

**ESTUDIO GENÉTICO Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA A LA
VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA (*DAUCUS CAROTA* L.)**

Por

MARÍA SOLEDAD ALESSANDRO
Ingeniera Agrónoma
Magíster Scientiae

Tesis presentada como requerimiento parcial
para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PROBIOL
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

DICIEMBRE 2011

A Flavio y Joaquín, mis amores, por su aguante y compañía.

A mis papás por darme la oportunidad primera.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por permitirme realizar el doctorado, financiando cursos y tesis. Al Dr. Claudio Galmarini, quién me guío en todo este proceso.

A mis compañeros de INTA La Consulta por su compañía, aliento e intercambio de ideas durante los años que duró la elaboración de la tesis. A Jorge Bergamín, Vicente Guzman, Hector Fuligna y Pedro Della Gaspera, quienes colaboraron para la implantación y mantenimiento de los ensayos a campo.

Al Dr. Philipp Simon (Universidad Wisconsin/USDA) por haberme recibido en su laboratorio, permitiéndome el uso de equipamientos y todo lo necesario para elaborar el análisis molecular de esta tesis. A miembros (técnicos, doctorandos, estudiantes) del Laboratorio de Biología Molecular del Dr. Simon, por colaborar de distintas maneras en la realización de esta tesis y acompañarme durante mis estadias de investigación.

Al PROBIOL de la UNCuyo, por brindarme el marco académico para obtener el título de postgrado. Y a mis tutores y jurados por la lectura crítica del manuscrito.

ESTUDIO GENÉTICO Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA A LA VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA (*DAUCUS CAROTA* L.)

Resumen

Por María Soledad Alessandro
Universidad Nacional de Cuyo
Diciembre 2011

Director: PhD. M Sc. Ing. Agr. Claudio R. Galmarini

La zanahoria es una planta bienal de estación fría que requiere de un período de vernalización para florecer. Sin embargo, algunos cultivares adaptados a zonas más cálidas requieren de menor vernalización y son clasificados como anuales o de floración temprana. El objetivo de esta tesis fue determinar la base genética e identificar los genes y/o regiones cromosómicas involucradas en los requerimientos de vernalización en la zanahoria. Para ello fueron evaluadas a campo familias segregantes F₁, F₂, F₃, RC₁ y RC₂ obtenidas a partir de un cruzamiento entre una planta anual y una bienal. En base a los patrones de segregación observados se concluyó que la anualidad, o bajos requerimientos de vernalización, estaría determinada por un gen simple dominante. Al evaluar introducciones de zanahoria anuales y bienales de diversos orígenes geográficos y sus cruzamientos, se volvió a observar la total dominancia de la anualidad y se encontró variabilidad en el ciclo entre materiales anuales y entre materiales bienales. Utilizando un método molecular que se basa en similitud completa (BLAST), no se encontró en el genoma de la zanahoria secuencias homólogas al gen *FLC*, el cual juega un rol central en la respuesta a la vernalización en *Arabidopsis* y otras especies como las *Brassicacae*. Mediante la técnica de mapeo se encontró una región cromosómica ligada a la respuesta a la vernalización en zanahoria. La misma se localizó en un grupo de ligamiento con 78 marcadores moleculares a una distancia de 0,69 cM y de 0,79 cM de los marcadores más cercanos. Este mapa servirá como base para el desarrollo de marcadores moleculares ligados al carácter y en un futuro para el mapeo físico y secuenciación de la región de interés utilizando una librería génica de BACs de zanahoria.

Palabras clave: *Daucus carota* L., vernalización, anual, bienal, mapa de ligamiento.

**GENETIC AND MOLECULAR STUDY OF VERNALIZATION RESPONSE IN
CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.)**

Abstract

By María Soledad Alessandro
Universidad Nacional de Cuyo
December 2011

Director: PhD. M Sc. Ing. Agr. Claudio R. Galmarini

Carrot (*Daucus carota* L.) is a cool-season vegetable normally classified as a biennial species, requiring vernalization to induce flowering. Nevertheless, some cultivars adapted to warmer climates require less vernalization and can be classified as early-flowering or annual. The main objective was determine the genetic of the trait and find genomic regions involved in carrot vernalization requeriments. We evaluated F₁, F₂, F₃, BC₁ and BC₂ progenies of an intercross between an annual carrot and a biennial carrot. Observed segregation ratios confirmed that annual habit is dominant over biennial and is a monogenic character. When annual and biennial accessions of different geographic sites, and crosses between them, were evaluated, complete dominance of annual habit and also variability between annual and between biennial accesions was observed. Working with BLAST, a molecular method that relies on overall similarity, we could not identify *FLC* homologs in carrot genome, a gene that plays a central role in species like *Arabidopsis* and *Brassicac*s vernalization response. With the construction of a linkage map a genomic region linked to vernalization response in carrot was identified. That region was mapped in a linkage group with 78 molecular markers and flanking markers were at 0.69 and 0.79 cM. This map could be used to develop molecular markers linked to the trait and also in the future to start physical mapping and secuencing using a carrot BAC library.

Key words: *Daucus carota* L., vernalization, annual, biennial, linkage map.

INDICE

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INDICE.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.1. Importancia del cultivo de zanahoria.....	2
1.1.2. Situación de la producción de zanahoria en la Argentina.....	3
1.1.3. Origen y sistemática de la zanahoria.....	4
1.1.4. El proceso de vernalización.....	5
1.1.5. Estudios genéticos sobre la respuesta a la vernalización.....	8
1.1.6. Estudios moleculares sobre la respuesta a la vernalización.....	10
1.2. Hipótesis.....	15
1.3. Objetivo General.....	15
1.4. Objetivos específicos.....	15
1.5. BIBLIOGRAFÍA.....	17
CAPÍTULO 2: BASE GENÉTICA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA.	
2.1. INTRODUCCIÓN.....	23
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.2.1. Material vegetal.....	25
2.2.2. Metodología.....	28
2.2.2.1. Evaluación a campo primer año.....	28
2.2.2.2. Evaluación a campo segundo año.....	29

2.2.2.3. Evaluación a campo tercer año	30
2.3. RESULTADOS.....	30
2.3.1. Primer Año.....	30
2.3.2. Segundo Año.....	33
2.3.3. Tercer Año.....	37
2.4. DISCUSIÓN.....	40
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	44

CAPÍTULO 3: HERENCIA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIAS ANUALES Y BIENALES DE DIVERSOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS.

3.1. INTRODUCCIÓN.....	48
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.2.1. Material vegetal.....	50
3.2.2. Metodología.....	52
3.3. RESULTADOS.....	52
3.4. DISCUSIÓN.....	58
3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	62

CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARACTER REQUERIMIENTO DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: BÚSQUEDA A TRAVÉS DE GENES ORTÓLOGOS.

4.1. INTRODUCCIÓN.....	65
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
4.2.1. Material vegetal.....	68
4.2.2. Metodología.....	68
4.3. RESULTADOS	70
4.4. DISCUSIÓN.....	81
4.4. BIBLIOGRAFÍA.....	84

CAPÍTULO 5: IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARACTER REQUERIMIENTO DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: EMPLEO DE UN MAPA DE LIGAMIENTO.

5.1. INTRODUCCIÓN.....	87
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
5.2.1. Material vegetal.....	90
5.2.2. Metodología.....	90
5.3. RESULTADOS	92
5.4. DISCUSIÓN.....	109
5.5. BIBLIOGRAFÍA.....	111
CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL	
6.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	114
6.2. BIBLIOGRAFÍA.....	118
ANEXO I. Datos climáticos.....	120
ANEXO II. Análisis de variancia y pruebas de medias.....	126
ANEXO III. Protocolos utilizados en laboratorio.....	140

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 2: BASE GENÉTICA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA.

RESULTADOS

Tabla 2.1. Valores observados y esperados para la relación anuales: bienales en las poblaciones segregantes de zanahoria bajo la hipótesis de un gen dominante simple que determina la anualidad, valores de chi-cuadrado (χ^2), y probabilidades (P). Siembra del 4/5/05.....33

Tabla 2.2. Valores observados y esperados para la relación anuales: bienales en las poblaciones segregantes de zanahoria bajo la hipótesis de un gen dominante simple que determina la anualidad, valores de chi-cuadrado (χ^2), y probabilidades (P). Siembra del 8/5/06.....38

CAPÍTULO 3: HERENCIA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIAS ANUALES Y BIENALES DE DIVERSOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS.

RESULTADOS

Tabla 3.1. Prueba de Duncan para diferencia de medias por cultivar de los porcentajes de plantas entalladas.....53

Tabla 3.2. Porcentaje de plantas entalladas por cultivar54

CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARACTER REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: BÚSQUEDA A TRAVÉS DE GENES ORTÓLOGOS.

RESULTADOS

Tabla 4.1. Grado de similitud entre bandas amplificadas por los cebadores F1a y R7a.....73

Tabla 4.2. Grado de similitud entre bandas amplificadas por los cebadores F2d y R7d.....	73
Tabla 4.3. Secuencias de bandas amplificadas por los cebadores F1a y R7a (bandas 5 y 7), y por los cebadores F2d y R7d (bandas 10, 11, 12 y 13).....	73
Tabla 4.4. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 5.....	75
Tabla 4.5. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 7.....	76
Tabla 4.6. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 10.....	77
Tabla 4.7. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 11.....	78
Tabla 4.8. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 12.....	79
Tabla 4.9. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 13.....	81

CAPÍTULO 5: IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARACTER REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: EMPLEO DE UN MAPA DE LIGAMIENTO.

RESULTADOS

Tabla 5.1. Valores observados en los productos de amplificación de cada marcador microsatélite en la población F2. Análisis del ajuste a los patrones de segregación esperados, 3:1 para una F2, mediante los valores de chi-cuadrado (χ^2) y significancia.....	93
Tabla 5.2. Valores observados en los productos de amplificación de los marcadores RAPD en la población F2. Análisis del ajuste a los patrones de segregación esperados, 3:1 para una F2, mediante los valores de chi-cuadrado (χ^2) y significancia. Los marcadores con valores de χ^2 mayores a 10 fueron descartados para la construcción del mapa de ligamiento.....	95
Tabla 5.3. Valores observados en los productos de amplificación del marcador RAPD Q1/800Flanking en la población F2. Análisis del ajuste a los patrones de segregación esperados, 3:1 para una F2, mediante los valores de chi-cuadrado (χ^2) y significancia.....	96

Tabla 5.4. Bandas totales y bandas polimórficas resultantes de las reacciones de amplificación con cada combinación de cebadores específicos utilizados en la técnica de AFLP.....	97
Tabla 5.5. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 1, 2, 3 y 4.....	99
Tabla 5.6. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 5, 6, 7 y 8.....	100
Tabla 5.7. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 9, 10, 11 y 12.....	101
Tabla 5.8. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 13, 14, 15 y 16.....	102
Tabla 5.9. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 17 y 18.....	102
Tabla 5.10. Distribución de los marcadores en los grupos de ligamiento.....	107
Tabla 5.11. Marcadores posicionados en el grupo de ligamiento 3.....	108

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: BASE GENÉTICA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2.1. Jaulas de aislamiento.....	25
Figura 2.2. Esquema de cruzamientos y familias segregantes obtenidas y evaluadas en los tres años de ensayo.....	27
Figura 2.3. Etapas fenológicas de plantas de zanahoria en floración: A- primer entrenudo del tallo floral alongado; B- primordio de la umbela primaria desarrollado; C- planta con umbela primaria en floración.....	29

RESULTADOS

Figura 2.4. Proporción de plantas de zanahoria florecidas en 3 fechas de siembra para los progenitores anuales (A), los progenitores bienales (B) y sus cruzamientos (F1). Para cada categoría se presentan la media y el desvío estándar.....	31
Figura 2.5. Evolución de la floración de plantas de zanahoria sembradas en 3 fechas. En cada fecha de siembra están representadas las semanas desde la siembra hasta el 50 % de plantas entalladas (E50), 100 % de plantas entalladas (E100), 50 % de plantas con primordios florales (P50), 100 % de primordios florales (P100), 50 % de plantas florecidas (F50) y 100 % de plantas florecidas (F100), para el grupo de padres anuales (A), de padres bienales (B) y sus cruzamientos (F1). Para cada categoría se presentan las medias y los desvíos estándar. Además, se presentan los días promedio desde la siembra hasta E50 y F100.....	32
Figura 2.6. Familia F ₂ b, madre bienal B2 y padre anual A2 (de izquierda a derecha), sembrados el 4/5/05. Fotografía sacada el 10/11/05.	34
Figura 2.7. Familia F ₂ a y madre bienal B2 (de izquierda a derecha), sembradas el 4/5/05. Fotografía sacada el 10/11/05.....	34
Figura 2.8. Madre bienal B2 y retrocruza RC1c (de izquierda a derecha), sembradas el 4/5/05. Foto tomada el 10/11/05.....	35

Figura 2.9. Porcentajes de plantas entalladas para las F1 y familias retrocruzas en cada observación semanal. Las semanas desde la siembra (4/5/2005) se encuentran representadas en el eje x. Las fechas en las que los respectivos progenitores (A1, A2 y B2) presentaron el mayor porcentaje de plantas entalladas, se encuentra representadas por flechas. El progenitor B1 no se encuentra representado en los gráficos por no haber presentado plantas florecidas. En cuanto al progenitor B2, solo un 12 % de plantas florecieron.....36

Figura 2.10. Porcentajes de plantas entalladas por semana para las familias F2 en la primer (4/5/2005) y segunda (14/6/2005) fecha de siembra. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra. Las fechas en las que los respectivos progenitores (A2 y B2) presentaron el mayor porcentaje de plantas entalladas, se encuentra representadas por flechas. Para el progenitor B2 solo un 12% y un 6% de plantas florecieron en la primer y segunda fecha de siembra, respectivamente.....37

Figura 2.11. Porcentajes de plantas entalladas por semana para las familias B2xA2, F_{2a} y F_{2b} y BC_{2c} sembradas el 8 de mayo de 2006. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra. Las fechas en las que los respectivos progenitores (A2 y B2) presentaron el mayor porcentaje de plantas entalladas, se encuentra representadas por flechas. Para el progenitor B2 solo un 1,8% de plantas florecieron.....39

Figura 2.12. Porcentajes de plantas entalladas por semana para las familias F_{3a}, F_{3b}, F_{3d} y F_{3d} sembradas el 8 de mayo de 2006. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra.....40

CAPÍTULO 3: HERENCIA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIAS ANUALES Y BIENALES DE DIVERSOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS.

RESULTADOS

- Figura 3.1. Porcentajes acumulados de plantas entalladas por semana para los materiales B2, EEUU, Criolla INTA, Turquía60, EEUUxTurquía60, Turquía88, EEUUxTurquía88 y EEUUxJapón60 sembrados el 29 de abril de 2008. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra. El material Japón60 no está graficado por la pequeña cantidad de plantas evaluadas.....54
- Figura 3.2. Genotipos EEUU, Turquía60, India87 y EEUUxTurquía60 (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.....55
- Figura 3.3. Genotipos EEUUxJapón60, B2xIndia87 y CriollaINTA (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.....56
- Figura 3.4. Genotipos Turquía60 e India87 (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.....57
- Figura 3.5. Genotipos Pakistán35, B2, EEUUxTurquía60, EEUUxTurquía88 (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.....58

CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARACTER REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: BÚSQUEDA A TRAVÉS DE GENES ORTÓLOGOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 4.1. Estructura genómica del gen *FLC* de *Arabidopsis thaliana* con las secuencias de los cebadores de exones 2 y 7 utilizados para clonar homólogos del gen en *Brassica rapa*.....69

RESULTADOS

- Figura 4.2. Gel de agarosa con las pruebas de gradiente de temperatura de templado de los cebadores F1a y R7a.....70

Figura 4.3. Gel de agarosa con los productos resultantes de la amplificación a 49°C con los cebadores F1a y R7a en 8 plantas de zanahorias anuales y bienales, en dos repeticiones.....	71
Figura 4.4. Gel de agarosa con los productos de amplificación de 8 genotipos anuales y bienales con los cebadores F1a y R7a, F1b y R7b, y F1c y R7c.....	71
Figura 4.5. Gel de agarosa con los productos de amplificación de los cebadores F1a-R7a con dos temperaturas de templado (48,2 y 49,6°C) y de los cebadores F2d-R7d con dos temperaturas de templado (48,7 y 52°C). Fueron utilizadas 3 plantas bienales (B) y 5 plantas anuales (A). Se observan bandas amplificadas de 500 (Banda 7), 750 (Bandas 1, 2, 3, 4 y 5) y 1000 (Banda 6) pares de bases para F1a-R7a, y bandas de 250 (Banda 13), 1000 (Bandas 8, 9 y 10), 2000 (Banda 12) y 3000 (Banda 11) pares de bases para los cebadores F2d-R7d.....	72

CAPÍTULO 5: IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARACTER REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: EMPLEO DE UN MAPA DE LIGAMIENTO.

RESULTADOS

Figura 5.1. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite gssr91.....	94
Figura 5.2. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite gssr111.....	94
Figura 5.3. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite bssr73.....	94
Figura 5.4. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite gssr104. En este caso el marcador fue considerado dominante.....	94
Figura 5.5. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador RAPD OPaa17. Las bandas 1, 2 y 3 resultaron polimórficas en la población F2.....	96
Figura 5.6. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador RAPD BC600. Las bandas 1 y 2 resultaron polimórficas en la población F2.....	96

Figura 5.7. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador SCAR Q800flanking.....	96
Figura 5.8. Gel de poliacrilamida con parte de los productos de amplificación de los marcadores específicos EAAC-MCTA, a la izquierda, y EAAC-MCAT, a la derecha, en 32 individuos de la población F2.....	98
Figura 5.9. Gel de poliacrilamida con parte de los productos de amplificación de los marcadores específicos EAAG-MCAT en 64 individuos de la población F2.....	98
Figura 5.10. Mapa final con los 10 grupos de ligamiento.....	104

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Importancia del cultivo de zanahoria

La producción mundial de zanahoria se encuentra alrededor de los 27 millones de toneladas, de los cuales Asia produce el 47 %, Europa el 34 %, América del Norte y Central el 9 % y Sudamérica cerca del 4 %. Los principales países productores son China (9,1 millones de t), la Federación Rusa (1,9 millones de t) y EEUU (1,6 millones de t), entre otros. Dentro de América del Sur los principales productores son Brasil, Argentina, Venezuela, Colombia y Perú (datos 2007, FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>).

El rendimiento promedio mundial es de 22,3 t/ha, aunque se destacan países como el Reino Unido con un rendimiento promedio de 63,6 t/ha, Israel con 63 t/ha, Bélgica con 61,7 tn/ha, Holanda con 57,3 t/ha, y Suecia con 56,6 t/ha. En América del Sur el rendimiento promedio es de 20,9 t/ha (datos 2007, FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>).

La producción mundial de zanahorias para consumo humano pasó de 5,5 millones de toneladas en 1963 a 16 millones en 1996. Esta tasa de crecimiento fue mayor que la tasa de crecimiento de la población mundial; este aumento se debió, entre otras cosas, a un mayor conocimiento por parte del consumidor sobre las contribuciones de esta hortaliza a la salud humana, al desarrollo de cultivares con mejor sabor, a la mejora de las prácticas de manejo y a la expansión del almacenaje refrigerado (Rubatzky *et al.*, 1999). El uso de híbridos en EEUU contribuyó en un 40 % al aumento en el rendimiento promedio entre 1955 y 1975, sin embargo no se han hecho grandes esfuerzos en el desarrollo de cultivares mejorados para las áreas de cultivo tropicales o subtropicales (Simon, 2000).

