- Araki, N., Masuzaki, S. I., Tsukazaki, H., Yaguchi, S., Wako, T., Tashiro, Y., & Shigyo, M. (2010). Development of microsatellite markers in cultivated and wild species of sections *Cepa* and *Phyllodolon* in *Allium*. *Euphytica*, 173(3), 321-328.

- Bacon, J., Moates, G., N.G., M., Rhodes, M., Smith, A., & Waldron, K. (1999). Quantitative analysis of flavor precursors and pyruvate levels in different tissues and cultivars of onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 64, 257–261.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Baldwin, S., Pither-Joyce, M., Wright, K., Chen, L., & McCallum, J. (2012). Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations. *Molecular breeding*, 30(3), 1401-1411.
- Barchi, L., Lanteri, S., Portis, E., Valè, G., Volante, A., Pulcini, L., Rotino, G. L. (2012). A RAD tag derived marker based eggplant linkage map and the location of QTLs determining anthocyanin pigmentation. *Plos One*, 7(8).
- Bedford, L. V. (1984). Dry matter and pungency tests on British grown onions. *Journal of the National Institute of Agricultural Botany.*, 16(3), 581–591.
- Benkeblia, N. (2000). Phenylalanine Ammonia-lyase, Peroxidase, Pyruvic Acid and Total Phenolics Variations in Onion Bulbs During Long-term Storage. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 33(2), 112–116.
- Benkeblia, N. (2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5), 753–759.
- Benkeblia, N., Ueno, K., Onodera, S., & Shiomi, N. (2005). S: Sensory and Nutritive Qualities of Food Variation of Fructooligosaccharides and their Metabolizing Enzymes in Onion Bulb ( *Allium cepa* L . cv . Tenshin ) During Long-term Storage. *Journal of Food Science*, 70(3), 208–214.

- Berhow, M. A. (1998). Flavonoid accumulation in tissue and cell culture. In J. A. Manthey & B. Buslig (Eds.), *In Flavonoids in the Living System* (pp. 67–84). New York: Springer US.
- Berli, F. J., Alonso, R., Beltrano, J., & Bottini, R. (2014). High Altitude Solar UV-B and Abscisic Acid Sprays Increase Grape Berry Antioxidant Capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, *ajev-2014*.
- Bernaert, N., De Paepe, D., Bouten, C., De Clercq, H., Stewart, D., Van Bockstaele, E., Van Droogenbroeck, B. (2012). Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Food Chemistry*, *134*(2), 669–677.
- Block, E. (1985). Chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* *252*:94-99.
- Block, E., Naganathan, S., Putman, D., & Zhao, S. H. (1992). *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(12), 2418-2430.
- Block, E., Putman, D., & Zhao, S. H. (1992). *Allium* Chemistry - Gc Ms Analysis of Thiosulfinates and Related-Compounds From Onion, Leek, Scallion, Shallot, Chive, and Chinese Chive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(12), 2431–2438.
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, *18*(1), 1–29.
- Block, E. (2010). *Garlic and other Alliums: The Lore and the Science*. (1st ed.). Cambridge,: Royal Society of Chemistry.
- Bolandnazar, S., Mollavali, M., & Tabatabaei, S. J. (2012). Influence of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on qualitative characteristics of onion. *Scientia Horticulturae*, *136*(3), 24–28.

Boletín INTA Informa Internacional, Edición español N° 04.  
(URL:<http://www.inta.gov.ar/info/intainfo/esp/04.htm>)

Bordia, T. (1978). Effect of garlic on human platelet aggregation *in vitro*. *Atherosclerosis*, 30, 355.

Bordia, T., Mohammed, N., Thomson, M., & Ali, M. (1996). An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 54(3), 183–186.

Borek, C. (1997). Antioxidants and cancer. *Science & Medicine*, 4,51-62.

Boyhan, G. E., Schmidt, N. E., Woods, P. M., Himelrick, D. G., & Randle, W. M. (1999). Adaption of a Spectrophotometric Assay for Pungency in Onion To a Microplate Reader. *Journal of Food Quality*, 22(2), 225–233.

Bravo, L., Sources, D., & Significance, N. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11).

Brewster, J.L. & Rabinowith, H.D. (1990): Onions and allied crops science biochemistry, food science and minor crops. CRC Press, Inc., New York, USA, pp. 230–251.

Brewster; J. L. (1994). Onions and other vegetable Alliums. Wallingford,UK: CABI Publishing.

Briggs, W. H., Xiao, H., Parkin, K. L., Shen, C., & Goldman, I. L. (2000). Differential inhibition of human platelet aggregation by selected *Allium* thiosulfinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5731–5735.

Briggs, W. H., Folts, J. D., Osman, H. E., & Goldman, I. L. (2001). Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. *The Journal of nutrition*, 131(10), 2619-2622.