La zanahoria no es una fuente de calorías significativa en la dieta humana, entre las frutas y hortalizas se encuentra en el sexto lugar en cuanto a aporte nutricional (Alasalvar *et al.*, 2001). Sin embargo, las zanahorias son una fuente importante de nutrientes por su contenido de pigmentos, entre los que se incluyen carotenoides, antocianinas y otros flavonoides. Entre los beneficios para la salud de estos compuestos podemos citar la protección contra ciertas formas de cáncer, la reducción de riesgos cardiovasculares y la eliminación de radicales libres (revisado por van den Berg *et al.*, 2000).

La zanahoria es una importante fuente de carotenoides, variando su contenido en raíces desde 6000 a más de 54000 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (60-540 p.p.m.) (Simon y Wolf, 1987). En las zanahorias naranjas encontramos principalmente α y β carotenos que son precursores de la

vitamina A. Los carotenos tienen propiedades antimutagénicas, fotoprotectoras y de realce del sistema inmune, debido a sus propiedades antioxidantes. El β caroteno, en particular, colabora con la salud de la piel y reduce el riesgo de la formación de cataratas. En EEUU, por ejemplo, la zanahoria es la fuente más importante de provitamina A, proveyendo 30 % del total en la dieta de sus habitantes (Rubatzky *et al.*, 1999). A nivel mundial, la deficiencia de vitamina A todavía es un problema importante, especialmente en países en vías de desarrollo, causando ceguera en niños (van den Berg *et al.*, 2000).

La creciente preocupación por el cuidado de la salud en la población permitiría inferir un aumento en la demanda de la zanahoria en el futuro. Para satisfacer esta demanda será necesario el desarrollo de cultivares adaptados a más zonas de cultivo y la mejora de la calidad alimenticia de la zanahoria, a través del incremento del contenido de carotenos (provitamina A) y otros compuestos favorables para la salud humana.

1.1.2. Situación de la producción de zanahoria en la Argentina

En la República Argentina se producen anualmente alrededor de 231.000 toneladas de raíces en una superficie de 9.700 hectáreas (datos 2007, FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>). El mayor porcentaje de la producción se destina al consumo en fresco y un pequeño porcentaje a la industria del deshidratado y otros procesos. El consumo *per capita* nacional la ubica en sexto lugar entre las hortalizas.

Las principales zonas productoras son Cuyo (Mendoza y San Juan), Centro (Córdoba y Santiago del Estero), Litoral (Buenos Aires y Santa Fe) y Salta. Del total de la superficie cultivada el 34,9 % corresponde a Mendoza, 25,9 % a Santiago del Estero y 17,3 % a Buenos Aires (Proyecto Nacional Zanahoria INTA). En cuanto a los volúmenes ingresados al Mercado Central de Buenos Aires, el 36,8 % pertenece a Mendoza, el 24,1 % a Buenos Aires, el 14,2 % a Santa Fe y el 14,2 % a Santiago del Estero (Proyecto Nacional Zanahoria INTA).

En la provincia de Mendoza la zanahoria representa el 6,5 % (2.449 ha) de la superficie cultivada con hortalizas, ubicándose en sexto lugar de importancia; con una producción entre 75.000 y 95.000 toneladas de raíces (Proyecto Nacional Zanahoria INTA).

La producción de semillas hortícolas es una actividad creciente en la Argentina, habiendo aportado ingresos en exportaciones por más de 7 millones de dólares en 2009 (Fuente INASE, 2010). La zona de Cuyo presenta condiciones ideales para la producción

de semillas de zanahorias por poseer inviernos fríos que inducen una floración abundante y uniforme, una estación estival seca que favorece la completa maduración de las semillas y, además, baja humedad ambiental, mínimas precipitaciones, buena luminosidad y temperaturas favorables que reducen la difusión de enfermedades. A pesar de esto, nuestro país importa prácticamente toda la semilla de zanahoria bienal principalmente desde Francia, Dinamarca, EEUU y Holanda. Paralelamente, en los últimos años la cantidad de semilla híbrida exportada pasó de 5700 kg en 2002 a un promedio de 60.000 kg por año entre 2006 y 2009, con destino a EEUU, Chile, y Brasil principalmente (Fuente: INASE y SENASA, 2010).

1.1.3. Origen y sistemática de la zanahoria

La zanahoria es una dicotiledónea perteneciente al clado Astéridas, orden Apiales, familia botánica *Apiaceae*, subfamilia *Apioideae*. En esta familia encontramos alrededor de 250 géneros y 2800 especies, siendo generalmente plantas herbáceas que crecen en climas templados y boreales. Dentro de esta familia podemos encontrar plantas anuales, bienales y perennes. Entre las características comunes a todas las especies de la familia, se distinguen el tipo de inflorescencia, umbela (que deriva del latín *umbella*, cuyo significado es sombrilla), el tipo de fruto, esquizocarpo, y sustancias químicas específicas, mayormente terpenoides volátiles, que le dan a varias partes de las plantas un sabor y aroma característico.

La mayoría de las especies cultivadas de la familia *Apiaceae* son originarias del Mediterráneo y regiones cercanas de Asia. La zanahoria (*Daucus carota* L., var. *sativus* Hoffm.), la especie cultivada más importante de la familia, puede ser separada en dos grupos: las zanahorias del este o asiáticas y las zanahorias del oeste. Las zanahorias del este tienen raíces púrpuras o amarillas, hojas pubescentes y tendencia a la floración temprana. Las zanahorias del oeste tiene raíces naranjas, rojas, amarillas o blancas, hojas menos pubescentes y menor tendencia a la floración prematura. Según Vavilov (1951), el centro de origen de las zanahorias del este sería Asia central, y el de las zanahorias del oeste sería Asia menor (principalmente Turquía). Mackevic (1929) y Heywood (1983) sugirieron que la región del Hindu Kush, en Afganistán, sería el centro primario de diversificación de las zanahorias del este.

1.1.4. El proceso de vernalización

En el ciclo ontogénico de una planta hay marcadas diferencias entre la fase de crecimiento vegetativo y la fase reproductiva que se inicia con la formación de primordios florales. El meristema apical pasa de una pauta de crecimiento indeterminado a una de crecimiento definido que da origen a los componentes florales. En sentido fisiológico se suele entender por floración la inducción y formación de primordios florales (Barcelo *et al.*, 1983).

Diversos factores internos, sobre todo hormonales, y externos, fundamentalmente luz y temperatura, condicionan la inducción floral. Esos condicionamientos externos sobre el desarrollo de la planta son indicativos de un alto grado de adaptación de las distintas especies a su ecotipo merced a la interacción entre distintos receptores-sensores de la planta, los factores del medio, los niveles hormonales y la información genética de la planta (Barcelo *et al.*, 1983). En muchas plantas, especialmente de día largo, la floración puede ser acelerada o inducida por la exposición a bajas temperaturas durante un período de tiempo. Esta es una estrategia reproductiva comúnmente utilizada que permite situar la floración y producción de semillas en un período climático favorable luego del invierno. Este proceso es denominado vernalización.

Una característica notable del proceso de vernalización es que su respuesta requiere de largos períodos de exposición al frío, usualmente semanas. Esto permite a las plantas distinguir entre el pasaje del invierno y la exposición a una inusual noche fría. Otra característica interesante es su naturaleza cuantitativa, ya que a mayor exposición a bajas temperaturas se produce una aceleración del tiempo de floración, aunque llega un punto en el cual la respuesta se satura (Lang, 1965). La naturaleza gradual de este proceso permitiría inferir la acumulación progresiva de un promotor floral o la eliminación de un represor, o ambos procesos a la vez. Además, existe una separación temporal entre la exposición de las plantas al frío y su respuesta en el tiempo de floración, de hecho pueden pasar muchas semanas entre que las plantas vuelven a temperaturas mas elevadas y sucede la floración. Por lo tanto, la percepción de las bajas temperaturas debe ser recordada en las plantas a través de numerosas divisiones mitóticas. (revisado por Henderson *et al.*, 2003)

Una definición útil de la vernalización fue propuesta por Chouard en su revisión de 1960: “es la adquisición, o aceleración, de la habilidad para florecer por un tratamiento de frío” (Chouard, 1960). Por lo tanto, la exposición al frío no causa la floración, sino que vuelve a la planta competente para ello. Una demostración clásica de ésto se puede ver en

el trabajo de Lang y Melchers (revisado por Lang, 1965) con la especie bienal *Hyoscyamus niger* (beleño). Esta planta requiere para florecer de vernalización seguida por fotoperíodos inductivos. Si las plantas vernalizadas de beleño crecen en fotoperíodos no inductivos, continúan en crecimiento vegetativo. Sin embargo, si estas plantas son trasladadas más tarde a fotoperíodos inductivos, florecen. Esto demuestra que las plantas vernalizadas son capaces de “recordar” el tratamiento de frío recibido. Aunque la duración de esta memoria es variable entre distintas especies (Amasino, 2004).

El requerimiento de vernalización puede ser necesario tanto en especies monocárpicas (que florecen, dan semillas y mueren) como en policárpicas (especies perennes que florecen cada año). Las especies monocárpicas que necesitan vernalizarse usualmente nacen en el otoño y florecen en la siguiente primavera; estas plantas monocárpicas que florecen en el segundo período de crecimiento son llamadas bienales o anuales de invierno. El término bienal es utilizado para plantas que tienen un requerimiento de vernalización obligado para florecer, mientras que el término anuales de invierno usualmente es utilizado para aquellas plantas que tienen un requerimiento cuantitativo (Lang, 1965).

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es normalmente clasificada como bienal. Durante el primer año o período de crecimiento produce una roseta de hojas y reservas en su raíz hipertrofiada (Whitaker *et al.*, 1970). Luego de un período de vernalización, con temperaturas entre 0 y 10⁰C, y de días largos se induce la elongación de los entrenudos y la floración (Atherton y Basher, 1984, Dickson y Peterson, 1958; Sark y Thompson, 1942). Las bajas temperaturas solo son efectivas a partir de un cierto grado de desarrollo de la planta llamado umbral de vernalización, que se alcanza en el momento en que la planta tiene entre 8 y 12 hojas y un diámetro de raíz de 4 a 8 mm (Atherton *et al.*, 1990; Galmarini *et al.*, 1992; Galmarini y Della Gaspera, 1996; Lona y Crnko, 1967).

Si bien la floración es siempre consecuencia de la inducción que producen las bajas temperaturas, la intensidad de su expresión depende de la constitución genética de las plantas y de aspectos del manejo que pueden modificarlas indirectamente. Las siembras más tardías (menor exposición a bajas temperaturas) y las mayores densidades (plantas que por la competencia llegan con retraso al umbral de vernalización) reducen la proporción de floración prematura (Warne, 1949).

En una escala global, los cultivares de zanahoria son clasificados en dos grandes grupos: cultivares templados y cultivares subtropicales. Los cultivares templados se

caracterizan por tener menor vigor de plántula, tasa de crecimiento mas lenta y floración tardía. Los cultivares subtropicales, por el contrario, tienen mayor vigor y tasa de crecimiento, y florecen más temprano (Rubatzky *et al*, 1999). Una diferencia importante entre ambos grupos de cultivares son sus requerimientos de vernalización. Los cultivares de floración tardía necesitan de 11 a 12 semanas a 5°C para vernalizarse y luego florecer (Atherton *et al*, 1990; Hiller y Kelly, 1979; Rubatzky *et al*, 1999). Mientras que los cultivares de floración temprana requieren períodos mas cortos de vernalización, de 1 a 4 semanas, y ésto sería consecuencia de su adaptación a inviernos mas suaves (Dias-Tagliacozzo *et al*,1994; Galmarini y Della Gaspera,1996).

Los requerimientos de vernalización influyen en la producción de raíces y semillas de zanahoria. Como consecuencia de la floración prematura, las plantas utilizan las reservas acumuladas en sus raíces (órgano comercial) para alargar el tallo y florecer, por lo tanto sus raíces se lignifican antes de lograr el tamaño comercial, con las consiguientes pérdidas para el agricultor. Es por ello que usualmente los cultivares de floración temprana son sembrados en zonas tropicales o en épocas estivales en las zonas de clima templado, para evitar su floración antes de la cosecha de raíces. Los cultivares de floración tardía, en cambio, se siembran en zonas de clima frío o en zonas de clima templado en siembras de otoño-invierno.

El conocimiento del mecanismo con que operan las bajas temperaturas sobre la inducción floral ha permitido producir semillas de zanahoria en un solo año. En la zona de Cuyo, para la producción de semillas por el método semilla - semilla, los cultivares bienales deben ser sembrados temprano en el verano (enero) para que florezcan en la primavera, mientras que los cultivares anuales pueden ser sembrados en el verano, otoño y temprano en el invierno (de enero a julio) y florecerán en el mismo año (Astorquizaga *et al*, 2004; Galmarini y Della Gaspera, 1996).

En el caso de la producción de semillas por el método semilla – raíz – semilla, utilizado en mejoramiento genético, los cultivares anuales son sembrados en el verano en la región de Cuyo, cosechando y seleccionando sus raíces a finales del otoño y luego plantando las mismas a finales del invierno para cosechar semillas en el verano. Los cultivares bienales, en cambio, son sembrados en otoño-invierno, la cosecha y selección de raíces se realiza en primavera-verano, almacenando las raíces en cámaras de frío hasta el invierno cuando son plantadas, cosechando sus semillas en el verano siguiente. Un ciclo de

selección o mejoramiento se completa en 1 año en el caso de los materiales anuales y en 2 años en el caso de los materiales bienales. (Oliva, 1987)

1.1.5. Estudios genéticos sobre la respuesta a la vernalización

La respuesta a la vernalización y el hábito de floración han sido estudiados desde el punto de vista genético en varias especies bienales. El primer estudio de este tipo se realizó en 1904 en el beleño (*Hyoscyamus niger* L.), una hierba de la familia Solanácea, en el que se determinó que el hábito bienal estaba condicionado por un gen simple dominante (Lang, 1986).

En base a estudios genéticos se determinó que había al menos dos caminos o rutas metabólicas para promover la floración en *Arabidopsis*, y que éstos podían actuar de manera paralela o redundante. Por un lado está la ruta “fotoperiódica”, en la cual actúan genes que pueden ser influidos por el largo del día; y por otro lado la ruta “autónoma” donde actúan genes que inducen o reprimen la floración independientemente de la duración del día (Martinez-Zapater *et al*, 1994; Coupland, 1995). En la ruta “autónoma” se encuentran los genes influenciados por el período de vernalización (Martinez-Zapater *et al*, 1994). Las diferencias en el hábito de floración entre ecotipos de *Arabidopsis sp.* de floración temprana y tardía se debe a las variaciones alélicas de dos loci: *FRIGIDA (FRI)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Clarke y Dean, 1994). Los ecotipos de floración tardía tienen los alelos dominantes *FRI* y *FLC* que suprimen la floración, mientras que los de floración temprana contienen los alelos recesivos *fri* y/o *flc*.

En *Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* (remolacha azucarera) la diferencia entre plantas anuales y bienales está determinada por el locus *B* (“bolting gene”), las remolachas bienales (*bb*) necesitan de largos períodos de frío para florecer, mientras que las remolachas anuales (*BB* o *Bb*) solo requieren fotoperíodos largos (Abe *et al*, 1997).

En *Brassica oleracea* L. la anualidad es claramente dominante, y parece ser controlada por varios factores, mientras que el tipo de herencia del hábito de floración depende de los progenitores utilizados (Bagget y Kean, 1989; Walkof, 1963). Ferreira *et al* (1995) confirmaron que la anualidad es también dominante sobre la bienalidad en cruzamientos realizados en *Brassica napus* L. Antes, Thurling y Vijendra Das (1979) habían hipotetizado que habría dos genes recesivos controlando los requerimientos de vernalización en *B. napus* y que esos genes variaban en distintos cultivares. Más tarde, Van Deynze y Peter Paul (1994), demostraron que en *B. napus* el hábito primaveral era

dominante sobre el invernal y que los requerimientos de vernalización eran controlados por un gen mayor y uno menor, que conferían distintos requerimientos de vernalización según las combinaciones encontradas (gen mayor recesivo, gen menor recesivo o ambos genes recesivos).

En los cereales se han analizado numerosos genes que regulan el tiempo de floración. En base a su interacción con el ambiente, estos genes pueden ser divididos en 3 grupos: genes que responden a la duración del día o fotoperíodo, genes que responden a la vernalización, y genes que confieren “precocidad” independientemente de los factores ambientales (Laurie, 1997). La base genética de los requerimientos de vernalización ha sido estudiada principalmente en la cebada y el trigo. En la cebada (*Hordeum vulgare* L.) fueron encontrados 3 genes (*Vrn-H1*, *Vrn-H2* y *Vrn-H3*) que interactúan controlando la respuesta a la vernalización (Takagashi y Yasuda, 1971). La mayoría de los cultivares son monomórficos para el gen *Vrn-H3*, reduciendo el modelo genético a dos factores (Yasuda *et al.*, 1993). Los alelos presentes en los restantes dos loci han mostrado diversos grados de dominancia e interacción epistática, siendo la constitución alélica para las avenas invernales del tipo *Vrn-H2Vrn-H2/vrn-H1vrn-H1* (Takahashi & Yasuda, 1971).

En el trigo diploide (*Triticum monoccum* L.) existen dos genes, *Vrn-A^m1* y *Vrn-A^m2*, que distinguen a plantas anuales de bienales, o a trigos primaverales de invernales. El alelo *Vrn-A^m1* confiere el hábito primaveral y domina sobre *vrn-A^m1*, mientras que *Vrn-A^m2* determina un hábito invernal y domina sobre *vrn-A^m2*. A su vez existe interacción epistática entre ambos genes: las plantas homocigotas recesivas para el alelo *vrn-A^m2* (hábito primaveral) florecen más temprano independientemente del tipo de alelo presente en *Vrn-A^m1*, mientras que diferencias en el hábito de floración causadas por las variantes alélicas en el locus *Vrn-A^m1* solo se producen si se encuentra el alelo dominante *Vrn-A^m2* (Tranquilli y Dubcobsky, 2000).

En el trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.) el hábito de crecimiento primaveral estaría determinado por tres genes dominantes, la presencia de cualquiera de los tres conferiría el hábito primaveral, aunque uno de ellos tiene un efecto mayor. En los trigos invernales es necesaria la presencia de genes recesivos en los tres loci, aunque la variabilidad encontrada en la respuesta a la vernalización dentro de este grupo permitiría inferir la existencia de múltiples alelos recesivos (Pugsley, 1971).

1.1.6. Estudios moleculares sobre la respuesta a la vernalización

Durante muchos años se ha estudiado desde el punto de vista fisiológico y fenológico el fenómeno de transición del crecimiento vegetativo al crecimiento reproductivo, aunque desde el punto de vista molecular los estudios son muchos más recientes. La floración está determinada por genes que gobiernan la identidad del meristema, promoviendo o reprimiendo el destino reproductivo versus el destino vegetativo. Estos genes a su vez son activados tanto por el estado de desarrollo de la planta como por el ambiente (Van Nocker, 2001).

Por su corto ciclo de vida, su genoma pequeño y bien caracterizado, y su tiempo de floración altamente influenciado por factores ambientales, *Arabidopsis thaliana* ha sido utilizada como planta modelo para los estudios de floración. Las diferencias en el hábito de floración entre ecotipos de *Arabidopsis sp.* de floración temprana y tardía se debe a las variaciones alélicas de dos loci: *FRIGIDA (FRI)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Clarke y Dean, 1994). Los ecotipos de floración tardía tienen los alelos dominantes *FRI* y *FLC* que suprimen la floración, mientras que los de floración temprana contienen los alelos recesivos *fri* y/o *flc*. Según Lee y Amasino (1995), *FRI* y *FLC* actúan de manera sinérgica para retrasar la floración, y su efecto es suprimido por la vernalización. Estudios posteriores (Michaels y Amasino, 1999) determinaron que el gen *FLC* juega un rol central en el control del hábito de floración de la ruta autónoma, y su actividad está negativamente regulada por la vernalización, y positiva y negativamente regulada por otros genes de la ruta (como *FRI* y *LD*). El nivel de *FLC* ARNm (ácido ribonucleico mensajero) es mayor en los ápices vegetativos y en las raíces. En los meristemas florales no se detectaron niveles de *FLC* ARNm, esto indicaría que para la transición a la etapa reproductiva es necesaria una menor expresión del gen *FLC*. Una vez que las plantas de *Arabidopsis* fueron vernalizadas, se dejó de detectar niveles de *FLC* ARNm en los ápices vegetativos, sugiriendo que la menor expresión del gen *FLC* es un componente necesario en la respuesta a la vernalización. El estado de “vernalizado” se mantiene durante largos períodos de tiempo y a través de numerosas divisiones mitóticas, aunque se pierde de generación en generación, luego de divisiones meióticas y la reproducción sexual. (Michaels y Amasino, 1999)

El gen *FLC* es un regulador transcripcional del tipo MADS-box (dominio proteico encontrado en un tipo de regulación transcripcional tanto en plantas como en animales y hongos) que actúa como un potente represor de la floración y que a su vez es reprimido por

la vernalización (Michael y Amasino, 1999). La represión inducida por la vernalización se mantiene estable luego que las plantas retornan a condiciones de crecimiento cálidas permitiendo su floración. La represión epigenética del gen *FLC* daría una explicación molecular de la “memoria del invierno” que se produce en *Arabidopsis*. El mecanismo general que actúa en esta represión involucra modificaciones covalentes de la cromatina del gen *FLC* (Sung y Amasino, 2004). Los distintos tipos de modificaciones de histonas en un locus dado se conoce como “código de histonas” porque cada combinación específica de modificaciones puede crear un estado único de actividad del gen (Turner, 2002). En otoño, la cromatina del gen *FLC* está en una conformación activa, es decir que se encuentra enriquecida con modificaciones, como la acetilación de las lisinas 9 y 14 y la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3, las cuales son marcas de genes activos (Sung y Amasino, 2004). Luego del invierno y completada la vernalización, se reducen los niveles de modificaciones antes citadas y la cromatina del gen *FLC* se enriquece con metilaciones de las lisinas 9 y 27 de la histona 3. Este último tipo de metilaciones son marcas de genes reprimidos, también encontradas en animales (Orlando, 2003).

A través del estudio de mutantes inducidos se encontraron otros genes, en *Arabidopsis*, relacionados con el proceso de vernalización: el gen *VIN3* es inducido por la vernalización y está involucrado en la represión del gen *FLC* a través de la desacetilación de histonas (Sung y Amasino, 2004). El gen *VIN3* solo se expresa luego de varias semanas de exposición al frío, por lo tanto es el encargado de “medir” el frío, evitando entonces una floración prematura luego de pocos días de frío durante el otoño. Una vez que el frío cesa, el gen *VIN3* deja de expresarse (Sung y Amasino, 2004). Otros dos genes, llamados *VRN1* y *VRN2*, son necesarios para mantener al gen *FLC* en su estado reprimido, aunque no actúan en su represión inicial por el frío (Gendall *et al.*, 2001, Levy *et al.*, 2002).

Los ecotipos anuales de *Arabidopsis*, que florecen rápidamente y no responden a la vernalización, han evolucionado en múltiples ocasiones a través de la interrupción de la secuencia regulatoria del gen *FLC* por transposones (Michaels *et al.*, 2003) y a través de deleciones y mutaciones en *FRI*, un regulador positivo de *FLC* (Johanson *et al.*, 2000). Al estudiar las variaciones en el tiempo de floración en poblaciones nativas de *Arabidopsis* en Europa, caracterizadas por la presencia extrema de plantas bienales en el norte y anuales en el sur, Caicedo *et al.* (2004) atribuyeron la variabilidad encontrada a una compleja interacción epistática entre copias funcionales de *FRI* y *FLC*.

En varias especies del género *Brassica* (*B. rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. napus* y *B. juncea*) fueron mapeados, mediante marcadores moleculares, los QTL responsables del tiempo de floración (Camargo y Osborn, 1996; Ferreira *et al.*, 1995; Osborn *et al.*, 1997). Al intentar comparar si las regiones encontradas en cada especie eran las mismas, se encontraron con el obstáculo de que los mapas fueron realizados con diferentes marcadores moleculares, por lo que el completo alineamiento de los mismos era imposible (Osborn y Lukens, 2003). Aún en los casos en los que se utilizaron las mismas sondas en los distintos mapas, la naturaleza replicada (poliploidía) de las *Brassicaceae* dificultaba la interpretación ya que una misma sonda hibridaba en múltiples regiones.

Afortunadamente, las especies del género *Brassica* se encuentran en la misma familia (*Brassicaceae*) que *Arabidopsis thaliana* (n=5), habiendo divergido ambos géneros hace 15-21 millones de años (Koch *et al.*, 2000). Por lo tanto, segmentos de cromosomas ancestrales podrían haberse conservado durante la evolución de estas especies. Los genomas de las *Brassicaceae* contienen grandes segmentos de cromosomas muy similares a la parte superior del cromosoma 5 de *Arabidopsis sp.* (At5), y en esos segmentos han sido localizados varios QTL que influyen en el tiempo de floración (Lagercrantz *et al.*, 1996; Osborn *et al.*, 1997). La parte superior del cromosoma At5 contiene varios genes que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis*: *TFL1*, *FLC*, *TFL2*, *CO*, *FY* y *EMF1* (Koornneef *et al.*, 1998). Los genes *CONSTANS (CO)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)* fueron considerados como los candidatos más probables en la determinación del tiempo de floración en las *Brassicaceae*. El gen *CO* codifica un factor de transcripción putativo y es un regulador de la ruta fotoperiódica, mientras que el gen *FLC* codifica un dominio MADS que contiene un factor de transcripción regulando la ruta autónoma (Osborn y Lukens, 2003).

A través del estudio de poblaciones derivadas del cruzamiento de plantas anuales x bienales en *B. rapa* (Teutonico y Osborn, 1995), *B. napus* (Ferreira *et al.*, 1995) y *B. oleracea* (Lan y Paterson, 2000) se determinó que el gen *FLC*, y no el *CO*, era el candidato para explicar los QTL encontrados. Aunque también fueron encontrados otros QTL, controlando el tiempo de floración, que se alineaban con otras regiones del genoma de *Arabidopsis* fuera del At5. A través de estudios citológicos se conoce que los genomas de las especies de *Brassicaceae* diploides (*B. rapa*, *B. oleracea* y *B. nigra*) se encuentran altamente replicados, y esa replicación está organizada en bloques, consistente con su origen poliploide. La poliploidía daría una buena explicación para la ocurrencia de QTL

segregantes en regiones replicadas del genoma: estos QTL podrían representar variaciones alélicas en loci parálogos. Homólogos del gen *FLC* fueron mapeados en tres cromosomas (R2, R3 y R10) en *B. rapa*, por lo tanto *FLC* podría regular el tiempo de floración a través de múltiples copias (Osborn *et al.*, 1997). Esto es consistente con el modelo de Michaels y Amasino (2000), quienes proponen que el gen *FLC* produce un inhibidor de la floración, siendo el retraso de la floración proporcional al número de copias de alelos de floración tardía. En el caso de las líneas de *Arabidopsis sp.*, que contienen una única copia del gen *FLC*, el número de alelos de floración tardía podría ser cero, uno o dos, que se corresponden con el homocigota de floración temprana (produce 12 hojas antes de florecer), el heterocigota (produce 46 hojas antes de florecer) y el homocigota de floración tardía (89 hojas antes de florecer) (Lee *et al.*, 1994). En las especies de *Brassicacae* existirían muchas más combinaciones potenciales de alelos del gen *FLC* que conferirían distintos tiempos de floración.

En los cereales de invierno existe un gen represor, similar a lo encontrado en *Arabidopsis*, que inhibe la floración durante el otoño (Yan *et al.*, 2004a). Sin embargo, este represor, llamado *VRN-2* en el caso del trigo diploide, es un tipo de proteína con dedos de zinc no encontrado en el genoma de *Arabidopsis* (Yan *et al.*, 2004a). En trigo, el rol del gen *VRN-2* es reprimir la acción del gen *VRN-1* uniéndose a su promotor, mientras que el gen *VNR-1* codifica una proteína MADS-box que promueve la floración (Yan *et al.*, 2003). Este gen *VRN1* es similar al gen *APETALA1* de *Arabidopsis*, pero no tiene relación con el gen *VRN1* de *Arabidopsis* (Yan *et al.*, 2003). Los altos niveles de *VRN-2*-ARNm observados al comienzo del tratamiento de vernalización y los bajos niveles al finalizar el tratamiento confirman su función como represor del gen *VNR-1* (Yan *et al.*, 2004a).

El gen *VRN-1* de *T. monococcum* es dominante para el hábito de crecimiento primaveral, mientras que el gen *VNR-2* es dominante para el hábito invernal, y además existe epistasis entre ambos. El modelo molecular del gen *VNR-2* como represor del *VNR-1* explica este comportamiento, ya que mutaciones en *VNR-2* resultarían en un represor inactivado, aunque una sola copia funcional de *VNR-2* bastaría para reprimir a *VNR-1* y consecuentemente la floración, resultando el hábito invernal dominante (Yan *et al.*, 2004b). Por otro lado, deleciones observadas en la región promotora del gen *VRN-1*, y sitio de reconocimiento para del gen *VNR-2*, serían responsables de la dominancia del hábito primaveral del gen *VNR-1* (Yan *et al.*, 2003).

Los loci relacionados con la vernalización fueron mapeados en varios cereales. Los genes *VRN-Am1* y *VRN-Am2* del trigo diploide fueron localizados en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 5A (Dubcovsky *et al.*, 1998). Luego por mapeo comparativo se determinó la existencia de genes ortólogos al gen *VRN-Am1*: los genes *VRN-A1* y *VRN-D1* del trigo hexaploide, el gen *VRN-H1* de la cebada, el gen *VRN-R1* del centeno (*Secale cereale*) y un QTL relacionado con la vernalización en avena (*Avena sativa*) (Dubcovsky *et al.*, 1998).

Otros estudios realizados, comparando las variantes alélicas que determinan los distintos hábitos de floración del gen *VRN-1* en trigo diploide (Yan *et al.*, 2003), trigo poliploide (Yan *et al.*, 2004b; Fu *et al.*, 2005) y cebada (Fu *et al.*, 2005), revelaron asociaciones entre las deleciones encontradas, tanto en el promotor del gen como en el primer intrón, y el hábito de crecimiento primaveral (Fu *et al.*, 2005).

Los componentes mayores de la respuesta al fotoperíodo aparecen conservados entre *Arabidopsis* y el arroz (Hayama y Coupland, 2004). El gen *FT* (*Flowering locus T*) es un promotor de la floración en respuesta a la duración del día tanto en *Arabidopsis* como en cereales, sin embargo existen genes y factores ambientales distintos actuando en la rutas metabólicas e influyendo sobre *FT* en cada grupo de especies (*Arabidopsis*, arroz y cereales templados) (Greenup *et al.*, 2009).

En la respuesta a la vernalización, al comparar *Arabidopsis* con cereales, no se han encontrado genes homólogos cumpliendo la misma función, lo que indicaría que la respuesta a la vernalización evolucionó luego de que ambos grupos de plantas (dicotiledóneas y monocotiledóneas) se separaran (Amasino, 2004; Greenup *et al.*, 2009; Reeves *et al.*, 2007). Dentro de las dicotiledóneas, Reeves *et al.* (2007) determinaron mediante estudios filogenéticos y moleculares, que existían genes homólogos al gen *FLC* en algunas especies de los tres principales clados (Cariofilidas, Rósidas y Astéridas). Sin embargo, estos genes encontrados presentaban una alta divergencia. Los autores concluyen que la familia de genes *FLC* se originó antes de la diversificación de los tres principales clados de las dicotiledóneas y por lo tanto se encontraría este tipo de genes en todas las especies incluidas en los mismos.

En zanahoria, a pesar de que existen numerosos estudios fisiológicos sobre la respuesta a la vernalización, no se ha estudiado hasta el momento la genética ni los mecanismos moleculares del carácter. En base a lo resultados observados, en los mecanismos genéticos y moleculares que determinan el carácter respuesta a la

vernalización en otras especies vegetales, fueron planteadas las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo en la presente tesis:

1.2. HIPÓTESIS

1) La respuesta a la vernalización en zanahoria está determinada por pocos genes de acción simple.

2) Un gen simple de acción dominante codifica la respuesta a la vernalización en zanahorias de diversos orígenes geográficos.

3) Las regiones cromosómicas que codifican para el carácter requerimientos de vernalización en zanahoria tienen secuencias similares al gen *FLC* ya encontrado en otras especies dicotiledóneas.

4) Es posible localizar una región cromosómica ligada al carácter requerimiento de vernalización en zanahoria.

1.3. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la base genética e identificar los genes y/o regiones cromosómicas involucradas en los requerimientos de vernalización en la zanahoria.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Determinar si la respuesta a la vernalización es un carácter de herencia cuantitativa o cualitativa.
- 2) Determinar el número de genes involucrados.
- 3) Determinar el tipo de acción génica: dominancia completa o incompleta, epistasia.
- 4) Estudiar la respuesta a la vernalización en zanahorias anuales y bienales de diversos orígenes geográficos y sus cruzamientos.
- 5) Establecer si en el genoma de la zanahoria se encuentra conservada la secuencia del gen *FLC* que codifican para la respuesta a la vernalización en otras especies dicotiledóneas.
- 6) Determinar si esas secuencias encontradas se relacionan con los requerimientos de vernalización en zanahoria.
- 7) Localizar en el genoma de la zanahoria la región cromosómica que determina los requerimientos de vernalización.

Las 4 hipótesis planteadas se desarrollan en 4 capítulos. El capítulo 2 se refiere a la genética del carácter respuesta a la vernalización en zanahoria a través del estudio de poblaciones segregantes. En el capítulo 3 se estudia la respuesta a la vernalización en zanahorias de diversos orígenes geográficos y sus cruzamientos. En el capítulo 4 se evalúa si las secuencias de ADN que determinan la respuesta a la vernalización en otras especies vegetales, se encuentran relacionadas con el carácter de interés en zanahoria. Finalmente, en el capítulo 5 se estudia la localización de la región cromosómica que codifica para la respuesta a la vernalización en un mapa de ligamiento.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- ABE, J., G. P. GUAN y Y. SHIMAMOTO. 1997. A gene complex for annual habit in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* 94: 129-135.
- ALASALVAR, C., J.M. GRIGOR, D. ZHANG, P.C. QUANTICK y F. SHAHIDI. 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J Agri Food Chem* 49:1410–1416.
- AMASINO, R. M. 2004. Vernalization, competence and the epigenetic memory of winter. *The Plant Cell*, 16, 2553–2559.
- ASTORQUIZAGA; R.; M. S. ALESSANDRO y C. R. GALMARINI. 2004. Efecto de la fecha de siembra en la producción de semillas de zanahoria en el Valle de Uco. *Horticultura Argentina*, Vol. 23, Nro. 54: 69.
- ATHERTON, J. G. y E. A. BASHER. 1984. The effects of photoperiod on flowering in carrot. *J. Hort. Sci.*, 59 (2): 213 – 215.
- ATHERTON, J. G., J. CRAIGON y E. A. BASHER. 1990. Flowering and bolting in carrot. I. Juvenility, cardinal temperatures and thermal times for vernalization. *J. Hort. Sci.*, 65 (4): 423 – 429.
- BAGGET, J. R. y D. KEAN. 1989. Inheritance of annual flowering in *Brassica oleracea*. *HortScience* 24:662-664.
- CAICEDO, A. L., J. R. STINCHCOMBE, K. M. OLSEN, J. SCHMITT y M. D. PURUGGANAN. 2004. Epistatic interaction between Arabidopsis FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15670–15675.
- CAMARGO, L.E.A. y T.C. OSBORN. 1996. Mapping loci controlling flowering time in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 92:610-616.
- CHOUARD, P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11, 191–238.
- CLARKE, J.H. y C. DEAN. 1994. Mapping FRI, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* 242, 81-89.
- COUPLAND, G. 1995. Genetic and environmental control of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 20:785-789.
- DIAS TAGLIACOZZO, G.M. y I.F.M. VALIO. 1994. Effect of vernalization on flowering of *Daucus carota* (Cvs Nantes and Brasilia). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6 (1): 71-73.
- DICKSON, M.H. y C.E. PETERSON. 1958. Hastening greenhouse seed production for carrot breeding. *Proc Am Soc Hort Sci*, 71, 412-5.
- DUBCOVSKY, J., D. LIJAVETZKY, L. APPENDINO y G. TRANQUILLI. 1998. Comparative RFLP mapping of Triticum monococcum genes controlling vernalization requirement. *Theor Appl Genet*, 97:968-975.
- FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Consulta realizada el 6/4/09.
- FERREIRA, M.E., J. SATAGOPAN, B.S. YANDELL, P.H. WILLIAMS y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 90:727-732

- FU D., P. SZIICS, L. YAN, M. HELHUERA, J.S. SKINNER, J.V. ZITZEWITZ, P.M. HAYES y J. DUBCOVSKY. 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Gen Genomics* (2005) 273: 54–65.
- GALMARINI, C.R., R. BORGO y R. TIZIO. 1992. Determination of a Pre-Vernalization Phase in Carrot (*Daucus carota* L.) cv. Flakkee. Turrialba: Vol. 42, Num. 2, pp. 140-142, Trimestre Abril-Junio 1992.
- GALMARINI, C. R. y P. DELLA GASPERA. 1996. Determinación de requerimientos de pre-vernalización en zanahorias (*Daucus carota* L.) anuales. Actas de la XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, pp. 82. Mendoza. Marzo 1996.
- GENDALL, A. R., Y. Y. LEVY, A. WILSON y C. DEAN. 2001. The Vernalization 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell*, 107:525-535.
- GREENUP, A., W. J. PEACOCK, E. S. DENNIS Y B. TREVASKIS. 2009. The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Annals of Botany* 103:1165-1172.
- HAYAMA, R. y G. COUPLAND. 2004. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 135: 677-684.
- HENDERSON, I.R., C. SHINDO Y C. DEAN. 2003. The need for winter in the switch to flowering. *Annu. Rev. Genet.* 37:371-392.
- HEYWOOD, V.H. 1983. Relationship and evolution in the *Daucus carota* complex. *Israel Journal of Botany* 32:51-65.
- HILLER, L.K y W.C. KELLY. 1979. The effect of post-vernalization temperature on seedstalk elongation and flowering in carrots. *J Am Soc Hort Sci* 104 (2): 253 - 257.
- JOHANSON, U., J. WEST, C. LISTER, S. MICHAELS y R. AMASINO. 2000. Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290:344–347.
- KOCH, M.A., B. HAUBOLD, T. MITCHELL-OLDS. 2000. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis* and related genera (*Brassicaceae*). *Mol Biol Evol* 17:1483-1498.
- KOORNNEEF, M., C. ALONSO-BLANCO, A.J.M. PEETERS y W. SOPPE. 1998. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49:345-370.
- LAGERCRANTZ, U., J. PUTTERILL, G. COUPLAND y D. LYDIATE. 1996. Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time. *Plant J.* 9:13-20.
- LAN, T.H. y A.H. PATERSON. 2000. Comparative mapping of quantitative trait loci sculpting the curd of *Brassica oleracea*. *Genetics* 155:1927-1954.
- LANG, A. 1965. Physiology of flowering. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 3:265-306.
- LANG, A. 1986. *Hyoscyamus Níger*. En: *CRC Handbook of Flowering*, Ed. Halevy, AH. Boca Ratón, FL. P.: 144-186.