- Buso, J. A., & Costa, P. D. (1979). Heritability and correlations of onion bulb traits (*Allium cepa* L.). *Revista Brasileira de Genetica*, 2(1), 49–55.
- Bystrická, J., Musilová, J., Vollmannová, a., Timoracká, M., & Kavalcová, P. (2013). Bioactive components of onion (*Allium cepa* L) – a Review. *Acta Alimentaria*, 42(1), 11–22.
- Cardinal, D. C., & Flower, R. J. (1980). The Electronic Aggregometer : Platelet Behavior in Blood A Novel Device for Assessing Key Words : *Platelets*, 158, 135–158.
- Cavagnaro, P. F., Camargo, A., Galmarini, C. R., & Simon, P. W. (2007). Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) antiplatelet activity and thiosulfinates content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1280–1288.
- Cavagnaro, P. F., & Galmarini, C. R. (2012). Effect of Processing and Cooking Conditions on Onion (*Allium cepa* L) Induced Antiplatelet Activity and Thiosulfinate Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8731.8737.
- Cavagnaro, P.F. (2007) Componentes bioquímicos, genéticos y culinarios de compuestos organoazufrados responsables del sabor en ajo (*Allium sativum* L.) Tesis doctoral. Universidad Nacional de Cuyo. 167p.
- Cavagnaro, P. F., Chung, S. M., Manin, S., Yildiz, M., Ali, A., Alessandro, M. S., & Simon, P. W. (2011). Microsatellite isolation and marker development in carrot-genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC genomics*, 12(1), 386.
- Cavallito, C. J., & Bailey, J. H. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1950–1951.
- Chand, S. K., Nanda, S., Rout, E., & Joshi, R. K. (2015). Mining, characterization and validation of EST derived microsatellites from the transcriptome database of *Allium sativum* L. *Bioinformation*, 11(3), 145.

- Chattopadhyay, A., Sharangi, A. B., Dutta, S., Das, S., & Denre, M. (2013). Genetic Relatedness Between Quantitative and Qualitative Parameters in Onion (*Allium cepa* L.). *Vegetos- An International Journal of Plant Research*, 26(1), 151.
- Chen, J. H., Chen, H. I., Tsai, S. J., & Jen, C. J. (2000). Chronic consumption of raw but not boiled Welsh onion juice inhibits rat platelet function. *The Journal of Nutrition*, 130(1), 34–37.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Review Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118–1125.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), 169-196.
- Coolong, T. W., & Randle, W. M. (2003). Ammonium nitrate fertility levels influence flavour development in hydroponically grown “Granex 33” onion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 477–482.
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), 609–625.
- Croci, C. A., Banek, O. A., & Curzio, S. A. (1995). Effect of gamma-irradiation and extended storage on chemical quality in onion (*Allium cepa* L.). *Food Chemistry*, 54(2), 151–154.
- Crowther, T., Collin, H. a., Smith, B., Tomsett, a. B., O’Connor, D., & Jones, M. G. (2005). Assessment of the flavour of fresh uncooked onions by taste-panels and analysis of flavour precursors, pyruvate and sugars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 112–120.
- Cunha, C. P., Hoogerheide, E. S., Zucchi, M. I., Monteiro, M., & Pinheiro, J. B. (2012). New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* (*Alliaceae*). *American journal of botany*.

- Darbyshire, B., & Henry, R. J. (1978). the Distribution of Fructans in Onions. *New Phytologist*, 81(1), 29–34.
- Darbyshire, B., & Henry, R. J. (1979). Association of fructans with high percentage dry-weight in onion cultivars suitable for dehydrating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(11), 1035–1038.
- Darbyshire, B., & Henry, R. J. (1981). Differences in Fructan content and Synthesis in some *Allium* Species. *New Phytologist*, 87, 249–257.
- Debaene, J. E. P., Goldman, I. L., & Yandell, B. S. (1999). Postharvest Flux and Genotype × Environment Effects for Onion-induced Antiplatelet Activity, Pungency, and Soluble Solids in Long-day Onion during Postharvest Cold Storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(4), 366–372.
- Degewione, A., Alamerew, S., & Tabor, G. (2011). Genetic variability and association of bulb yield and related traits in shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum* Don.) in Ethiopia. *International Journal of Agricultural Research* 6(7), 517–536.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2013). InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 505-512.
- Dion, M. E., & Milner, J. A. (1997). Garlic inhibits cytochrome P450 2E1 mediated chloroxazone metabolism. *The FASEB Journal*, 11, A370.
- Eady, C. C., Kamoi, T., Kato, M., Porter, N. G., Davis, S., Shaw, M., ... & Imai, S. (2008). Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile. *Plant physiology*, 147(4), 2096-2106.

- Edwards, S. J., Britton, G., & Collin, H. a. (1994). The biosynthetic pathway of the S-alk ( en ) yl-L-cysteine ( flavour precursors ) in species of AUium sulphoxides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(Virtanen 1965), 181–188.
- Effendy, J. L., Simmons, D. L., Campbell, G. R., & Campbell, J. H. (1997). The effect of aged garlic extract “Kyolic”, on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 132, 37-42.
- Elhassaneen, Y. A., & Sanad, M. I. (2009). Phenolics, Selenium, Vitamin C, Amino Acids and Pungecy levels and Antioxidant Activities of two Egyptian onion varieties. *American Journal of Food Technology*, 1–14.
- Ernst, M., & Bufler, G. (1994). Stems of *Allium cepa* L . contain starch. *New Phytoogy*, 128, 403–406.
- FAO. (2012). FAO 2012. Retrieved from <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Fattorusso, E., Lanzotti, V., Tagliatela-Scafati, O., Cicala, C. (2001).The flavonoids of leek, *Allium porrum*, L. *Phytochemistry*, 57, 565-569.
- Fattorusso, E., Iorizzi, M., Lanzotti, V., & Tagliatela-Scafati, O. (2002). Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(20), 5686-5690.
- Fischer, D., & Bachmann, K. (2000). Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra-and interspecific relatedness within the subgenus Rhizirideum. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(1-2), 153-164.
- Fosket, R. L., & Peterson, G. A. (1950). Relation of dry matter content to storage quality in some onion varieties and hibrids. *Proceeding of American Society of Horticultural Science.*, 55, 314–318.