- LAURIE, D. A. 1997. Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* 35:167-177.
- LEE I., S.D. MICHAELS, A.S. MASSHARDT, R.M. y AMASINO. 1994. The late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and *LUMINIDEPENDENS* is suppressed in the Landsberg *erecta* strain of *Arabidopsis*. *Plant J* 6:903-909.
- LEE, I. y R. M. AMASINO. 1995. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the *FRIGIDA* gene. *Plant Physiol.* 108, 157-162.
- LEVY, Y. Y., S. MESNAGE, J. S. MYLNE, A. R. GENDALL y C. DEAN. 2002. Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* 297:243-246.
- LONA, J. L. y J. CRNKO. 1967. Floración prematura en zanahoria en las condiciones de La Consulta en relación a la producción de semillas. Mimeografiado, EEA La Consulta INTA. Mendoza. Argentina.
- MACKEVIC, V.I. 1929. The carrot of Afghanistan. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* 20: 517-562.
- MARTINEZ-ZAPATER, J. M., G. COUPLAND, C. DEAN y M. KOORNNEEF. 1994. The transition to flowering in *Arabidopsis*. En: *Arabidopsis*, E. M. Meyerowitz y C. R. Somerville (eds.). Cold spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- MICHAELS, S. D. y R. M. AMASINO. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11:949-956.
- MICHAELS, S.D., Y.HE, K. C. SCORTECCI y R. M. AMASINO. 2003. Attenuation of *FLOWERING LOCUS C* activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10102–10107.
- OLIVA, R. 1987. Manual de producción de Semillas Hortícolas. Zanahoria. Publicación de la Asociación Cooperadora de la EEA La Consulta INTA, Mendoza, Argentina. 41 p.
- ORLANDO, V. 2003. Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell*, 112:599-606.
- OSBORN, T.C., C. KOLE, I.A.P. PARKIN, A.G. SHARPE, M. KUIPER, D. J. LYDIATE y M. TRICK. 1997. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146:1123-1129
- OSBORN, T. C y L. LUKENS. 2003. The molecular genetic basis of flowering time variation in *Brassica* species. En: Nagata T, Tabata S, eds. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 52: Brassicas and legumes. Berlin: Springer-Verlag, 69–86.
- PUGSLEY, A.T. 1971. A genetic analysis of the spring-winter habit in wheat. *Austr J Agric Res* 22:21-31.
- REEVES, P. A.; Y. HE; R. J. SCHMITZ; R. M. AMASINO; L. W. PANELLA y C. M. RICHARDS. 2007. Evolutionary conservation of the *FLOWERING LOCUS C*-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* 176:295-307.

- RUBATZKY, V. E., C. F. QUIROS, y P. W. SIMON, 1999. Carrots and related vegetable umbelliferae. Crop production science in horticultural series; 10. CABI Publ., Nueva York.
- SAKR, E.S y H.C. THOMPSON. 1942. Effect of temperature and photoperiod on seedstalk development in carrots. Proc Am Soc Hort Sci 41: 343 - 346.
- SHELDON, C.C., J.E. BURN, P.P. PEREZ, J. METZGER, J.A. EDWARDS, W.J. PEACOCK y E.S. DENNIS: The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. Plant Cell 1999, 11:445-458.
- SIMON, P. W. y WOLFF, X.Y. 1987. Carotene in typical and dark orange carrots. J Agric Food Chem 35: 1017-1022.
- SIMON, P.W. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. Plant Breed Rev 19:157-190.
- SUNG y AMASINO. 2004. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. Nature 427, 159-164
- TAKAHASHI, R. y S. YASUDA. 1971. Genetics of earliness and growth habit in barley. En Nilan RA(ed) Proceedings Proc 2nd International Barley Genetics Symposium, pp. 388-408. Washington State University Press.
- TEUTONICO R.A. y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement in *Brassica rapa*. Theor Appl Genet 91:1279-1283
- TRANQUILLI, G. Y J. DUBCOVSKY. 2000. Epistatic interaction between vernalization genes Vrn-Am1 and Vrn-Am2 in *Triticum monococcum*. J. Hered., 91:304-306.
- THURLING, N. y L. D. VIJENDRA DAS. 1979. Genetic control of the preanthesis development of spring rape (*Brassica napus*). I. Diallel análisis of variation in the field. Aust. J. Agric. Res. 30:251-259.
- VAN DEN BERG H., R. FAULKS, H.F. GRANADO, J. HIRSCHBERG, B. OLMEDILLA, G. SANDMANN, S. SOUTHON, W. STAHL. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. J Sci Food Agri 80:880-912.
- VAN DEYNZE, A. y K. PETER PAUL. 1994. The inheritance of seed colour and vernalization requeriment in *Brassica napus* using double haploid populations. Euphytica 74: 77-83.
- VAN NOCKER, S. 2001. The molecular biology of flowering. Horticulture Reviews, Vol. 27. Ed. Jules Janick.
- VAVILOV, N.I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Chron. Botany 13: 1-336.
- WARNE, L. G. 1949. Spacing and bolting of vegetables. Nature, 164: 969 - 970.
- WHITAKER, T. W., A. F. SHERF, W. H. LANGE, C. W. NICKLOW y J. D. RADEWALD. 1970. Carrot Production in the United States. Agriculture Handbook No. 375, Agricultural Research Service, U.S.D.A., Washington D. C.
- YAN L., A. LOUKOIANOV, G. TRANQUILLI, M. HELGUERA, T. FAHIMA y J. DUBCOVSKY. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization VRN1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 6263-6268.

- YAN L., A. LOUKOIANOV, A. BLENCHL, G. TRANQUILI, W. RAMAKRISHNA, P. SANMIGUEL, J.L. BENNETZEN, V. ECHENIQUE y J. DUBCOVSKY. 2004a. The Wheat VRN2 Gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, vol. 303: 1640-1644.
- YAN L., M. HELGUERA, S. FUKUYAMA, J. SHERMAN y J. DUBCOVSKY. 2004b. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet* 109: 1677-1686
- YASUDA S., J. HAYASHI y I. MORIYA. 1993. Genetic constitution for spring growth habit and some other characters in barley cultivars in the Mediterranean coastal regions. *Euphytica* 70:77-83

CAPÍTULO 2¹

BASE GENÉTICA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA.

¹ Parte de este capítulo fue publicado en: Alessandro, M. S. y C. R. Galmarini. 2007. Inheritance of Vernalization Requirement in Carrot. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132(4): 525-529. ISSN 0003-1062.

2.1. INTRODUCCIÓN

En casi todas las especies vegetales conocidas como bienales, es usual encontrar plantas anuales o de floración temprana. Entre estas especies se incluyen a la zanahoria, la remolacha, el repollo, el nabo, entre otras. La ocurrencia de plantas de floración prematura en un cultivo conlleva considerables pérdidas económicas para el agricultor.

La zanahoria es una planta bienal de estación fría con un crecimiento óptimo entre los 15⁰C y los 25⁰C de temperatura. Durante el primer año, o período de crecimiento, produce una roseta de hojas y acumula reservas en su raíz hipertrofiada (Whitaker *et al.*, 1970). La etapa de crecimiento en la cual la planta de zanahoria no es receptiva a las bajas temperaturas es conocida como “período juvenil”. Esta etapa dura hasta que la planta tiene entre 8 y 12 hojas, y el diámetro de su raíz está entre 4 y 8 mm (Atherton *et al.*, 1990; Galmarini *et al.*, 1992; Galmarini y Della Gaspera, 1996; Lona y Crnko, 1967). Luego de un período de vernalización, con temperaturas entre 0 y 10°C, y de días largos, se induce el alargamiento del tallo floral y posteriormente la floración (Atherton y Basher, 1984; Dickson y Peterson, 1958; Sakr y Thompson, 1942). A nivel comercial, la zanahoria es cosechada durante su período vegetativo. Luego de la vernalización las raíces de zanahoria se lignifican, inclusive antes de que se produzca el alargamiento del tallo floral, por lo tanto el comienzo de la floración resulta en una pérdida completa del valor comercial del cultivo (Rubatzky *et al.*, 1999). Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la selección en contra de la floración prematura es una de los principales objetivos de mejora (Simon, 2000).

La respuesta a la vernalización es cultivar-dependiente. Los cultivares bienales, o de floración tardía, requieren entre 11 y 12 semanas a 5°C para vernalizarse (Atherton *et al.*, 1990; Hiller y Kelly, 1979; Rubatzky *et al.*, 1999). Mientras que los cultivares anuales, como lo mostró Dias-Tagliacozzo *et al.* (1994) y lo sugirieron Galmarini y Della Gaspera (1996), necesitan de períodos más cortos de vernalización (entre 1 y 4 semanas). El cultivar “Criolla INTA” puede ser clasificado como anual o de floración temprana. Galmarini y Della Gaspera (1996) informaron que este cultivar tiene el mismo período juvenil que un cultivar del tipo “Flakkee” (bienal), indicando que su anualidad se debería a un menor requerimiento de horas de frío luego de cumplido su período juvenil.

En La Consulta, Mendoza, Argentina, el ciclo reproductivo de la zanahoria define diferentes fechas de siembra ya sea para la producción de raíces como para la producción de semillas (Oliva, 1987). Para producir semillas, los cultivares bienales deben ser

sembrados temprano en el verano (enero) para que florezcan en la primavera, mientras que los cultivares anuales pueden ser sembrados en el verano, otoño y temprano en el invierno (de enero a julio) y florecerán en el mismo año (Astorquiza *et al*, 2004; Galmarini y Della Gaspera, 1996).

La mayoría de las zanahorias cultivadas son bienales y, por lo tanto, el mayor esfuerzo en mejoramiento genético (alto contenido de sólidos totales, altos contenidos de carotenos, resistencia a enfermedades, etc) se desarrolló en este tipo de cultivares. Sin embargo, la expansión del cultivo de zanahoria requiere de cultivares adaptados a zonas de clima más cálido. El conocimiento de las bases genéticas que determinan los requerimientos de vernalización permitiría la rápida obtención de cultivares anuales con las características deseables de los materiales bienales.

El carácter respuesta a la vernalización ha sido estudiado, desde el punto de vista genético y molecular, en numerosas especies como: *Arabidopsis sp.* (Sheldon *et al.*, 2000), en especies del género *Brassica* como *B. napus*, *B. rapa*, y *B. oleracea* (Camargo y Osborn, 1996; Ferreira *et al.*, 1995; Teutonico y Osborn, 1995), en *Beta vulgaris* L. (Abe *et al*, 1997; Reeves *et al*, 2007), en *Triticum sp.* (Yan *et al.*, 2004) y otros cereales.

En la mayoría de los casos se encontró que la respuesta a la vernalización estaba determinada por genes simples y muchos fueron localizados en el genoma y secuenciados.

Existen numerosos estudios sobre la fisiología de la respuesta a la vernalización en zanahoria (e.g. Atherton *et al*, 1990), sin embargo no existen estudios genéticos sobre este carácter.

Hipótesis: la respuesta a la vernalización en zanahoria está determinada por pocos genes de acción simple.

Se plantea como **objetivo general** obtener las poblaciones segregantes y estudiar la heredabilidad del requerimiento de vernalización a través de la siembra de los individuos en diferentes épocas del año.

Objetivos específicos:

1. Determinar si la respuesta a la vernalización es un carácter de herencia cuantitativa o cualitativa.
2. Determinar el número de genes involucrados.

3. Determinar el tipo de acción génica: dominancia completa o incompleta, epistasis.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal:

Se estudiaron familias segregantes (F_2 , F_3 , RC_1 y RC_2) obtenidas a partir de padres con comportamientos disímiles frente a la vernalización. Para lograr ésto fueron utilizados 2 líneas, androestériles del tipo petaloide (Morelock *et al.*, 1996), bienales como madres (B_1 y B_2) y 4 plantas, dadoras de polen, del cultivar Criolla INTA como anuales (A_1 , A_2 , A_3 y A_4). Para asegurar la sincronidad en el período de floración, las plantas bienales fueron sembradas a campo a principios de enero, mientras que las plantas anuales fueron sembradas a fines de abril. Cada planta bienal fue aislada con una anual mediante la utilización de jaulas de aislamiento y moscas para la polinización (figura 2.1.).



Figura 2.1. Jaulas de aislamiento.

Se obtuvieron 4 F_1 ($B_1 \times A_1$, $B_2 \times A_2$, $B_2 \times A_3$ y $B_2 \times A_4$) que fueron evaluadas junto con sus progenitores en un primer año de ensayos. De los 4 cruzamientos obtenidos, uno ($B_2 \times A_2$) presentó plantas fértiles y plantas estériles en su descendencia, mientras que los restantes cruzamientos presentaron la totalidad de las plantas estériles. Esto se debe a la

presencia de genes restauradores de la fertilidad en segregación en la cultivar Criolla INTA (Wolyn and Chahal 1998).

Las plantas fértiles F_1 obtenidas (con producción de polen gracias a la presencia de los genes restauradores en su genoma) fueron autofecundadas y las plantas estériles (sin producción de polen) fueron retrocruzadas con su progenitor anual, obteniéndose así familias F_2 y RC_1 , respectivamente. Los progenitores, las F_1 , las F_2 y las Retrocruzas fueron evaluadas a campo en un segundo año de ensayos.

Luego, a partir de plantas individuales fértiles de cada F_2 , se obtuvieron por autofecundación familias F_3 que fueron evaluadas en un tercer año de ensayos. Además, se obtuvieron familias RC_2 a partir de la retrocruza del padre anual con la RC_1 . Para una mayor comprensión se presenta, en la figura 2.2., un esquema de los cruzamientos realizados y las familias segregantes obtenidas.

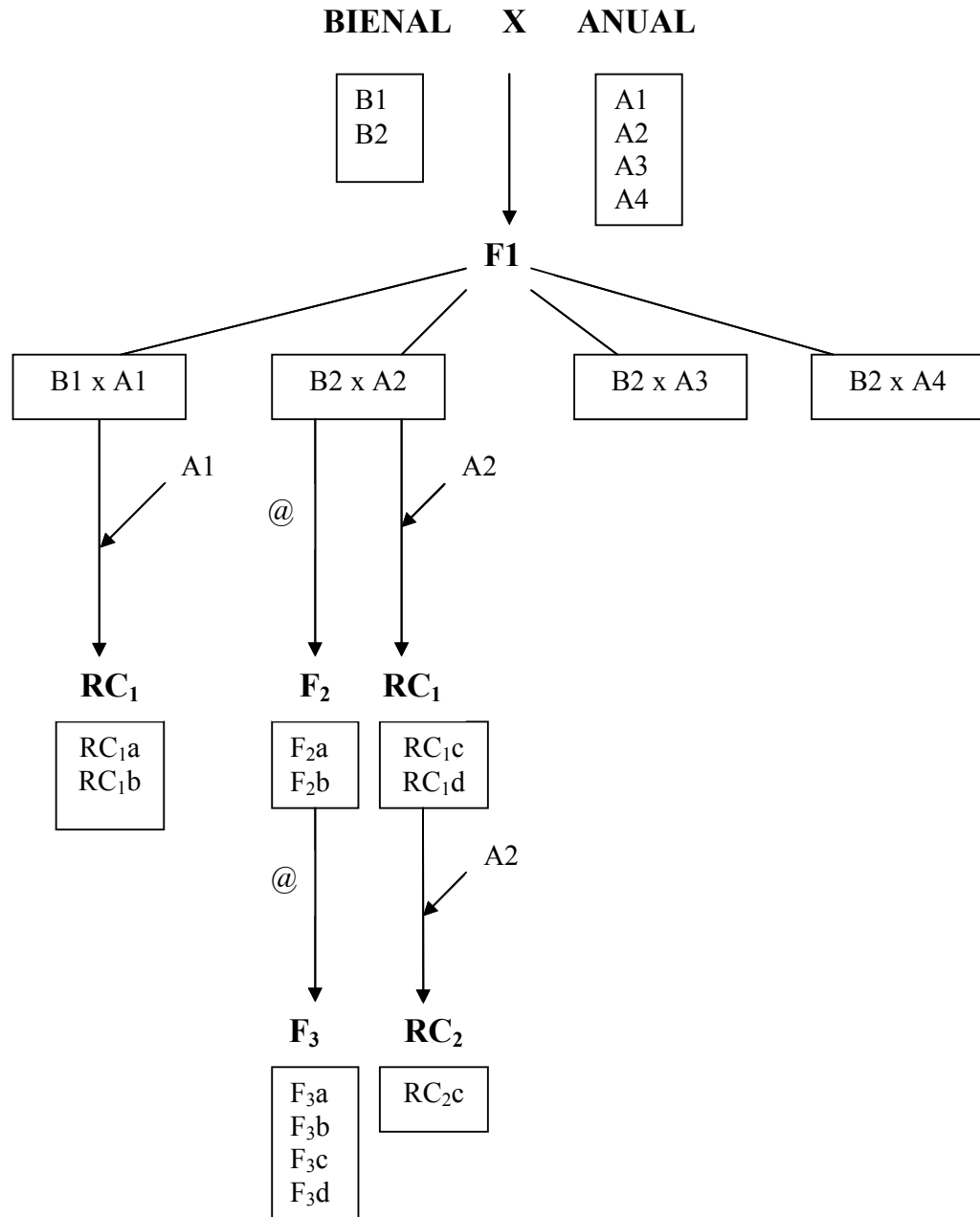


Figura 2.2. Esquema de cruzamientos y familias segregantes obtenidas y evaluadas en los tres años de ensayo.

2.2.2. Metodología:

2.2.2.1. Evaluación a campo primer año: se evaluaron los progenitores y las F₁ en 3 épocas de siembra (3 de marzo, 20 de abril y 6 de junio de 2004). Las siembras escalonadas permitieron que los genotipos recibieran distintas cantidades de horas de frío (tabla I.1.2, anexo I). Los materiales fueron sembrados por siembra directa en el campo experimental de la EEA La Consulta INTA (lat. 33°42'S, long. 69°04'O). En cada fecha se utilizó un diseño en bloques al azar con 3 repeticiones, cada parcela tenía en promedio 20 plantas sembradas en filas distanciadas a 80 cm, y la distancia entre plantas fue de 25 cm. Los datos tomados fueron: porcentaje de plantas florecidas en cada población, días desde la siembra hasta el entallamiento del 50 % de cada población, días a entallamiento del 100 % de la población, días desde la siembra hasta la aparición de primordios en el 50 % y 100 % de la población, días a floración en el 50 y 100% de la población. Para obtener los datos se realizaron recorridas semanales a partir de septiembre hasta diciembre. Una planta fue considerada entallada cuando se veía a simple vista el primer entrenudo de su tallo floral elongado (figura 2.3.A); el dato sobre aparición de primordios se tomó cuando en la planta se observaba a simple vista el primordio de la umbela primaria desarrollado (figura 2.3.B); la planta fue considerada en floración cuando su primer umbela se encontraba abierta (figura 2.3.C). Los tiempos a entallamiento, aparición de primordios y floración de los distintos tratamientos se sometieron a análisis de variancia y la significancia de diferencias entre medias se establecieron usando la prueba de Duncan.