- Fossen, T., Andersen, Ø. M., Øvstedal, D. O., Pedersen, A. T., & Raknes, Å. (1996). Characteristic Anthocyanin Pattern from Onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science*, 61(4), 703–706.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
- Freeman, G. G., & Mossadeghi, N. (1970). Studies on the effect of sulphate nutrition on the flavour components of onion (*Allium cepa*). *The Biochemical Journal*, 118(2), 24.
- Freeman, G. G., & Mossadeghi, N. (1973). Studies on relationship between water regime and flavour strength in watercress (*Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek), cabbage (*Brassica oleracea capitata*) and onion (*Allium cepa*). *Journal of Horticultural Science*.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604.
- Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Quantitative Methods for Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 33(3), 266–274.
- Furie, B. & Furie, B. (2008). Mechanisms of Thrombus Formation. *The New England Journal of Medicine*. 359(9), 938-949.
- Galdon, B. R., Rodriguez, C. T., Rodriguez, E. R., & Romero, C. D. (2008). Organic Acid Contents in Onion Cultivars (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6512–6519.
- Gallina, P. M., Cabassi, G., Maggioni, A., Natalini, A., & Ferrante, A. (2012). Changes in the pyruvic acid content correlates with phenotype traits in onion clones. *Australian Journal of Crop Science*, 6(1), 36–40.
- Galmarini, C. R. (1996). Obtencion de cultivares en la Argentina. *Boletín INTA*.

- Galmarini, C. R. (1998). Onion breeding for the dehydration industry in Argentina. In *Proceedings of the 1998 National Onion Research Conference. Sacramento, California* (p. 42.47).
- Galmarini, C. R. (2000). Quantitative trait loci controlling solids, pungency, and antiplatelet activity in onion (*Allium cepa* L.). Ph. D. Thesis. University of Wisconsin-Madison, USA. 103p.
- Galmarini, C.R., Goldman, I. L., Havey, M. J. (2001). Genetic analysis of correlated solids, flavor and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 265, 543-551.
- Gamiely, S., Randle, W. M., Mills, H. a, & Smittle, D. a. (1991). Onion Plant Growth , Bulb Quality , and Water Uptake following Ammonium and Nitrate Nutrition, 26(8), 1061–1063.
- Glasser, G., Graefe, E. U., Struck, F., Veit, M., & Gebhardt, R. (2002). Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine*, 9, 33-40.
- Goldman, I. L., Schwartz, B. S., & Kopelberg, M. (1995). Variability in blood platelet inhibitory activity of *Allium* (Alliaceae) species accessions. *American journal of botany*, 827-832.
- Gonzalez, R., Soto, V., Sance, M., Camargo, A., Galmarini, C. (2009) Variability of solids, organosulfur compounds, pungency and health-enhancing traits in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars belonging to different ecophysiological groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10282 – 10288.
- Grassmann, J., Hippeli, S., & Elstner, E. F. (2002). Plant's defence and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 471–478.

- Guo, T., Zhang, J., Christie, P., & Li, X. (2006). Influence of Nitrogen and Sulfur Fertilizers and Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Yield and Pungency of Spring Onion. *Journal of Plant Nutrition*, 29(10), 1767–1778.
- Guyonnet, D., Siess, M. H., Le Bon, A. M., & Suschetet, M. (1999). Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from *Allium* vegetables in rat tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154(1), 50-58.
- Hamilton, B. K., Pike, L. M., & Yoo, K. S. (1997). Clonal variations of pungency, sugar content, and bulb weight of onions due to sulphur nutrition. *Scientia Horticulturae*, 71(3-4), 131–136.
- Hamilton, B. K., Sun Yoo, K., & Pike, L. M. (1998). Changes in pungency of onions by soil type, sulphur nutrition and bulb maturity. *Scientia Horticulturae*, 74(4), 249–256.
- Han, J., Lawson, L., Han, G., & Han, P. (1995). A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. *Analytical Biochemistry*.
- Hang, T. T. M., Shigyo, M., Yaguchi, S., Yamauchi, N., & Tashiro, Y. (2004). Effect of single alien chromosome from shallot (*Allium cepa* L. *Aggregatum* group) on carbohydrate production in leaf blade of bunching onion (*A. fistulosum* L.). *Genes & Genetic Systems*, 79(6), 345–350.
- Hanelt, P. (1990). “Taxonomy, Evolution, and History.” In *Onions and Allied Crops*. edited by Haim D. Rabinowitch and James L. Brewster. Boca Raton, Fla.: CRC Press (pp. 1–26).
- Hanum, T. (1995). Pyruvate and flavor development in macerated onions (*Allium cepa* L.) by  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and exogenous C-S lyase. *Food Chemistry*, 54(2), 183–188.

- Havey, M. J., Cantwell, M., Jones, M. G., Jones, R. W., Schmidt, N. E., Uhlig, J., Yoo, K. S. (2002). Significant variation exists among laboratories measuring onion bulb quality traits. *HortScience*, 37(7), 1086–1087.
- Havey, M. J., Galmarini, C. R., Gökçe, A. F., & Henson, C. (2004). QTL affecting soluble carbohydrate concentrations in stored onion bulbs and their association with flavor and health-enhancing attributes. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil National de Recherches Canada*, 47(3), 463–468.
- Haydar, a, Sharker, N., Ahmed, M. B., Hannan, M. M., Hossain, M., & Karim, R. (2007). Genetic Variability and Interrelationship in Onion (*Allium cepa* L.). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2(3-4), 132–134.
- Hollman, P. C., De Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1276-1282.
- Hosamani, R. M., Patil, B. C., & Ajjappalavara, P. S. (2010). Genetic variability and character association studies in onion (*Allium cepa* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Science*, 23(2), 302–305.
- Hu, J., La Vecchia, C., Negri, E., Chatenoud, L., Bosetti, C., Jia, X., et al. (1999). Diet and brain cancer in adults. A casecontrol study in northeast China. *International Journal of Cancer*, 81, 20-23.
- Huang, T. H., Mühlbauer, R. C., Tang, C. H., Chen, H. I., Chang, G. L., Huang, Y. W., ... & Yang, R. S. (2008). Onion decreases the ovariectomy-induced osteopenia in young adult rats. *Bone*, 42(6), 1154-1163.
- Hubbard, G. P., Stevens, J. M., Cicmil, M., Sage, T., Jordan, P. a., Williams, C. M., Gibbins, J. M. (2003). Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(5), 1079–1088.

- Hubbard, G. P., Wolfram, S., de Vos, R., Bovy, A., Gibbins, J. M., & Lovegrove, J. a. (2006). Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *The British Journal of Nutrition*, 96(3), 482–488.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hung, H.-C., Joshipura, K. J., Jiang, R., Hu, F. B., Hunter, D., Smith-Warner, S., Willett, W. C. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(21), 1577–1584.
- Insani, E. M. 2010. Estudio del efecto de la Quercetina, FOS y *Allium cepa* L. sobre el estado oxidativo e inmunológico en un modelo de inmunodeficiencia secundaria a malnutrición proteica. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 281p.
- Jaime, L., Martín-Cabrejas, M. a, Mollá, E., López-Andréu, F. J., & Esteban, R. M. (2001). Effect of storage on fructan and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 982–988.
- Jeon, H., Kim, B., Lee, S., & Kim, Y. (2014). Quality Factors of Freshness and Palatability of Onion by Cultivation Region and Variety, *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43, 859–867.
- Kadams, a M., & Nwasike, C. C. (1986). Heritability and correlation studies on some vegetative traits in nigerian local white onion, *Allium-cepa* L. *Plant Breeding*, 97(3), 232–236.
- Kahane, R., E., Vialleguerin, I., Boukema, D., Tzanoudakis, C., Bellamy, Kik, C., & Chamaux, C. (2001). Changes in non structural carbohydrate composition during bulbing in sweet and high-solid onions in field experiments. *Environmental and Experimental Botany*, 45, 73–83.

- Kameya, H., Watanabe, J., Takano-Ishikawa, Y., & Todoriki, S. (2014). Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR. *Food Chemistry*, 145, 866–873.
- Ketter, C. A. and W. M. Randle. (1998). Pungency Assessment in Onions. Pages 177-196, in *Tested studies for laboratory teaching*, Volume 19 (S. J. Karcher, Editor). Proceedings of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 365 pages.
- Khanum, F., Anilakumar, K. R., & Viswanathan, K. R. (2004). Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 479-488.
- Khar, A., Lawande, K. E., & Negi, K. S. (2011). Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp. *Genetic resources and crop evolution*, 58(5), 741-752.
- Kim, C.-W., Lee, E.-T., Cha, Y.-L., Choi, I.-H., Hwang, E.-J., & Park, K.-G. (2012). Evaluation of Yellowish Skin Color (“chartreus”) Onion Lines for Soluble Solid Content and Sugars Characteristics. *Korean Journal of Breeding Science*, 44(4), 510–515.
- Kopsell, D. E. (1997). Onion cultivars differ in pungency and bulb quality changes during storage. *HortScience*, 32(7), 1260-1263
- Kuhl, J. C., Cheung, F., Yuan, Q., Martin, W., Zewdie, Y., McCallum, J., & Havey, M. J. (2004). A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. *The Plant Cell*, 16(1), 114-125.
- KyungHo, M., JaeGyun, K., WeiGuo, Z., Dixit, A., GiAn, L., HaengHoon, K., & YongJin, P. (2009). Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 122(3), 355-361.

- Lancaster, J. E., & Collin, H. . (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*, 22(2), 169–176.
- Lancaster, J. E., & Boland, M. J. (1990). Flavour Biochemistry. In J. L. Breswster & Rabinowitch (Eds.), *Onions and allied crops* (pp. 33–72). CRC Press, Boca Raton, Florida. USA.
- Lancaster, J. E., Shaw, M. L., & Randle, W. M. (1998). Differential hydrolysis of alk(en)yl cysteine sulphoxides by alliinase in onion macerates: flavour implications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), 367-372.
- Lau, B. H. S., Tadi, P. P., & Tosk, J. M. (1990). *Allium sativum* (garlic) and cancer prevention. *Nutrition Research*, 10, 937-948.
- Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., & Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 154-160.
- Lee, E. J., Yoo, K. S., Jifon, J., & Patil, B. S. (2009). Application of extra sulfur to high-sulfur soils does not increase pungency and related compounds in shortday onions. *Scientia Horticulturae*, 123(2), 178–183.
- Lee, G. A., Kwon, S. J., Park, Y. J., Lee, M. C., Kim, H. H., Lee, J. S., & Ma, K. H. (2011). Cross-amplification of SSR markers developed from *Allium sativum* to other *Allium* species. *Scientia Horticulturae*, 128(4), 401-407.
- Lee, S. M., Moon, J., Chung, J. H., Cha, Y. J., & Shin, M. J. (2013). Effect of quercetin-rich onion peel extracts on arterial thrombosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 99-105.
- Lee, E. J., Patil, B. S., & Yoo, K. S. (2015). Antioxidants of 15 onions with white, yellow, and red colors and their relationship with pungency, anthocyanin, and quercetin. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 108–114.