Figura 2.3. Etapas fenológicas de plantas de zanahoria en floración: A- primer entrenudo del tallo floral elongado; B- primordio de la umbela primaria desarrollado; C- planta con umbela primaria en floración.

2.2.2.2. Evaluación a campo segundo año: se evaluaron los progenitores, F_1 , F_2 y Retrocruzas en 2 épocas de siembra (mayo y junio). Los datos climáticos de 2005 se encuentran en las tablas I.2.1 y I.2.2 del anexo I. A partir del cruzamiento de la línea bienal B2 con la planta A2 del cultivar Criolla INTA (anual) se obtuvieron dos familias F_2 (F_{2a} y F_{2b}) y 2 retrocruzas con el padre anual (RC1c y RC1d). A partir del cruzamiento de la línea bienal B1 con la planta A1 del cultivar Criolla INTA se obtuvieron 2 retrocruzas con el padre anual (RC1a y RC1b) (figura 2.2.). Las familias segregantes fueron sembradas a campo, junto con sus progenitores y F_1 , el 4 de mayo de 2005 en la EEA La Consulta INTA (lat. 33°42'S, long. 69°04'O). Fueron evaluadas 280 plantas correspondientes a la familia F_{2a} , 203 plantas de la F_{2b} , 61 plantas de RC1a, 66 plantas de RC1b, 200 plantas de RC1c y 51 plantas de RC1d. Se realizó una segunda siembra el 14 de junio de 2005, evaluándose 61 plantas de la familia F_{2a} , 51 plantas de la F_{2b} y sus respectivos progenitores y F_1 . En ambos ensayos cada planta de cada población segregante (F_2 y RC) fue evaluada individualmente, determinándose si entallaba o no, y las semanas desde la siembra al entallamiento. Para ello se realizaron recorridas semanales de septiembre a diciembre. Una planta era considerada florecida cuando el primer nudo del tallo floral era visible (figura 2.3.A). Con todos los datos se determinó a que tipo de modelo genético se ajustaban las poblaciones evaluadas con respecto al carácter requerimiento de vernalización. Luego se realizó una prueba de

chi-cuadrado para establecer la bondad de ajuste entre valores observados y esperados de segregación.

2.2.2.3. Evaluación a campo tercer año: se evaluaron algunos progenitores, F_1 , F_2 , F_3 y Retrocruzas con el padre anual (2do ciclo) en una época de siembra. Los datos climáticos de 2006 se encuentran en las tablas I.3.1 y I.3.2 del anexo I. Fueron sembrados los progenitores A2 y B2, la F_1 B2xA2 y las familias F_{2a} y F_{2b} . Además, fueron evaluadas 4 familias F_3 , obtenidas a partir de la autofecundación de 4 plantas individuales de floración temprana de las familias F_{2a} y F_{2b} sembradas en la campaña anterior. El segundo ciclo de retrocruza se obtuvo a partir del cruzamiento de una planta de la familia RC_{1c} con el padre A2, esta nueva familia fue denominada RC_{2c} (figura 2.2.). Las poblaciones y sus progenitores fueron sembrados a campo en la Estación Experimental La Consulta el 8 de mayo de 2006 y a partir de septiembre del mismo año se realizaron monitoreos semanales para evaluar porcentaje de plantas entalladas y semanas al entallamiento floral. Una planta era considerada entallada cuando el primer nudo del tallo floral era visible (figura 2.3.A). Fueron evaluadas 297 plantas correspondientes a la familia F_{2a} , 154 plantas de la F_{2b} , 60 plantas de RC_{2c} , 133 plantas de F_{3a} , 42 plantas de F_{3b} , 115 plantas de F_{3c} y 149 plantas de F_{3d} . Con los porcentajes de plantas florecidas en cada familia se realizó una prueba de chi-cuadrado para establecer la bondad de ajuste entre valores observados y esperados de segregación. Antes del entallamiento, el 21 de septiembre, se midió en 8 plantas por genotipo el peso de planta, el largo de raíz y de hojas, y el número de hojas. Las ocho plantas por genotipo fueron separadas en parte aérea y raíces, el conjunto de las partes aéreas y de las raíces fue pesado por separado y se estimó en cada material la relación parte aérea / raíz. Estas mediciones fueron realizadas en los materiales Criolla INTA, A2, B1, B2, B1 x A1, B2 x A2, B2 x A3, F_{2a} y F_{2b} . Con los datos obtenidos, a excepción de la relación parte aérea / raíz, se realizó análisis de varianza y diferencia de medias con la prueba de Duncan.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Primer Año

En las tres fechas de siembra los padres anuales y las F_1 florecieron, mientras que solo en la fecha mas temprana (3/3) una de las madres bienales floreció en un 70 % y con

diferencias significativas en su ciclo con respecto a los restantes materiales. En las restantes fechas las madres bienales no florecieron. (Figura 2.4.).

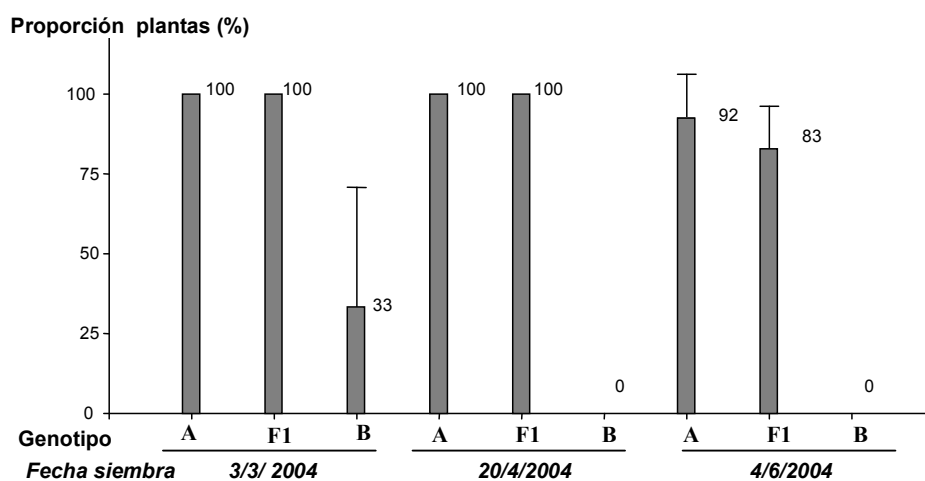


Figura 2.4. Proporción de plantas de zanahoria florecidas en 3 fechas de siembra para los progenitores anuales (A), los progenitores bienales (B) y sus cruzamientos (F1). Para cada categoría se presentan la media y el desvío estándar.

En cuanto a los días a entallamiento, primordios y floración se encontraron diferencias significativas debido al factor genotipo en las 6 variables evaluadas (50 y 100 % de entallamiento, 50 y 100 % de primordios y 50 y 100 % de floración) en la primer fecha de siembra (anexo II, tablas II.1.1, II.1.3, II.1.5, II.1.7, II.1.9 y II.1.11). En la segunda fecha de siembra el factor genotipo influyó significativamente en los días al 100 % de entallamiento, 100 % de primordios y 100 % de floración (anexo II, tablas II.2.3, II.2.7 y II.2.11). En la tercer fecha de siembra solo fueron consideradas las variables días a 50 % de plantas entalladas, con primordios y en floración, ya que solo 2 genotipos (A1 y A3) alcanzaron el 100 % de plantas florecidas. De las 3 variables analizadas los días a 50 % de primordios y 50 % de floración estuvieron significativamente influenciadas por el factor genotipo (anexo II, tablas II.3.3 y II.3.5).

Cuando se compararon las medias por genotipo para las variables de ciclo, se observó una clara diferenciación entre progenitores bienales respecto a los progenitores anuales y las F1. A pesar de que hubo diferencias significativas entre las medias de padres anuales e híbridos, no hubo una marcada separación entre ambos grupos en ninguna fecha de siembra (anexo II). A modo de resumen se elaboró un gráfico con los valores promedio, de

los tres grupos (progenitores anuales, progenitores bienales e híbridos), para las 6 variables de ciclo evaluadas en cada fecha de siembra (figura 2.5).

El comienzo del ciclo reproductivo (50 % de entallamiento) en progenitores anuales e híbridos se fue atrasando cuando la fecha de siembra fue más tardía, pasando del 1 de octubre (en promedio) en la primer fecha de siembra, al 19 de octubre para la segunda fecha de siembra y al 3 de noviembre para la tercer fecha de siembra. Sin embargo, este atraso fue menor que la diferencia de días entre las siembras, por lo tanto el ciclo desde la siembra hasta el entallamiento se vio acortado a medida que la fecha de siembra fue mas tardía, y ésto se ve reflejado en el figura 2.5.

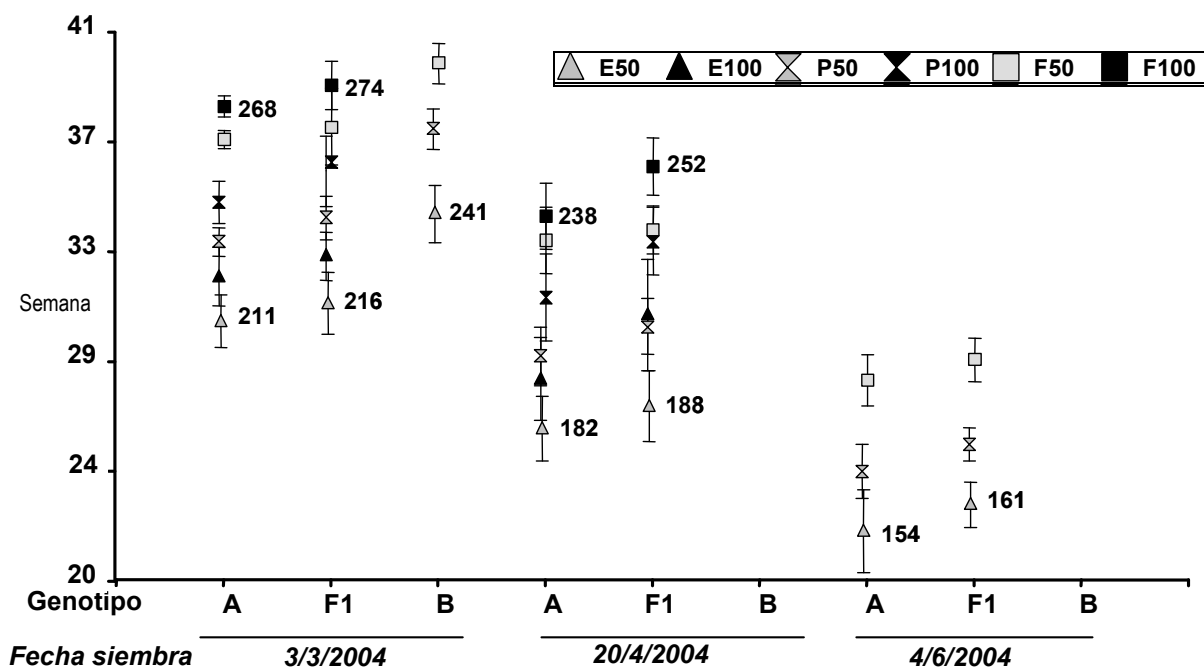


Figura 2.5. Evolución de la floración de plantas de zanahoria sembradas en 3 fechas. En cada fecha de siembra están representadas las semanas desde la siembra hasta el 50 % de plantas entalladas (E50), 100 % de plantas entalladas (E100), 50 % de plantas con primordios florales (P50), 100 % de primordios florales (P100), 50 % de plantas florecidas (F50) y 100 % de plantas florecidas (F100), para el grupo de padres anuales (A), de padres bienales (B) y sus cruzamientos (F1). Para cada categoría se presentan las medias y los desvíos estándar. Además, se presentan los días promedio desde la siembra hasta E50 y F100.

2.3.2. Segundo Año

Los porcentajes de plantas florecidas en las poblaciones segregantes (F₂ y RC) para la primer fecha de siembra (4/5/05) están presentados en la tabla 2.1., junto con los valores de chi-cuadrado (χ^2). En cuanto a los progenitores, los padres anuales (A1 y A2) florecieron en un 100%, mientras que las madres bienales florecieron en un 0% (B1) y en un 12% (B2). En las familias F1, se observó un 100 % de floración para B1 x A1 y un 88 % de floración para B2 x A2. En las figuras 2.6., 2.7. y 2.8. se puede observar el estado fenológico de progenitores y familias segregantes (siembra 4/5/05) en noviembre de 2005.

Tabla 2.1. Valores observados y esperados para la relación anuales: bienales en las poblaciones segregantes de zanahoria bajo la hipótesis de un gen dominante simple que determina la anualidad, valores de chi-cuadrado (χ^2), y probabilidades (P). Siembra del 4/5/05.

Generación	Pedigree	Valores Observados		Valores Esperados	χ^2	P
		Anuales	Bienales			
F _{2a}	B2 x A2	206 (73%)	76 (27%)	3:1 (211,5:70,5)	0,572	0,50
F _{2b}	B2 x A2	155 (76,4%)	48 (23,5%)	3:1 (152,2:50,7)	0,198	0,75
RC _{1c}	(B2 x A2) x A2	194 (96,5%)	6 (3,5%)	1:0 (201:0)	0,24	0,75
RC _{1d}	(B2 x A2) x A2	50 (98,1%)	1 (1,9%)	1:0 (51:0)	0,019	0,90
RC _{1a}	(B1 x A1) x A1	60 (98,3%)	1 (1,7%)	1:0 (61:0)	0,0163	0,90
RC _{1b}	(B1 x A1) x A1	62 (93,9%)	4 (6,1%)	1:0 (66:0)	0,24	0,75



Figura 2.6. Familia F_{2b}, madre bienal B2 y padre anual A2 (de izquierda a derecha), sembrados el 4/5/05. Fotografía sacada el 10/11/05.



Figura 2.7. Familia F_{2a} y madre bienal B2 (de izquierda a derecha), sembradas el 4/5/05. Fotografía sacada el 10/11/05.



Figura 2.8. Madre bienal B2 y retrocruza RC1c (de izquierda a derecha), sembradas el 4/5/05. Foto tomada el 10/11/05.

En la segunda fecha de siembra, 14/6/05, el 100% de las plantas de A2 florecieron, mientras que solo el 6 % de las plantas B2 lo hicieron. Para las familias F₂ hubo una mayor variabilidad para la distribución de plantas florecidas y no: 63,9% de plantas florecieron en la familia F_{2a}, mientras que 80,4% de plantas lo hicieron en la familia F_{2b}.

Las primeras plantas entalladas fueron observadas el 5 de octubre (semana 22 del ciclo) para la siembra del 4/5/05, mientras que para la siembra del 14/6/05 las primeras plantas fueron observadas el 26 de octubre (semana 19). La mayor proporción de plantas de la generación F₁ (B₁ x A₁ y B₂ x A₂) entallaron una semana después que sus respectivos progenitores anuales (A₁ y A₂), mientras que para las retrocruzas (RC₁) las fechas de mayor porcentaje de plantas entalladas coincidieron (RC_{1a} y RC_{1d}) o fueron más tempranas (RC_{1b} y RC_{1c}) que sus respectivos padres anuales (figura 2.9.). Para ambas familias F₂, se observó un acortamiento en el ciclo cuando la fecha de siembra fue atrasada (figura 2.10.).

En el anexo I, tablas I.2.1 y I.2.2, se presentan las temperaturas medias y horas de frío por mes durante el año 2005.

Porcentaje de plantas entalladas (%)

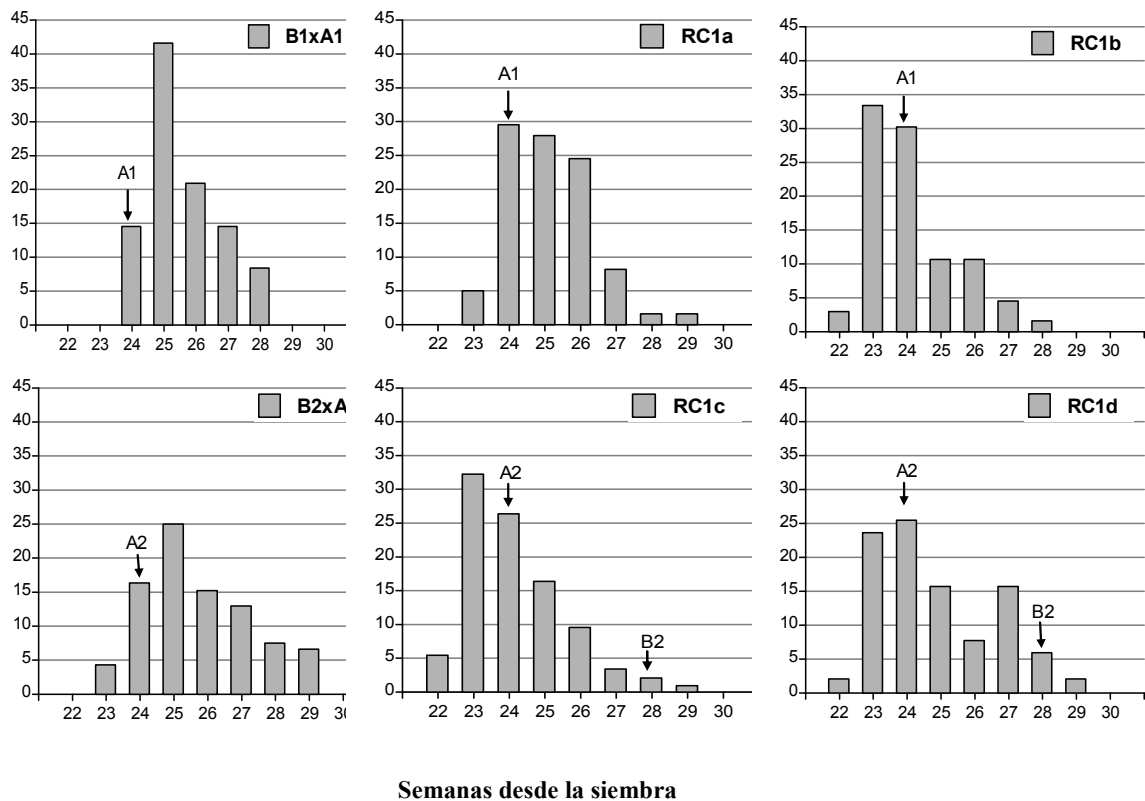


Figura 2.9. Porcentajes de plantas entalladas para las F1 y familias retrocruzadas en cada observación semanal. Las semanas desde la siembra (4/5/2005) se encuentran representadas en el eje x. Las fechas en las que los respectivos progenitores (A1, A2 y B2) presentaron el mayor porcentaje de plantas entalladas, se encuentra representadas por flechas. El progenitor B1 no se encuentra representado en los gráficos por no haber presentado plantas florecidas. En cuanto al progenitor B2, solo un 12 % de plantas florecieron.