- Leelarungrayub, N., Rattanapanone, V., Chanarat, N., & Gebicki, J. M. (2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition*, 22(3), 266–274.
- Leighton, T., Ginther, C., Fluss, L., Harter, W. K., Cansado, J., Notaro, V. (1992). Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in *Allium* vegetables. Their effects on malignant cell transformation. In Phenolic Compounds from Food and Their Effect on Health; Huang, M. T., Ho, C. T., Lee, C. Y., Eds.; ACS Symp. Ser. 507, 220-238
- Levin, I., Gilboa, N., Yeselson, E., Shen, S., & Schaffer, a. a. (2000). Fgr , a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2), 256–262.
- Liakopoulou-Kyrakdes, M., A Sinakos, Z. (1992). A low molecular weight peptide from *Allium porum* with inhibitory activity on platelet aggregation *in vitro*. *Biochemistry International*, 28, 373–378.
- Lin, M.-W., Watson, J. F., & Baggett, J. R. (1995). Inheritance of Soluble Solids and Pyruvic Acid Content of Bulb Onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(1), 119–122.
- Liu, S., He, H., Feng, G., & Chen, Q. (2009). Effect of nitrogen and sulfur interaction on growth and pungency of different pseudostem types of Chinese spring onion (*Allium fistulosum* L.). *Scientia Horticulturae*, 121(1), 12–18.
- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H. M., Ross, C. F., Powers, J. R., Tang, J., & Rasco, B. A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129(2), 637-644.
- Luh, S. B., Somogyi, P. L., & Meehan, J. J. (1975). Vegetable dehydration. In L. B. S & W. J. P. (Eds.), *Commercial Vegetable Processing* (pp. 361–415). Westport, CT, USA: AVI Publishing Co Inc.

- Ly, T. N., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., & Yamauchi, R. (2005). Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8183-8189.
- Ma, K. H., Kwag, J. G., Zhao, W., Dixit, A., Lee, G. A., Kim, H. H., & Park, Y. J. (2009). Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Scientia horticulturae*, 122(3), 355-361.
- Macpherson, L. J., Geierstanger, B. H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S. R., Hwang, S., & Patapoutian, A. (2005). The pungency of garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Current Biology*, 15(10), 929-934.
- Mahajan, R., & Gupta, P. (2012). Molecular markers: their use in tree improvement. *J. FOR. SCI*, 58(3), 137-144.
- Mahmud, I., & Kramer, H. H. (1951). Segregation for yield, height, and maturity following a soybean cross. American Society of Agronomy.
- Mallor, C., Balcells, M., Mallor, F., & Sales, E. (2011). Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. *Plant Breeding*, 130(1), 55-59.
- Mallor, C., Arnedo-Andrés, M. S., & Garcés-Claver, A. (2014). Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, 170, 24-31.
- Mandukhail, S. U. R., Ahmed, A. F., Al-Yousef, H. M., Al-Qahtani, J. H., & Gilani, A. H. (2014). The Mechanism Underlying the Spasmolytic and Bronchodilatory Activities of the Flavonoid-rich Red Onion" *Allium cepa* L." Peel Extract. *International Journal Of Pharmacology*, 10(2), 82-89.

- Mann, L. and Hoyle, B. (1945) Use of refractometer for selecting onion bulbs high in dry matter for breeding. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 46, 285-289.
- Marfil, C. F., Masuelli, R. W., Davison, J., & Comai, L. (2006). Genomic instability in *Solanum tuberosum* × *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome*, 49(2), 104-113.
- Martin, W. J., McCallum, J., Shigyo, M., Jakse, J., Kuhl, J. C., Yamane, N., & Havey, M. J. (2005). Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(3), 197-204.
- Masuzaki, S., Araki, N., Yamauchi, N., Yamane, N., Wako, T., Kojima, A., & Shigyo, M. (2006). Chromosomal locations of microsatellites in onion. *HortScience*, 41(2), 315-318.
- Matheson, E. M., Mainous III, A. G., & Carnemolla, M. A. (2009). The association between onion consumption and bone density in perimenopausal and postmenopausal non-Hispanic white women 50 years and older. *Menopause*, 16(4), 756-759.
- McCullum, G. D. (1968). Heritability and genetic correlation of soluble solids, bulb size and shape in white sweet Spanish onion. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 10(3), 508-514.
- McCallum, J., Porter, N., Searle, B., Shaw, M., Bettjeman, B., & McManus, M. (2005). Sulfur and nitrogen fertility affects flavour of field-grown onions. *Plant and Soil*, 269(1-2), 151-158.
- McCallum, J., Clarke, A., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Butler, R., Brash, D., Havey, M. J. (2006). Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(5), 958-967.