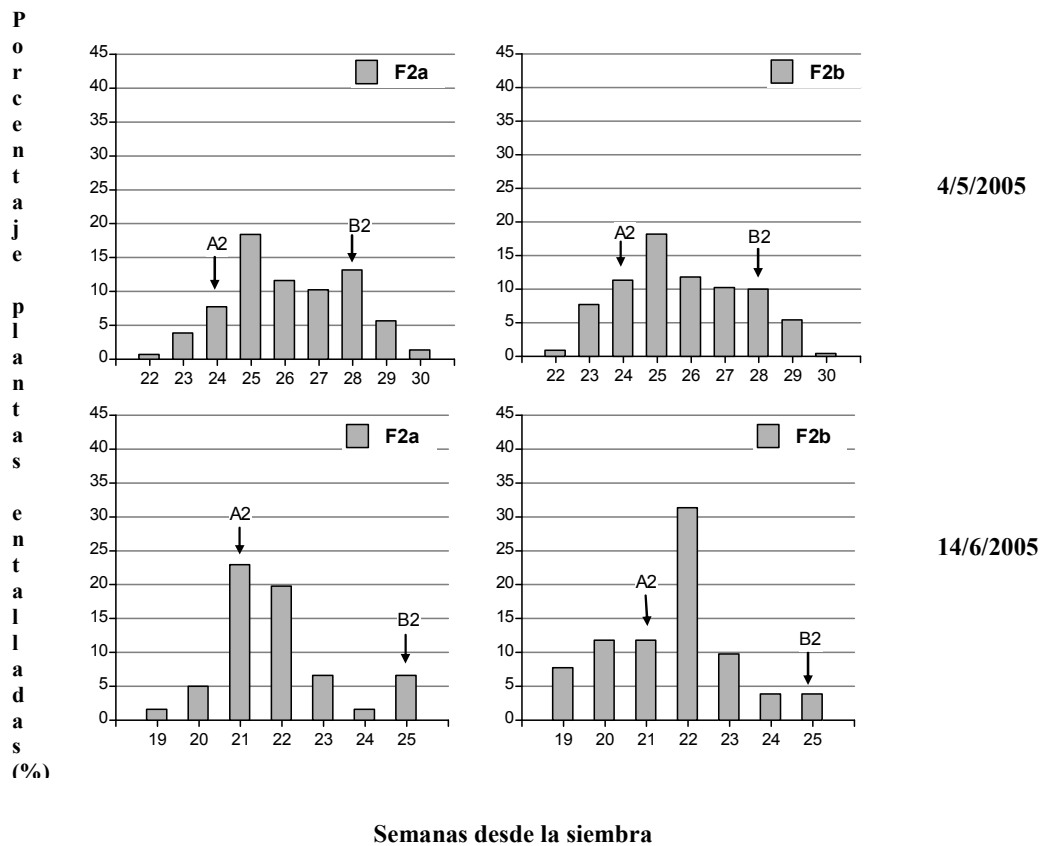


Figura 2.10. Porcentajes de plantas entalladas por semana para las familias F2 en la primer (4/5/2005) y segunda (14/6/2005) fecha de siembra. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra. Las fechas en las que los respectivos progenitores (A2 y B2) presentaron el mayor porcentaje de plantas entalladas, se encuentra representadas por flechas. Para el progenitor B2 solo un 12% y un 6% de plantas florecieron en la primer y segunda fecha de siembra, respectivamente.

2.3.3. Tercer Año

Datos pre-entallamiento

Se encontraron diferencias significativas entre los materiales para las variables peso de planta, largo de hojas, largo de raíces y número de hojas. Las medias de cada genotipo se presentan en la tabla II.4.1 del Anexo II, junto con la relación del peso de parte aérea / raíz.

Datos de floración

El padre anual presentó un 98,2% de plantas florecidas, mientras que la madre bienal floreció en un 1,8% y la F1 un 99,9%. Los porcentajes de plantas florecidas en las poblaciones segregantes están presentados en la tabla 2.2., junto con los valores de chi-cuadrado (χ^2).

Respecto al ciclo, las primeras plantas entalladas fueron observadas el 10 de octubre (semana 23). El mayor porcentaje de plantas entalladas en el padre anual (57%) fue en la semana 25 desde la siembra, mientras que en la madre bienal (1,2%) fue en la semana 27. El ciclo de cada población segregante está representado en las figuras 2.11. y 2.12.

Tabla 2.2. Valores observados y esperados para la relación anuales: bienales en las poblaciones segregantes de zanahoria bajo la hipótesis de un gen dominante simple que determina la anualidad, valores de chi-cuadrado (χ^2), y probabilidades (P). Siembra del 8/5/06.

Población	Valores Observados		Valores Esperados	χ^2	P
	Anuales	Bienales			
F _{2a}	216 72,7 %	81 27,3 %	3:1	0,75	0,40
F _{2b}	117 75,9 %	37 24,1 %	3:1	0,07	0,80
RC _{2c}	60 100 %	0 0 %	1:0	0,00	0,99
F _{3a}	89 66,9 %	44 33,1 %	3:1	4,62	0,05
F _{3b}	41 96,9 %	1 3,1 %	1:0	0,02	0,87
F _{3c}	106 92,1 %	9 7,9 %	1:0	0,70	0,40
F _{3d}	145 97,3 %	4 2,7 %	1:0	0,10	0,75

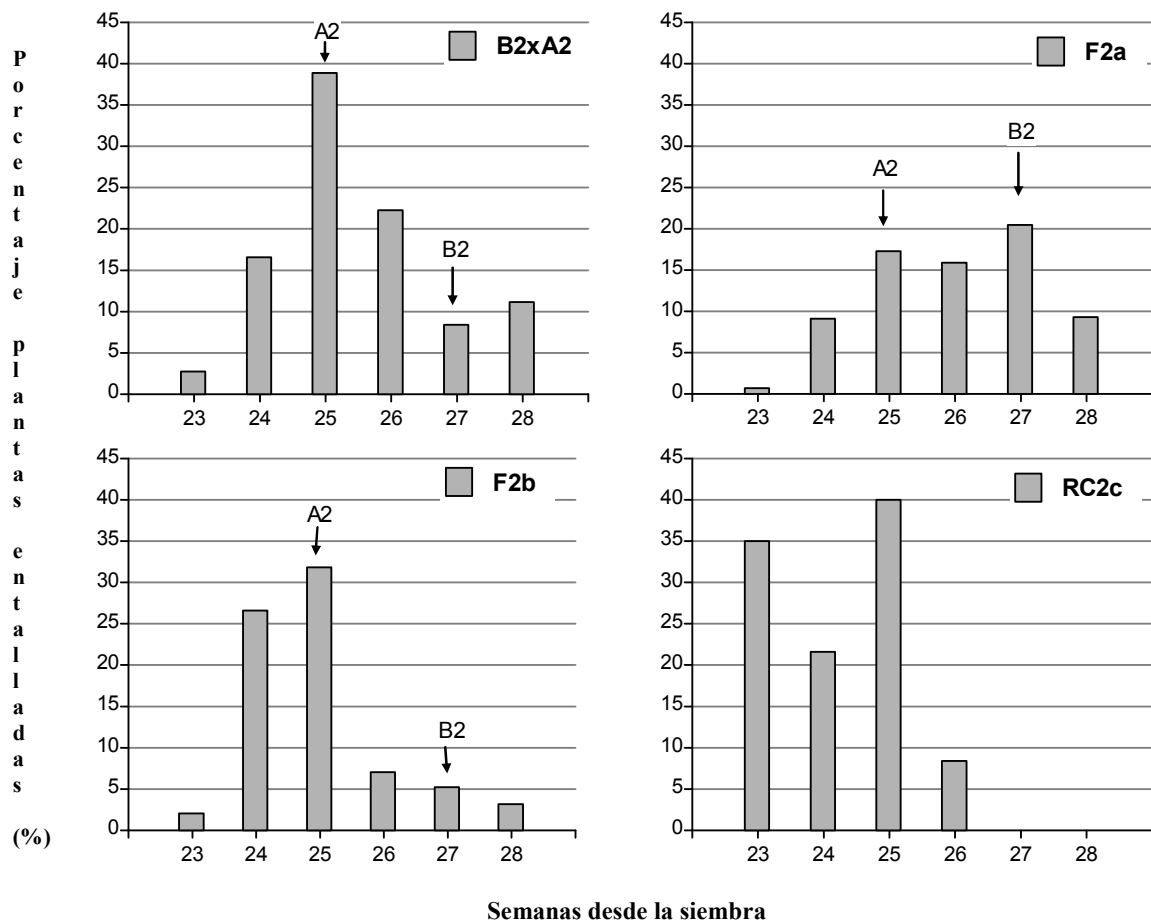


Figura 2.11. Porcentajes de plantas entalladas por semana para las familias B2xA2, F_{2a} y F_{2b} y BC_{2c} sembradas el 8 de mayo de 2006. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra. Las fechas en las que los respectivos progenitores (A2 y B2) presentaron el mayor porcentaje de plantas entalladas, se encuentra representadas por flechas. Para el progenitor B2 solo un 1,8% de plantas florecieron.

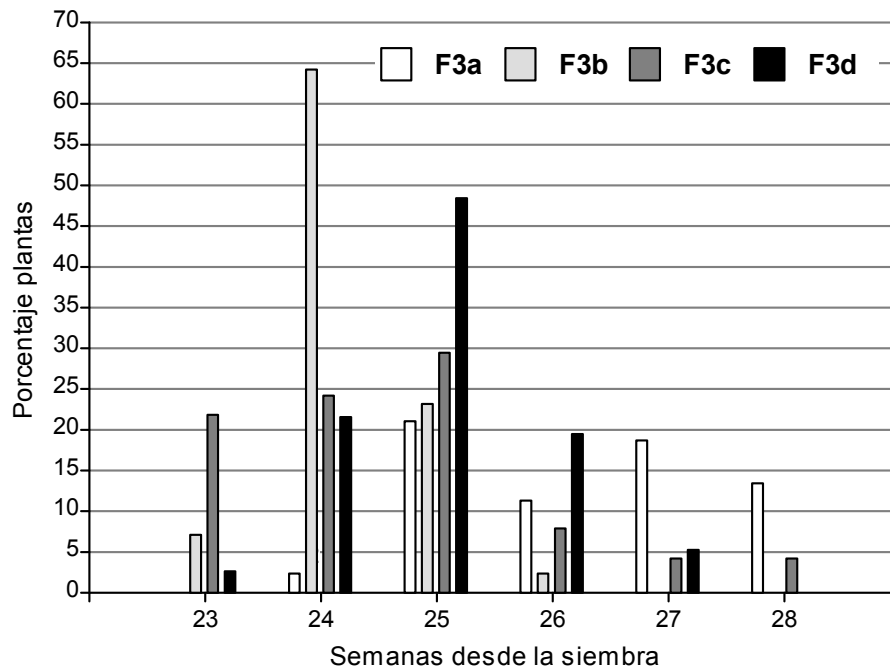


Figura 2.12. Porcentajes de plantas entalladas por semana para las familias F_{3a}, F_{3b}, F_{3c} y F_{3d} sembradas el 8 de mayo de 2006. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra.

2.4. DISCUSIÓN

La dominancia de la anualidad sobre la bienalidad para el hábito de floración fue claramente demostrado por las familias F₁ en los dos primeros años de ensayo y por los patrones de segregación de las familias RC y F₂ en el segundo año de ensayo. Los patrones de segregación observados en las familias F₃ y RC₂ confirmaron la dominancia de la anualidad sobre la bienalidad.

Estos resultados no concuerdan con el trabajo de Wijnheijmer *et al.* (1989), quienes sugirieron que el comportamiento bienal en zanahoria era un carácter dominante, aunque estos autores trabajaron con especies de zanahoria silvestre (*D. carota ssp. carota*) y cultivadas, y nunca estudiaron los cruzamientos entre ellas. Sin embargo, sí coincide con las observaciones preliminares realizadas por Dickson (1958), quien sostuvo la hipótesis de que la anualidad era dominante sobre la bienalidad, aunque no tuvo suficientes evidencias para llegar a una conclusión final.

En cuanto a las fechas de siembra evaluadas en el primer año de ensayo, se observó que la fecha de fines de abril fue la más adecuada para diferenciar a los individuos anuales de

los bienales en La Consulta, ya que en la fecha de principios de marzo algunos individuos bienales llegaron a florecer, mientras que en la fecha de principios de junio algunos individuos anuales no lograron completar su ciclo. En cuanto a las tres etapas fenológicas del período reproductivo de zanahoria evaluadas en el primer año de ensayos (entallamiento, aparición de primordios y floración), se observó similar diferenciación entre materiales genéticos para las tres etapas. Es decir que todos los individuos que comenzaban con el alargamiento de su tallo floral posteriormente completaban su ciclo con la floración de sus umbelas. Por lo tanto, para diferenciar plantas anuales de bienales resulta suficiente evaluar el entallamiento floral.

La segregación en las familias F_2 y RC_1P2 podría ser explicada por la acción de un gen simple dominante para la anualidad. En la primera siembra del segundo año de ensayo (4/5/05) la proporción de plantas anuales y bienales observadas en F_{2a} (73 % y 27 %) y F_{2b} (76,5 % y 23,5 %) se ajustan al patrón de segregación 3:1, típico de un gen simple. En el caso de las retrocruzas con el progenitor anual, la proporción de plantas anuales se acerca en todas las familias evaluadas al 100 %. En la segunda fecha de siembra (14/6/05) se observó una mayor desviación respecto al patrón de segregación en las familias F_2 , probablemente debido al menor número de plantas evaluadas por familia (61 plantas en F_{2a} y 51 plantas en F_{2b}).

En el tercer año de ensayos el patrón de segregación 3:1 volvió a observarse en las familias F_{2a} (72,7 % y 27,3 %) y F_{2b} (75,9 % y 24,1 %). Para las familias F_3 las proporciones observadas fueron cercanas a 3:1 (F_{3a}) y cercanas a 1:0 (F_{3b} , F_{3c} , F_{3d}). Esto confirma la acción de un gen simple, ya que las plantas F_2 utilizadas para la obtención de las F_3 por autofecundación fueron plantas anuales cuyos genotipos (heterocigotas u homocigotas dominantes) darían origen a los patrones de segregación observados. La proporción de plantas anuales observado en la segunda generación de retrocruza con el progenitor anual (RC_2) concuerda con lo esperado para la hipótesis de un gen simple dominante para la anualidad. La mayor desviación observada en la familia F_{3a} respecto a la segregación esperada (3:1) podría deberse a la menor cantidad de plantas evaluadas respecto a un "n" ideal de 300.

Se observaron diferencias en los porcentajes de entallamiento entre los dos padres bienales. Mientras que B1 nunca floreció, B2 tuvo un 70 % de floración en la fecha de siembra mas temprana del primer año (3/3/2004) y luego entre 1,8 % y 12 % en las siguientes evaluaciones. Sin embargo, esto no provocó diferencias significativas entre las

F1 obtenidas a partir de ambas madres bienales (B1xA1 vs B2xA2, B2xA3 y B2xA4) en los porcentajes de plantas entalladas ni en el ciclo. Las diferencias observadas entre los progenitores bienales podría deberse a diferencias alélicas dentro del mismo gen, siendo el alelo que confiere la anualidad dominante sobre las restantes alternativas, o a la influencia de otros genes en el carácter de interés, como vigor de plántula o velocidad de crecimiento.

Durante el tercer año de ensayos se evaluó el tamaño de las plantas 20 días antes que comenzara el entallamiento. Los genotipos bienales solo se diferenciaron entre sí en el tamaño de plántula (0,68g para B1 y 0,36g para B2) y en la relación parte aérea:raíces (0,60 para B1 y 1,33 para B2). Parecería más probable que la relación parte aérea:raíces influyera positivamente en la respuesta a la vernalización, ya que es en la parte aérea donde se sensa el frío, aunque debería realizarse un ensayo con mayor cantidad de genotipos y mediciones fenológicas de las plantas.

Al evaluar el número de hojas por plantas se observó que los materiales tenían entre 5 y 7 hojas verdaderas, valores bajos en comparación a lo observado por otros autores para lo que sería el final de la fase juvenil (Atherton *et al.*, 1990; Galmarini *et al.*, 1992; Galmarini y Della Gaspera, 1996), quienes han citado entre 8 y 12 hojas como umbral para que la planta de zanahoria sea receptiva a las bajas temperaturas. Probablemente la diferencia observada radique en que los trabajos citados trabajaron con plantas de zanahoria en condiciones controladas. Por lo tanto, el número de hojas puede ser un poco relativo para determinar la finalización de la fase juvenil, ya que puede variar con el vigor y las condiciones climáticas.

Diversos estudios han demostrado que el largo del día es detectado en las hojas y que el estímulo floral es conducido a través del floema hasta el meristema apical produciéndose luego la floración (Knott, 1934; Corbesier y Coupland, 2005). En el caso de la vernalización, generalmente se cree que el estímulo es captado en el meristema directamente. De hecho se han realizado estudios en apio, crisantemo y *Thalspi arvense* (Curtis y Chang 1930; Schwabe 1954; Metzger 1988), en los que la aplicación de frío exclusivamente en el meristema bastaba para vernalizar las plantas. Sin embargo, en estos estudios no se distinguía entre las células indiferenciadas del meristema y las hojas jóvenes que en él ya se encontraban. Otros trabajos, realizados en remolacha, *Luannari biennis* y *T. arvensis*, demostraron que la vernalización sí puede ocurrir en las hojas (Wellensiek 1964; Metzger 1988; Crosthwaite y Jenkins 1993).

En *Arabidopsis* se encontró que los niveles de *FLC ARNm*, represor de la floración, variaban en los meristemas antes y después del proceso de vernalización (Michaels y Amasino, 1999). Estudios más recientes (Searle *et al.*, 2006) demostraron que cambios en los niveles de expresión del gen *FLC* en hojas son un componente esencial de la respuesta a la vernalización en *Arabidopsis*. En *Beta vulgaris* L., Reeves *et al.* (2007) observaron que los niveles del gen represor de la floración (*BvFL1*) disminuían significativamente en las hojas luego de la vernalización y no así en los meristemas, postulando entonces que las hojas serían importantes receptores del frío y que la señal para florecer sería transmisible.

En las plantas en las que la floración es promovida por la vernalización seguida de fotoperíodos inductivos, probablemente es necesario que las hojas, que detectan el largo del día, hayan sido antes vernalizadas. En *Arabidopsis* el mecanismo de vernalización se produce a través de la represión epigenética del gen *FLC* y para facilitar las modificaciones producidas en la cromatina del gen probablemente se necesite la replicación del ADN, algo que no sucede en hojas viejas. Es por ello que las hojas vernalizadas podrían derivar del meristema vernalizado o de hojas jóvenes que todavía eran competentes para ser vernalizadas. (Searle *et al.*, 2006)

La zanahoria necesita de la vernalización y de fotoperíodos largos para florecer (Atherton y Basher, 1984). La profundización de estudios fisiológicos, a través de la medición de variables como números de hojas y estado del meristema en diferentes etapas del cultivo, y de estudios moleculares, como la expresión de genes relacionados con la vernalización, colaborarían a confirmar la duración del período juvenil en zanahoria y los factores que pudieran estar influyendo en el mismo.