- McCallum J: Onion. In *Vegetables, Volume 5 of Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Edited by Kole C, Kole C, *Springer Berlin Heidelberg* 2007:331–334.
- McCallum, J., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Kenel, F., Davis, S., Butler, R., Havey, M. J. (2007). Genetic mapping of sulfur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(5), 815–822.
- McCallum, J., Thomson, S., Pither-Joyce, M., Kenel, F., Clarke, A., & Havey, M. J. (2008). Genetic Diversity Analysis and Single-nucleotide Polymorphism Marker Development in Cultivated Bulb Onion Based on Expressed Sequence Tag–Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(6), 810-818.
- McCallum, J., Baldwin, S., Shigyo, M., Deng, Y., van Heusden, S., Pither-Joyce, M., & Kenel, F. (2012). *Allium* Map-A comparative genomics resource for cultivated *Allium* vegetables. *BMC genomics*, 13(1), 168.
- McCouch, S.R. & R.W. Doerge, 1995. QTL mapping in rice. *Trends in Genetics* 11: 482–487.
- McEwen, B. (2014) The Influence of Diet and Nutrients on Platelet Function. *Seminars of Thrombosis and Hemostasis*, 40, 214–226.
- Middleton, E., Middleton, E., Kandaswami, C., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751.
- Miean, K. H., Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106-3112.
- Miller, J. N. M., & Jane, C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica (No. 543.062: 519.23 MIL).

- Mohammad S. F., Woodward S. C. (1986). Characterisation of a potent inhibitor of platelet aggregation and release reaction isolated from *Allium sativum* (garlic). *Thromb Res*, 44: 793–806.
- Mohanty, B. K. (2001). Genetic variability, inter-relationship and path analysis in onion. *Journal of Tropical Agriculture*, 39, 17–20.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M.Yano, C.R. Bhatia & T. Sasaki, 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87–103.
- Moon, C. H., Jung, Y. S., Kim, M. H., Lee, S. H., Baik, E. J., & Park, S. W. (2000). Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A(2)synthase inhibition and TXA(2)/PGH(2)receptor blockade. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 62(5), 277–283
- Morales-Soto, A., García-Salas, P., Rodríguez-Pérez, C., Jiménez-Sánchez, C., Cádiz-Gurrea, M. D. L. L., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *Food Research International*, 58, 35–46.
- Moshfegh, a J., Friday, J. E., Goldman, J. P., & Ahuja, J. K. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1407S–11S.
- Naczk, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542.
- Nencini, C., Menchiari, A., Franchi, G. G., & Micheli, L. (2011). *In vitro* Antioxidant Activity of Aged Extracts of some Italian *Allium* Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 11–16.

- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81(4), 485–493.
- Pal, N., & Singh, N. B. (1988). Correlation and Path coefficient studies in onion. *Indian Journal of Horticulture*, 45(3-4), 295–299.
- Perchellet, J. P., Perchellet, E. M., & Bellman, S. (1990). Inhibition of DMBA-induced mouse skin tumorigenesis by garlic oil and inhibition of two tumor-promotion stages by garlic and onion oil. *Nutrition and Cancer*, 14, 183-193.
- Perron, N. R., Hodges, J. N., Jenkins, M., & Brumaghim, J. L. (2008). Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorganic Chemistry*, 47(14), 6153-6161.
- Pezzutti, A., Matzkin, M. R., & Croci, A. . C. (2005). Gamma irradiation improved the quality of onion flakes used by argentine consumers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 29, 120–131.
- Phytologist, S. N., & May, N. (2009). Fructan metabolism in to two species and water of Bromus stress subjected chilling. *New Phytologist*, 136(1), 123–129.
- Platel, K., & Srinivasan, K. (2001). Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats. *Nutrition Research*, 21, 1309-1314.
- Platenius, H. (1941). Factors affecting onion pungency. *Journal of Agricultural Research*, 62(6), 371–379.
- Price, K. R., Bacon, J. R., & Rhodes, M. J. C. (1997). Effect of Storage and Domestic Processing on the Content and Composition of Flavonol Glucosides in Onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 938–942.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Hampsch-woodill, M., Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical

- absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273–3279.
- Quattrocchi, O. A., de Andrizzi, S. I. A., & Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro.
- Queiroz, Y. S., Ishimoto, E. Y., Bastos, D. H. M., Sampaio, G. R., & Torres, E. a F. S. (2009). Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: *In vitro* antioxidant activity. *Food Chemistry*, 115(1), 371–374.
- Rabinowitch, H. D., & Currah, L. (2002). *Allium* crop science: recent advances. CABI publishing.
- Randle, W. M., & Lancaster, J. E. (2002). Compounds in *Alliums* in Relation to Flavour Quality. In H. D. Rabinowitch & L. Currah (Eds.), *Allium* Crop Science: Recent Advances (pp. 330–350). CABI Publishing.
- Randle, W. M. (1992). Onion germplasm interacts with sulfur fertility for plant sulfur utilization and bulb pungency. *Euphytica*, 59(2-3), 151–156. 7
- Randle, W. M., & Bussard, M. L. (1993). Streamlining Onion Pungency Analyses. *Hortscience*, 28(1), 60.
- Randle, W., & Bussard, M. (1993). Pungency and sugars of short-day onions as affected by sulfur nutrition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(6), 766–770.
- Randle, W. M., Bussard, M. L., & Warnock, D. F. (1993). Temperature affects plant growth and sulfur utilization in onion (*Allium cepa*). *HortScience*, 28(5), 467–467.
- Randle, W. M. (1995). Preplant calcium affects onion bulb quality and shelf life. In *HortScience 92nd Annual Meeting of the American Society for Horticultural Science* (Vol. 20, p. 768).

- Randle, W. M. (2000). Increasing nitrogen concentration in hydroponic solutions affects onion flavor and bulb quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(2), 254–259.
- Randle, W. M., & Lancaster, J. E. (2002). Compounds in *Alliums* in Relation to Flavour Quality. In H. D. Rabinowitch & L. Currah (Eds.), *Allium Crop Science: Recent Advances* (pp. 330–350). CABI Publishing.
- Randle, W. M., Kopsell, D. E., & Kopsell, D. A. (2002). Sequentially Reducing Sulfate Fertility During Onion Growth and Development Affects Bulb Flavor at Harvest, 37(1), 118–121.
- Resemann, J., Bufler, G., Liebig, H. P., & Carle, R. (2004). Factors affecting quality traits of onion (*Allium cepa* L.) bulbs for the production of onion juice concentrate and onion oil. *European Journal of Horticultural Science*, 45-52.
- Rhodes, M. J. C., & Price, K. R. (1996). Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. *Food Chemistry*, 57(1), 113–117.
- Richardson, S. J. (1993). Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 695, 73-76.
- Rieseberg, L. H., Archer, M. a, & Wayne, R. K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, 83 ( Pt 4)(July), 363–372.
- Ribaut, J.-M.&D. Hoisington, (1998). Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3: 236–239.
- Ricroch A, Yockteng R, Brown S, Nadot S: (2005). Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome*, 48(3):511–520.
- Ro, J.-Y., Ryu, J.-H., Park, H.-J., & Cho, H.-J. (2015). Onion (*Allium cepa* L.) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. *SpringerPlus*, 4(1).

- Robinson, H. F., Comstock, R. E., & Harvey, P. H. (1949). Estimates of Heritability and the Degree of dominance in corn. *Agronomy Journal.*, (41), 353–359.
- Roldán-Marín, E., Sánchez-Moreno, C., Lloría, R., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2009). Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 835–841.
- Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K., & Zhu, Y. Z. (2005). Bioactive Salk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Product Reports*, 22, 351-368.
- Sance, M. M., González, R. E., Soto, V. C., & Galmarini, C. R. (2008). Relationships between antiplatelet activity, dry matter content and flavor in onion cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 6(3-4), 41–46.
- Sance, M. M. (2010). Caracterización de la variabilidad presente en el germoplasma argentino de cebolla por sus efectos benéficos para la salud humana y su relación con la pungencia. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.
- Sanchez, M., Lodi, F., Vera, R., Villar, I. C., Cogolludo, A., Jimenez, R., et al. (2007). Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47(phox) induced by angiotensin II in rat aorta. *The Journal of Nutrition*, 137, 910-915.
- Santos, C. A. F., Correa, L. C., Ribeiro, H. L. C., de Oliveira, M. M., & Araujo, J. S. (2009). Transferência de primers ssrs de *Allium fistulosum* para *A. cepa*. *Hortic. bras*, 27(2).
- Schwimmer, S., & Weston, W. J. (1961). Onion Flavor and Odor, Enzymatic Development of Pyruvic Acid in Onion as a Measure of Pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9(4), 301–304.

- Sellappan, S., & Akoh, C. C. (2002). Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown *Vidalia* onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5338-5342.
- SENASA. (2013). No Title. Retrieved from [www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File7527-ilustracion\\_cebolla\\_final.pdf](http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File7527-ilustracion_cebolla_final.pdf)
- Simon, P. W. (1995). Genetic analysis of pungency and soluble solids in long-storage onions. *Euphytica*, *82*(1), 1–8.
- Sinclair, P. J., Blakeney, A. B., & Barlow, E. W. R. (1995). Relationships between bulb dry matter content, soluble solids concentration and non-structural carbohydrate composition in the onion (*Allium cepa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *69*(2), 203–209
- Singleton, V. . L., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, (16), 144–158.
- Slimestad, R., Fossen, T., & Vågen, I. M. (2007). Onions: A source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(25), 10067–10080.
- Slimestad, R., & Vågen, I. M. (2009). Distribution of non-structural carbohydrates, sugars, flavonols and pyruvate in scales of onions, *Allium cepa* L. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *7*(3-4), 289–294.
- Sokół-Łetowska, A., Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chemistry*, *103*(3), 853–859.
- Srinivasan, K. (2005). Plants food in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *International Journal of Food Science and Nutrition*, *56*, 399-414.
- Srivastava K. C. Onion exerts antiaggregatory effects by altering arachidonic acid metabolism in platelets. *Prostagl Leukot Med* 1986; *24*: 43–50.