La floración es una característica adaptativa importante, tanto para la producción de raíces como de semillas, en consecuencia el conocimiento del mecanismo genético de este carácter resulta de suma importancia en los planes de mejoramiento genético. Por ejemplo, la introgresión de genes entre los dos grupos de zanahorias, anuales y bienales, permitiría ampliar la base genética de cada grupo y aprovechar los efectos heteróticos que pudieran ocurrir.

Por otra parte, las observaciones realizadas en este trabajo indican que la evaluación y posterior selección del hábito de floración en los cultivares de zanahoria depende fuertemente de la fecha de siembra y las condiciones ambientales.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- ABE, J., G. P. GUAN y Y. SHIMAMOTO. 1997. A gene complex for annual habit in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* 94: 129-135.
- ASTORQUIZAGA; R.; M. S. ALESSANDRO y C. R. GALMARINI. 2004. Efecto de la fecha de siembra en la producción de semillas de zanahoria en el Valle de Uco. *Horticultura Argentina*, Vol. 23, Nro. 54: 69.
- ATHERTON, J. G. y E. A. BASHER. 1984. The effects of photoperiod on flowering in carrot. *J. Hort. Sci.*, 59 (2): 213 – 215.
- ATHERTON, J. G., J. CRAIGON y E. A. BASHER. 1990. Flowering and bolting in carrot. I. Juvenility, cardinal temperatures and thermal times for vernalization. *J. Hort. Sci.*, 65 (4): 423 – 429.
- CAMARGO, L.E.A. y T.C. OSBORN. 1996. Mapping loci controlling flowering time in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 92:610-616.
- CORBESIER, L. y G. COUPLAND. 2005. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: Integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant Cell Environ.* 28: 54–66.
- CROSTHWAITE, S.K. y JENKINS, G.I. 1993. The role of leaves in the perception of vernalizing temperatures in sugar-beet. *J. Exp. Bot.* 44: 801–806.
- CURTIS, O.F. y H.T. CHANG. 1930. The relative effectiveness of the temperature of the crown as contrasted with that of the rest of the plant upon the flowering of celery plants. *Am. J. Bot.* 17: 1047–1048.
- DIAS TAGLIACOZZO, G.M. y I.F.M. VALIO. 1994. Effect of vernalization on flowering of *Daucus carota* (Cvs Nantes and Brasilia). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6 (1): 71-73.
- DICKSON, M.H. 1958. The physiology and inheritance of flowering in carrots. Ph.D. Thesis. Michigan State University. 69 p.
- DICKSON, M.H. y C.E. PETERSON. 1958. Hastening greenhouse seed production for carrot breeding. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 71, 412-5.
- FERREIRA, M.E., J. SATAGOPAN, B.S. YANDELL, P.H. WILLIAMS y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 90:727-732
- GALMARINI, C.R., R. BORGIO y R. TIZIO. 1992. Determination of a Pre-Vernalization Phase in Carrot (*Daucus carota* L.) cv. Flakkee. *Turrialba*: Vol. 42, Num. 2, pp. 140-142, Trimestre Abril-Junio 1992.
- GALMARINI, C. R. y P. DELLA GASPERA. 1996. Determinación de requerimientos de pre-vernalización en zanahorias (*Daucus carota* L.) anuales. *Actas de la XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*, pp. 82. Mendoza. Marzo 1996.
- HILLER, L.K y W.C. KELLY. 1979. The effect of post-vernalization temperature on seedstalk elongation and flowering in carrots. *J Am Soc Hort Sci* 104 (2): 253 - 257.
- KNOTT, J.E. 1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Soc. Hortic. Sci.* 31: 152–154.

- LONA, J. L. y J. CRNKO. 1967. Floración prematura en zanahoria en las condiciones de La Consulta en relación a la producción de semillas. Mimeografiado, EEA La Consulta INTA. Mendoza. Argentina.
- METZGER, J.D. 1988. Localization of the site of perception of thermoinductive temperatures in *Thlaspi-Arvense* L. *Plant Physiol.* 88: 424–428.
- MICHAELS, S. D. y R. M. AMASINO. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11:949-956.
- MORELOCK, T.E., P.W. SIMON y C.E. PETERSON. 1996. Wisconsin wild: another petaloid male-sterile cytoplasm for carrot. *HortScience* 31:887–888
- OLIVA, R. 1987. Manual de producción de Semillas Hortícolas. Zanahoria. Publicación de la Asociación Cooperadora de la EEA La Consulta INTA, Mendoza, Argentina. 41 p.
- REEVES, P. A.; Y. HE; R. J. SCHMITZ; R. M. AMASINO; L. W. PANELLA y C. M. RICHARDS. 2007. Evolutionary conservation of the *FLOWERING LOCUS C*-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* 176:295-307 (May 2007).
- RUBATZKY, V. E., C. F. QUIROS, y P.W. SIMON, 1999. Carrots and related vegetable umbelliferae. *Crop production science in horticultural series*; 10. CABI Publ., Nueva York.
- SAKR, E.S y H.C. THOMPSON. 1942. Effect of temperature and photoperiod on seedstalk development in carrots. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 41: 343 - 346.
- SCHWABE, W.W. 1954. Factors affecting flowering in *Chrysanthemum* IV. The site of vernalisation and translocation of the stimulus. *J. Exp. Bot.* 5: 389–400.
- SEARLE, I., Y. HE, F. TURCK, C. VINCENT, F. FORNARA, S. KROBER, R. AMASINO y G. COUPLAND. 2006. The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 898 - 912.
- SIMON, P.W. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breed Rev* 19:157–190.
- TEUTONICO R.A. y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 91:1279-1283.
- WELLENSIEK, S.J. 1961. Leaf vernalization. *Nature* 192:1097–1098.
- WHITAKER, T. W., A. F. SHERF, W. H. LANGE, C. W. NICKLOW y J. D. RADEWALD. 1970. Carrot production in the United States. *Agriculture Handbook* No. 375, Agricultural Research Service, U.S.D.A., Washington D. C.
- WIJNHEIJMER, E.H.M., W.A. BRANDENBURG y S.J. TER BORG. 1989. Interactions between wild and cultivated carrots (*Daucus carota* L.) in the Netherlands. *Euphytica* 40:147-154.
- WOLYN, D.J. y A. CHAHAL. 1998. Nuclear and cytoplasmic interactions for petaloid male-steril accessions of wild carrot (*Daucus carota* L.). *J Am Soc Hort Sci* 123(5):849-853.
- YAN L., A. LOUKOIANOV, A. BLENCHL, G. TRANQUILI, W. RAMAKRISHNA, P. SANMIGUEL, J.L. BENNETZEN, V. ECHENIQUE y J. DUBCOVSKY. 2004. The

Wheat VRN2 Gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization.
Science, vol. 303: 1640-1644.

CAPÍTULO 3

HERENCIA DE LOS REQUERIMIENTOS DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIAS ANUALES Y BIENALES DE DIVERSOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS.

3.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 2 de esta tesis se determinó que la anualidad observada en el cultivar “Criolla INTA” estaba controlada por un gen simple dominante.

“Criolla INTA” fue desarrollado durante la década de 1980, como respuesta a la necesidad de disponer semilla de zanahoria de siembra estival adaptada a los requerimientos de calidad de los mercados en Argentina. Se inició el trabajo sobre material proveniente de poblaciones locales de zanahorias criollas, de gran rusticidad y adaptación a siembras estivales. A partir de ese material se seleccionaron raíces de coloración anaranjado intenso, tamaño mediano, baja relación xilema/floema, forma cilíndrica y punta obtusa. Se obtuvo el cultivar de zanahoria anual “Criolla INTA”, que conserva los mejores atributos en cuanto a rusticidad y adaptación a la siembra estival de las poblaciones originales, incorporando características de calidad de raíces.

En la actualidad, los cultivares de zanahoria son clasificados en dos grandes categorías: templados y subtropicales. Los cultivares templados se caracterizan por un menor vigor de plántula, una tasa de crecimiento más lenta y una floración más tardía a causa de sus mayores requerimientos de vernalización. Al ser cultivados en regiones subtropicales tienen un menor rendimiento, respecto a los cultivares subtropicales, y menor tolerancia a enfermedades que se presentan a mitad o fines de la estación de crecimiento, por el menor desarrollo de las plantas en esa etapa del cultivo. Por lo tanto, son utilizados en zonas de climas templados en siembras otoño-invernales. (Oliva, 1987; Rubatzky *et al.*, 1999)

Los cultivares subtropicales, caracterizados por su mayor vigor y floración más temprana, son cultivados durante el verano en regiones de clima templado y durante el invierno en regiones de climas más cálidos. Como ejemplo de regiones donde son utilizados en invierno podemos citar Florida, el sur de California y México, mientras que en verano son utilizados en Canadá y el norte de EEUU. Un similar nivel de adaptación se puede observar durante el verano en el norte de Europa y Escandinavia, y durante el invierno en el Sur de Europa, el Mediterráneo y Oriente Medio (Rubatzky *et al.*, 1999).

Dentro de cada categoría, templados y subtropicales, existen varios tipos de cultivares determinados principalmente por la forma de las raíces y en menor medida por la tasa de crecimiento (Rubatzky *et al.*, 1999). Dentro de los cultivares templados se incluyen los tipos “Nantesa”, “Flakkee”, “Emperador”, “Danvers” y “Chantenay”, mientras que

entre los cultivares subtropicales podemos citar a “Kuroda”, “Brasilia” y “Nantesa Tropical” (Rubatzky *et al.*, 1999).

En ensayos comparativos del cultivar “Criolla INTA” con cultivares comerciales templados del tipo “Nantesa”, “Flakkee”, “Emperador” y “Danvers”, la anualidad de “Criolla INTA” se evidenció claramente y se determinó que su floración temprana se debería a un menor requerimiento de horas de frío luego de su período juvenil (Astorquizaga *et al.*, 2004; Galmarini y Della Gaspera, 1996).

Las zanahorias también pueden clasificarse en base a su lugar de origen. La evidencia más temprana del cultivo de zanahorias data del siglo X en Afganistán e Irán, expandiéndose desde allí su cultivo a través de Asia y Europa (Banga, 1957a). Las primeras zanahorias cultivadas fueron púrpuras, amarillas o blancas. De ellas surgieron las modernas zanahorias del Este y las del Oeste. Las zanahorias del Este tienen tendencia a la floración temprana, raíces púrpuras o amarillas, y hojas ligeramente disectadas, verde-grisáceas y pubescentes. Las zanahorias del Oeste tienen menor tendencia a la floración prematura, raíces naranjas, rojas, amarillas o blancas, y hojas profundamente disectadas y menos pubescentes (Small, 1978; Rubatzky *et al.*, 1999).

Según Vavilov (1951), el centro de origen de las zanahorias del Este sería Asia central, incluyendo el noroeste de India, Afganistán, Tadjijistán, Uzbekistán y el Oeste de Tian-Shan. Mackevic (1929) y Heywood (1983) sugirieron que la región del Hindu Kush, en Afganistán, sería el centro primario de diversificación de las zanahorias del Este. La zona de origen de las zanahorias del Oeste, según Vavilov (1951), sería Asia Menor, la Transcaucasia, Irán, y las tierras altas de Turkmenistán. Posteriormente, Banga (1957a) propuso que actualmente Asia Menor sería el centro primario de la especie.

Banga (1957b) estudió el desarrollo y la adaptación de la zanahoria en Europa, a través del estudio de antiguos manuscritos y pinturas, concluyendo que las primeras zanahoria que entraron en Europa Oriental en el siglo XIV desde el Medio Oriente fueron púrpuras y luego en el siglo XVII ingresaron las zanahorias amarillas también desde Medio Oriente. Algo similar ocurrió en China en la misma época. En América las zanahorias llegaron a través de los inmigrantes europeos en el siglo XVII (Rubatzky *et al.*, 1999).

Las zanahorias naranjas aparecieron por primera vez en pinturas europeas en el siglo XVII, aunque su posible origen todavía no está claro. En base a sus estudios, Banga (1957b) concluye que las zanahorias naranjas fueron desarrolladas por selección a partir de zanahorias amarillas, obteniéndose los primeros cultivares en Holanda. Small (1978), sin

embargo, propone que las zanahorias naranjas surgieron a partir de cruzamientos entre zanahorias cultivadas y zanahorias silvestres. Heywood (1983), por su parte, coincide con Small en que las zanahorias naranjas fueron desarrolladas por selección del hombre a partir de cruzamientos entre especies cultivadas y silvestres.

Se desconoce el tipo de herencia de la anualidad en otras zanahorias subtropicales a excepción de Criolla INTA. Para profundizar los estudios genéticos sobre los requerimientos de vernalización en zanahoria y determinar si el tipo de herencia observado en el capítulo 2 se repetía en otros materiales de zanahoria, se decidió evaluar en un mismo ambiente distintas accesiones de zanahorias anuales y bienales, y sus cruzamientos.

Hipótesis: un gen simple de acción dominante codifica la respuesta a la vernalización en zanahorias de diversos orígenes geográficos.

Objetivo: estudiar la respuesta a la vernalización en zanahorias anuales y bienales de diversos orígenes y sus cruzamientos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal:

Se evaluaron materiales genéticos provenientes de EEUU, India, Pakistán, Turquía, Japón y Argentina, y los cruzamientos (F₁) obtenidos a partir de los mismos.

Características de los materiales genéticos utilizados:

- Japón60: accesión PI 319860 del USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. Cultivar proveniente de Japón, nombre comercial Takii's Scarlet Gonder. Ciclo: desconocido. Coloración raíces: floema (parte externa) púrpura o amarillo, xilema (corazón) rojo o amarillo. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1237929>

- Turquía60: accesión PI 206960 del USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. Población colectada en Eskisehir, Turquía. Ciclo: desconocido. Coloración raíces: floema púrpura o amarillo, xilema blanco o amarillo. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1173323>
- Turquía88: accesión PI 172888 del USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. Población colectada en Van, Turquía. Ciclo: desconocido. Coloración raíces: floema púrpura o amarillo, xilema púrpura o amarillo. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1150259>
- India87: accesión PI 179687 del USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. Población colectada en Rajasthan, India. Ciclo: desconocido. Coloración raíces: floema púrpura y xilema blanco. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1155784>
- Pakistán35: accesión PI 163235 del USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. Población colectada en Punjab, Pakistán. Ciclo: desconocido. Coloración raíces: floema púrpura, xilema rosa. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1140411>
- EEUU: línea androestéril 2566 proveniente del programa de mejoramiento genético del USDA. Ciclo: bienal. Coloración raíces: naranja.
- B2: línea androestéril proveniente del programa de mejoramiento de la EEA La Consulta INTA. Ciclo: bienal. Coloración raíces: naranja.
- Criolla INTA: cultivar obtenido en la EEA San Juan INTA. Ciclo: anual. Coloración raíces: naranja.

Cruzamientos: durante el año 2007 fueron aisladas plantas individuales en floración de los genotipos androestériles con plantas individuales de los genotipos de distintos orígenes (dadores de polen), mediante la utilización de jaulas de aislamiento y moscas para la polinización (foto 1). Fueron cosechadas con éxito semillas de los siguientes cruzamientos: B2xIndia87, EEUUxTurquía60, EEUUxTurquía88 y EEUUxJapón60.

3.2.2. Metodología:

Los materiales fueron sembrados en el campo experimental de la EEA La Consulta INTA el 29 de abril de 2008 empleando un diseño en bloques completamente al azar con tres repeticiones. La fecha de siembra fue seleccionada para poder diferenciar plantas anuales de bienales, en base a los resultados observados en los ensayos de años anteriores. En el anexo I se presentan los datos climáticos correspondientes a 2008 (Tablas I.5.1 y I.5.2). El tamaño de cada parcela fue de 1 cama de siembra de 5 metros de largo. La distancia entre camas de siembra fue de 80 cm y entre plantas de 10 a 15 cm. Fueron evaluadas, en promedio, 38 plantas por parcela. Los datos tomados fueron porcentaje de plantas florecidas en cada población y días desde la siembra hasta el entallamiento, para lo cual se realizaron observaciones semanales a partir de septiembre. Una planta fue considerada entallada cuando se veía a simple vista el primer entrenudo de su tallo floral elongado, tal lo explicado en el capítulo 2 (figura 2.3.A). Con los datos obtenidos se realizaron análisis de variancia y diferencia de medias (prueba de Duncan).

3.3. RESULTADOS

Los materiales evaluados se diferenciaron significativamente en el porcentaje total de plantas entalladas. Los progenitores androestériles evaluados presentaron un 0 % (EEUU) y un 8 % (B2) de plantas entalladas, mientras que los progenitores dadores de polen presentaron 100 % (Criolla INTA, India87, Pakistán35 y Japón60), 99 % (Turquía60) y 96 % (Turquía88) de plantas entalladas. En cuanto a los cruzamientos el material EEUUxJapón60 presentó un 98 % de plantas entalladas, el material EEUUxTurquía60 un 94 %, el material EEUUxTurquía88 un 83 % y el material B2xIndia87 un 82%. La prueba de diferencia de medias permitió distinguir claramente los genotipos bienales (0-7% de entallamiento) de los genotipos anuales y los cruzamientos (82 – 100% de entallamiento) (tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Prueba de Duncan para diferencia de medias por cultivar de los porcentajes de plantas entalladas.

Material	Plantas entalladas (%)	
EEUU	0	A
B2	7,67	A
B2xIndia87	81,67	B
EEUxTurquía88	83	B
EEUxTurquía60	94,33	B C
Turquía88	96,33	C
EEUxJapón60	97,67	C
Turquía60	98,67	C
Criolla INTA	100	C
Pakistán35	100	C
India87	100	C
Japón60	100	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

En cuanto al ciclo, se destacaron los materiales de la India y Pakistán por su extrema precocidad, con 85% de plantas entalladas en la semana 23, seguidos por Criolla INTA (47%) y B2xIndia87 (30%). Los genotipos Turquía60, EEUxJapón60 y EEUxTurquía60 tuvieron su máximo porcentaje de entallamiento alrededor de la semana 26 (tabla 3.2. y figura 3.1.). En fotografías sacadas en noviembre de 2008 (figuras 3.2., 3.3., 3.4. y 3.5.) se puede apreciar las diferencias del ciclo en estados avanzados de la floración. Mientras que los genotipos Pakistán35 e India87 se encontraban en floración (primer umbela abierta y en polinización), los restantes genotipos anuales (Turquía60, Turquía88, Criolla INTA) y cruzamientos (EEUxTurquía60, EEUxTurquía88, EEUxJapón60 y B2 x India87) se encontraban entallados o con el primordio de la primer umbela desarrollado. Los genotipos bienales (EEU y B2), en cambio, se encontraban en estado vegetativo.

De los 4 cruzamientos obtenidos, tres (EEUxTurquía60, EEUxTurquía88 y EEUxJapón60) presentaron plantas fértiles y plantas estériles en su descendencia, mientras que el cruzamiento B2 x India87 presentó la totalidad de las plantas estériles. Las plantas F₁ fértiles fueron autofecundadas, a través del aislamiento en jaulas y polinización con moscas, para obtener familias F₂ que serán evaluadas en un futuro cercano.

Tabla 3.2. Porcentaje de plantas entalladas por cultivar.