- Stoll, A., & Seeheck, E. (1951). Chemical investigations on alliin the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol*, 11, 377–400.
- Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, 108(3), 879–884.
- Suzuki, M., & Cutcliffe, J. a. (1989). Fructans in Onion Bulbs in Relation To Storage Life. *Canadian Journal of Plant Science*, 69(4), 1327–1333.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R., & Graner, A. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106(3), 411-422.
- Tsukazaki, H., Yamashita, K. I., Yaguchi, S., Masuzaki, S., Fukuoka, H., Yonemaru, J., ... & Wako, T. (2008). Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium fistulosum*). *Theoretical and applied genetics*, 117(8), 1213-1223.
- Uddin, M. M., & MacTavish, H. S. (2003). Controlled atmosphere and regular storage-induced changes in S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and alliinase activity in onion bulbs (*Allium cepa* L. cv. Hysam). *Postharvest Biology and Technology*, 28(2), 239–245. 5-3
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- USDA. (2014). No. Retrieved from <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Vavrina, D. A., & Smittle, C. S. (1993). Evaluating sweet onion cultivars for sugar concentrations and pungency. *HortScience* 28(8), 804-806., 28(8), 804–806.
- Vazquez-Prieto, M. A., Rodriguez Lanzi, C., Lembo, C., Galmarini, C. R., & Miatello, R. M. (2011). Garlic and onion attenuates vascular inflammation and oxidative stress in fructose-fed rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2011.

- Velíšek, J., Kubec, R., & Cejpek, K. A. R. E. L. (2006). Biosynthesis of food constituents: amino acids. 4. Non-protein amino acids—a review. *Czech journal of food sciences*, 24, 93-109.
- Virtanen, A. I., & Matikkala, E. J. (1959). The structure and synthesis of cycloalliin isolated from *Allium-cepa*. *Acta Chemica Scandinavica*, 13(3), 623–626.
- Wagner, H., Dorsch, W., Bayer, T., Breu, W., & Willer, F. (1990). Antiasthmatic effects of onions: inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase *in vitro* by thiosulfinates and “cepaenes”. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 39, 59-62.
- Wall, M. M., & Corgan, J. N. (1992). Relationship between pyruvate analysis and pungency perception in onion. *HortScience*, 27(9), 1029–1030.
- Wall, M. M., Mohammad, a., & Corgan, J. N. (1996). Heritability estimates and response to selection for the pungency and single center traits in onion. *Euphytica*, 87(2), 133–139.
- Wall, A. D., & Corgan, J. N. (1999). Heritability estimates and progeny testing of phenotypic selections for soluble solids content in dehydrator onion. *Euphytica*, 106(1), 7–13.
- Wang, X., Liu, R., Yang, Y., & Zhang, M. (2015). Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. *Food chemistry*, 187, 37-43.
- Weisberger, A. S., & Pensky, J. (1958). Tumor inhibition by a sulfhydryl blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Cancer Research*, 18, 1301-1308.
- Whitaker, J. R. (1976). Development of flavor, odor, and pungency in onion and garlic. *Advances in Food Research*, 22, 73–133.
- Wilson, C., Oross, J. W., & Lucas, W. J. (1985). Sugar uptake into *Allium cepa* leaf tissue: an integrated approach. *Planta*, 164(2), 227–240.

- Yamada, K., Naemura, A., Sawashita, N., Noguchi, Y., Yamamoto, J., 2004. An onion variety has natural antithrombotic effect as assessed by thrombosis/ thrombolysis models in rodents. *Thromb. Res.* 114, 213–220.
- Yan-Hwa, C., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 561–566.
- Yang, J., Meyers, K. J., van der Heide, J., & Liu, R. H. (2004). Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6787–6793.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. a, Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 59(3), 113–122.
- Yoo Kil-Sun, Pike, L. M., & Hamilton, B. K. (1995). A simplified pyruvic acid analysis suitable for onion breeding programs. *HortScience*, 30(6), 1306.
- Yoo, K. S., & Pike, L. M. (1999). Development of an automated system for pyruvic acid analysis in onion breeding. *Scientia Horticulturae*, 82, 193–201
- Yoo, K. S., Pike, L., Crosby, K., Jones, R., & Leskovar, D. (2006). Differences in onion pungency due to cultivars, growth environment, and bulb sizes. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 144–149.
- Yoo, K. S., Lee, E. J., & Patil, B. S. (2011a). Improved Consistency in DNPH-Mediated Pyruvic Acid Analysis of Onion Juice by Modifying the Sample Processing Order. *Journal of Food Science*, 76(1), 162–167.
- Yoo, K. S., Lee, E. J., & Patil, B. S. (2011b). Underestimation of Pyruvic Acid Concentrations by Fructose and Cysteine in 2,4-Dinitrophenylhydrazine-Mediated Onion Pungency Test. *Journal of Food Science*, 76(8), 1136–1142.

- Yoo, K. S., Lee, E. J., & Patil, B. S. (2012). Changes in Flavor Precursors, Pungency, and Sugar Content in Short-Day Onion Bulbs during 5-Month Storage at Various Temperatures or in Controlled Atmosphere. *Journal of Food Science*, 77(2), 216–221.
- You, W. C., Zhang, L., Gail, M. H., Ma, J. L., Chang, Y. S., Blot, W. J., et al. (1998). Helicobacter pylori infection, garlic intake and precancerous lesions in a Chinese population at low risk of gastric cancer. *International Journal of Epidemiology*, 27(6), 941-944.
- Zhang, L., Ravipati, A., Koyyalamudi, S., Jeong, S., Reddy, N., Smith, P., Wu, M. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12361-12367.
- Zhang, L., Ravipati, A., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., Wu, M. J. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 7(1), 26.
- Zhen-Yu Chen, Cheng Peng, Rui Jiao, Yin Mei Wong, Nan Yang, and Yu Huang. (2009). Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11), 4485-4499.