Material	Semanas desde la siembra					
	23	24	25	26	27	28
EEUU	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	2	2,67	0,67	2,33
EEUUxTurquía88	0	7,67	14,33	13,67	29	17,67
EEUUxJapón60	1,33	11,67	33,33	32,33	13,33	6
Turquía60	1,33	7,67	23,33	47,33	11	7,67
EEUUxTurquía60	2	7,67	22,33	31,67	17,33	14
Turquía88	13,67	21	18	21	17	5,67
B2xIndia87	30,67	22,67	14,67	10,33	3,67	0
Criolla INTA	46,67	21,67	15,33	8,33	6	2
India87	78,33	16	5,67	0	0	0
Pakistán35	89,0	7,7	3,3	0	0	0

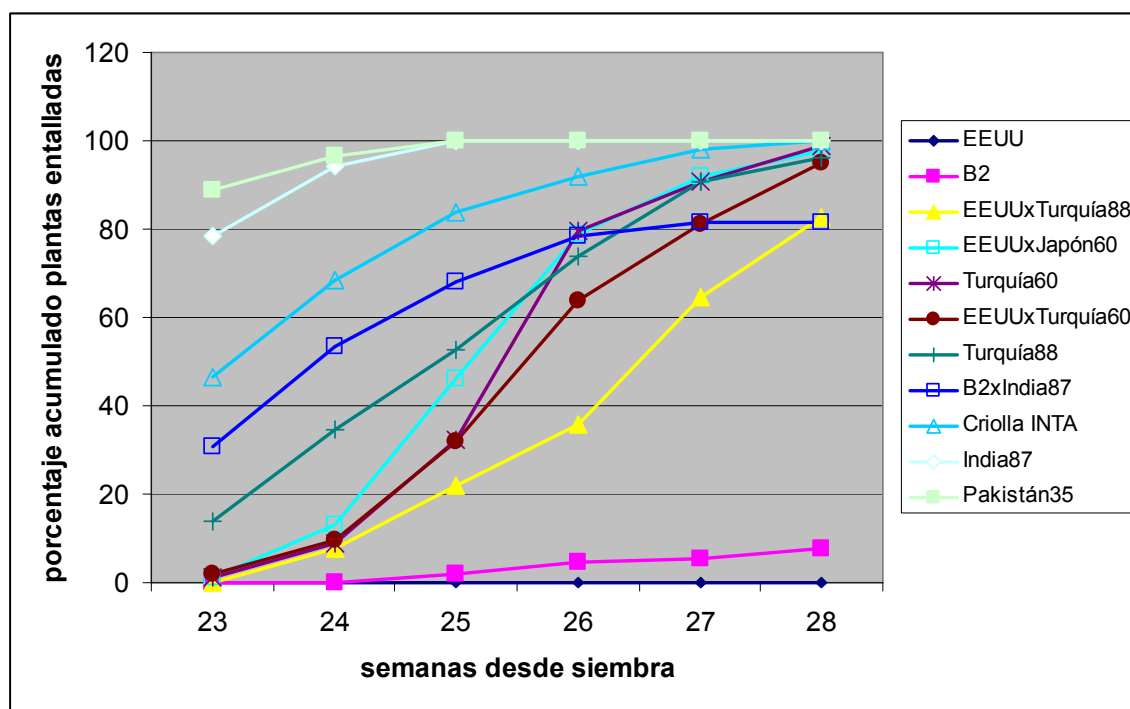


Figura 3.1. Porcentajes acumulados de plantas entalladas por semana para los materiales B2, EEUU, Criolla INTA, Turquía60, EEUUxTurquía60, Turquía88, EEUUxTurquía88 y EEUUxJapón60 sembrados el 29 de abril de 2008. En el eje x están representadas las semanas desde la siembra. El material Japón60 no está graficado por la pequeña cantidad de plantas evaluadas.



Figura 3.2. Genotipos EEUU, Turquía60, India87 y EEUUxTurquía60 (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.



Figura 3.3. Genotipos EEUUxJapón60, B2xIndia87 y CriollaINTA (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.



Figura 3.4. Genotipos Turquía60 e India87 (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.



Figura 3.5. Genotipos Pakistán35, B2, EEUxTurquía60, EEUxTurquía88 (de izquierda a derecha). Fotografía sacada el 4 de noviembre de 2008.

3.4. DISCUSIÓN

A pesar de que se presumía que los materiales provenientes del GRIN podrían ser anuales, su ciclo era dudoso por cuanto no se había encontrado un ambiente adecuado, y con experiencias previas en evaluación de genotipos por sus requerimientos de vernalización, para evaluarlos. En base al ensayo realizado en la EEA La Consulta se pudo confirmar la anualidad de los materiales provenientes del GRIN. El comportamiento de los cruzamientos entre materiales anuales y bienales de distintos orígenes también confirmó la dominancia de la anualidad sobre la bienalidad.

La variabilidad observada en el ciclo podría deberse a la presencia de alelos múltiples o a interacciones génicas que influyen en el carácter. De hecho, los materiales más precoces (India87 y Pakistán35) comparten una misma zona de origen, perteneciendo a las zanahorias del este que se caracterizan por una mayor tendencia a la floración prematura según la bibliografía (Heywood, 1983; Mackevic, 1929; Rubatzky *et al.*, 1999; Vavilov, 1951). Es probable que el ambiente en el cual evolucionaron estas poblaciones favoreciera la presencia de alelos con menor requerimiento de vernalización o la selección natural de genes que interactúan provocando una floración más temprana. Las poblaciones

provenientes de Turquía, centro de origen de las zanahorias del oeste, también se comportaron como anuales aunque con un ciclo desde siembra a entallamiento más largo. Esto coincidiría en parte con lo citado por otros autores respecto a la tendencia a la floración prematura de las zanahorias del oeste, aunque es evidente que el ambiente en el cual se hacen las evaluaciones es de gran influencia en los resultados (Heywood, 1983; Mackevic, 1929; Rubatzky *et al.*, 1999; Vavilov, 1951). En las poblaciones evaluadas en este trabajo de tesis, tanto las zanahoria del este como del oeste se comportaron como anuales, aunque las del este tendrían un ciclo más corto.

La variabilidad en los requerimientos de vernalización fue observada desde que las zanahorias domésticas llegaron a Europa provenientes de los países Arabes, alrededor de los siglos 13 o 14 (Banga, 1957). Es probable que durante el proceso de domesticación de la zanahoria en Europa las plantas fueran perdiendo su tendencia a la floración prematura (Rubatzky *et al.*, 199), ya que tanto la selección natural por la adaptación a inviernos más fríos, como la selección artificial para la cosecha de raíces más palatables, favorecieran alelos con mayores requerimientos de frío para florecer.

En este ensayo se observaron diferencias entre los materiales bienales evaluados (B2 y EEUU), al igual que lo observado en el capítulo 2 entre B1 y B2, y coincidente con lo citado por Astorquizaga *et al.* (2004). Lamentablemente se desconoce con precisión el origen geográfico de los distintos cultivares, aunque en base a lo observado en las poblaciones anuales podría inferirse que la adaptación a inviernos más o menos rigurosos trajo como consecuencia una selección de genes o una expresión diferencial de los mismos.

La variabilidad en los requerimientos de vernalización con dominancia de la anualidad ha sido observada en otras especies. En *Brassica napus* la anualidad es dominante sobre la bienalidad y habrían dos genes recesivos, uno mayor y otro menor, que conferirían distintos requerimientos de vernalización según las combinaciones encontradas (Ferreira *et al.*, 1995; Thurling y Vijendra Das, 1979; Van Deynze y Peter Paul, 1994). En *Brassica rapa* fueron mapeados homólogos del gen *FLC* en tres cromosomas (R2, R3 y R10), por lo tanto *FLC* podría regular el tiempo de floración a través de múltiples copias (Osborn *et al.*, 1997). Esto es consistente con el modelo de Michaels y Amasino (1999), quienes proponen que el gen *FLC* produce un inhibidor de la floración, siendo el retraso de la floración proporcional al número de copias de alelos de floración tardía. En las especies de *Brassicac*s existirían muchas mas combinaciones potenciales de alelos del gen *FLC* que conferirían distintos tiempos de floración.

En *Hordeum vulgare* L. fueron encontrados 3 genes (*Vrn-H1*, *Vrn-H2* y *Vrn-H3*) que interactúan controlando la respuesta a la vernalización, mostrando los alelos presentes en los loci *Vrn-H1* y *Vrn-H2* diversos grados de dominancia e interacción epistática (Takagashi y Yasuda, 1971; Yasuda *et al.*, 1993). En *Triticum monococcum* L. existen dos genes, *Vrn-A^{m1}* y *Vrn-A^{m2}*, que distinguen a plantas anuales de bienales, existiendo interacción epistática entre ambos y siendo el hábito primaveral siempre dominante. (Tranquilli y Dubcovsky, 2000). En *Triticum aestivum* L. el hábito de crecimiento primaveral estaría determinado por tres genes dominantes, la presencia de cualquiera de los tres conferiría el hábito primaveral, aunque uno de ellos tiene un efecto mayor, mientras que en los trigos invernales es necesaria la presencia de genes recesivos en los tres loci, aunque la variabilidad encontrada en la respuesta a la vernalización dentro de este grupo permitiría inferir la existencia de múltiples alelos recesivos (Pugsley, 1971). La frecuencia de diferentes alelos en cultivares de trigo de diferentes partes del mundo sugiere que la combinación de los mismos tiene un valor adaptativo (Goncharov, 1998; Iwaki *et al.*, 2001; Stelmakh, 1990; Stelmakh, 1998).

En el caso de *Arabidopsis*, los ecotipos anuales, que florecen rápidamente y no responden a la vernalización, han evolucionado en múltiples ocasiones a través de la interrupción de la secuencia regulatoria del gen *FLC* por transposones (Michaels *et al.*, 2003) y a través de deleciones y mutaciones en *FRI*, un regulador positivo de *FLC* (Johanson *et al.*, 2000). Al estudiar las variaciones en el tiempo de floración en poblaciones nativas de *Arabidopsis* en Europa, caracterizadas por la presencia extrema de plantas bienales en el norte y anuales en el sur, Caicedo *et al.* (2004) atribuyeron la variabilidad encontrada a una compleja interacción epistática entre copias funcionales de *FRI* y *FLC*.

La evaluación en un mismo ambiente de materiales anuales y bienales de zanahoria de distintos orígenes geográficos, así como el estudio de nuevos cruzamientos tanto entre genotipos anuales y bienales como entre anuales de diferente ciclo y entre bienales de diferente ciclo, podría contribuir a un mayor entendimiento de los mecanismos genéticos que determinan un carácter tan importante como el requerimiento de vernalización. La evaluación de las F2 obtenidas a partir de algunos de los cruzamientos evaluados en esta tesis (EEUxJapón63, EEUxTurquía88 y EEUxTurquía60), así como otras F2 obtenidas a partir de nuevos cruzamientos, permitiría explicar si la variabilidad observada se debe a un solo gen con varios alelos o a más genes que están interactuando.

La utilización de marcadores moleculares, tanto específicos como funcionales, desarrollados a partir del mapeo y clonado del gen o genes que regulan los requerimientos de vernalización en zanahoria, permitiría evaluar más rápidamente un mayor número de accesiones y cultivares en busca de diversidad en los genes de vernalización.

Actualmente, las zanahorias anuales o de floración tempranas son cultivadas en zonas de temperaturas cálidas y en zonas subtropicales de producción de Sudamérica y Asia (Simon *et al.*, 2008). La identificación de genotipos de zanahoria con distintos requerimientos de vernalización permitiría un mejor aprovechamiento de los recursos para la producción de raíces y semillas. En los climas más calurosos se podrían utilizar los genotipos más precoces acortando así el ciclo de producción de raíces, mientras que en las zonas con inviernos más rigurosos la utilización de cultivares con altos requerimientos de vernalización permitiría evitar la floración prematura, un defecto muy importante y ampliamente observado en los cultivos de zanahoria. Para la producción de semillas los climas más fríos siempre serán más favorables, aunque el conocimiento de los distintos ciclos de cultivo permitiría ajustar las fechas de siembra acortando el cultivo en los materiales precoces y asegurando un 100 % de floración en los materiales más tardíos al realizar siembras tempranas.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- ASTORQUIZAGA, R.; M. S. ALESSANDRO y C. R. GALMARINI. 2004. Efecto de la fecha de siembra en la producción de semillas de zanahoria en el Valle de Uco. Horticultura Argentina, Vol. 23, Nro. 54: 69.
- BANGA, O.1957a. The development of the original European carrot material. Euphytica 6:64-76.
- BANGA, O.1957b. Origin of the European cultivated carrot material. Euphytica 6:54-63.
- CAICEDO, A. L., J. R. STINCHCOMBE, K. M. OLSEN, J. SCHMITT y M. D. PURUGGANAN. 2004. Epistatic interaction between Arabidopsis FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15670–15675.
- FERREIRA, M.E., J. SATAGOPAN, B.S. YANDELL, P.H. WILLIAMS y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus*. Theor Appl Genet 90:727-732
- GALMARINI, C. R. y P. DELLA GASPERA. 1996. Determinación de requerimientos de pre-vernalización en zanahorias (*Daucus carota* L.) anuales. Actas de la XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, pp. 82. Mendoza. Marzo 1996.
- GONCHAROV, N.P. 1998. Genetic resources of wheat related species: The *Vrn* genes controlling growth habit (spring vs. winter). Euphytica 100:371–376.
- HEYWOOD, V.H. 1983. Relationship and evolution in the *Daucus carota* complex. Israel Journal of Botany 32:51-65.
- IWAKI, K., S. HARUNA, T. NIWA, AND K. KATO. 2001. Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. Plant Breed. 120:107–114.
- JOHANSON, U., J. WEST, C. LISTER, S. MICHAELS y R. AMASINO. 2000. Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. Science 290:344–347.
- MACKEVIC, V.I. 1929. The carrot of Afganistan. Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding 20: 517-562.
- MICHAELS, S. D. y R. M. AMASINO. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. Plant Cell 11:949-956.
- MICHAELS, S.D., Y.HE, K. C. SCORTECCI y R. M. AMASINO. 2003. Attenuation of *FLOWERING LOCUS C* activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 10102–10107.
- OLIVA, R. 1987. Manual de producción de Semillas Hortícolas. Zanahoria. Publicación de la Asociación Cooperadora de la EEA La Consulta INTA, Mendoza, Argentina, 41 pp.
- PUGSLEY, A.T. 1971. A genetic analysis of the spring-winter habit in wheat. Austr J Agric Res 22:21-31.

- RUBATZKY, V. E., C. F. QUIROS, y P. W. SIMON, 1999. Carrots and related vegetable umbelliferae. Crop production science in horticultural series; 10. CABI Publ., Nueva York.
- SIMON, P. W., R.E. FREEMAN, J.V. VIEIRA, L.S. BOITEUX, M. BRIARD, T. NOTHNAGEL, B. MICHALIK, y Y.S. KWON. 2008. Carrot breeding. En: J. Prohens, M.J. Carena y F. Nuez (eds.). Handbook. of crop breeding. Vol. 1, Vegetable breeding. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- SMALL, E. 1978. A numerical taxonomic analysis of the *Daucus carota* complex. Can J Bot 56:248–276.
- STELMAKH, A.F. 1990. Geographic distribution of *Vrn* genes in landraces and improved varieties of spring bread wheat. Euphytica 45:113–118.
- STELMAKH, A.F. 1998. Genetic systems regulating flowering response in wheat. Euphytica 100:359–369.
- TAKAHASHI, R. y S. YASUDA. 1971. Genetics of earliness and growth habit in barley. En Nilan RA(ed) Proceedings Proc 2nd International Barley Genetics Symposium, pp. 388–408. Washington State University Press.
- TRANQUILLI, G. Y J. DUBCOVSKY. 2000. Epistatic interaction between vernalization genes *Vrn-Am1* and *Vrn-Am2* in *Triticum monococcum*. J. Hered., 91:304-306.
- THURLING, N. y L. D. VIJENDRA DAS. 1979. Genetic control of the preanthesis development of spring rape (*Brassica napus*). I. Diallel analysis of variation in the field. Aust. J. Agric. Res. 30:251-259.
- VAN DEYNZE, A. y K. PETER PAUL. 1994. The inheritance of seed colour and vernalization requeriment in *Brassica napus* using double haploid populations. Euphytica 74: 77-83.
- VAVILOV, N.I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Chron. Botany 13: 1-336.
- YASUDA S., J. HAYASHI y I. MORIYA. 1993. Genetic constitution for spring growth habit and some other characters in barley cultivars in the Mediterranean coastal regions. Euphytica 70:77–83

CAPÍTULO 4

**IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES
CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL
CARACTER REQUERIMIENTO DE
VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: BÚSQUEDA A
TRAVÉS DE GENES ORTÓLOGOS.**

4.1. INTRODUCCIÓN

La floración está determinada por genes que gobiernan la identidad del meristema, promoviendo o reprimiendo el destino floral versus el destino vegetativo. Estos genes a su vez son activados tanto por el estado de desarrollo de la planta como por el ambiente (Van Nocker, 2001). En muchas especies se han estudiado los requerimientos de vernalización desde el punto de vista molecular, entre otras pueden citarse *Arabidopsis thaliana* L., *Brassica napus* L., *Brassica rapa* L., *Brassica oleracea* L., *Brassica nigra*, *Triticum monococcum*, *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Secale cereale* L. y *Avena sativa* L. Gran parte de los genes encontrados han sido comparados entre especies.

Dentro de las dicotiledóneas, *Arabidopsis thaliana* ha sido utilizada como planta modelo para los estudios de floración por su pequeño tamaño, su corto ciclo de vida, su genoma bien caracterizado y su tiempo de floración altamente influenciado por factores ambientales. En base a estudios genéticos se determinó que había al menos dos caminos o rutas para promover la floración: la ruta “fotoperiódica” y la ruta “autónoma” (Martinez-Zapater *et al.*, 1994; Coupland, 1995). En la ruta “autónoma” se encuentran los genes influenciados por el período de vernalización (Martinez-Zapater *et al.*, 1994). Las diferencias en el hábito de floración entre ecotipos de *Arabidopsis sp.* de floración temprana y tardía se debe a variaciones alélicas de dos loci: *FRIGIDA (FRI)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Clarke y Dean, 1994). Los ecotipos de floración tardía tienen los alelos dominantes *FRI* y *FLC* que suprimen la floración, mientras que los de floración temprana contienen los alelos recesivos *fri* y/o *flc*. Según los autores Lee y Amasino (1995), *FRI* y *FLC* actúan de manera sinérgica para retrasar la floración, y su efecto es suprimido por la vernalización. Estudios posteriores (Michaels y Amasino, 1999) determinaron que el gen *FLC* juega un rol central en el control del hábito de floración de la ruta autónoma, y su actividad está negativamente regulada por la vernalización, y positiva y negativamente regulada por otros genes de la ruta (como *FRI* y *LD*).

El nivel de *FLC* ARNm (ácido ribonucleico mensajero) es mayor en los ápices vegetativos y en las raíces. En los meristemas florales no se detectaron niveles de *FLC* ARNm, esto indicaría que para la transición a la etapa reproductiva es necesaria una menor expresión del gen *FLC*. Una vez que las plantas de *Arabidopsis* fueron vernalizadas, se dejaron de detectar niveles de *FLC* ARNm en los ápices vegetativos, sugiriendo que la menor expresión del gen *FLC* es un componente necesario en la respuesta a la vernalización. (Michaels y Amasino, 1999)

En varias especies del género *Brassica* (*B. rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. napus* y *B. juncea*) fueron mapeados, mediante marcadores moleculares, los QTL responsables del tiempo de floración (Camargo y Osborn, 1996; Ferreira *et al.*, 1995; Osborn *et al.*, 1997). Las especies del género *Brassica* se encuentran en la misma familia (*Brassicaceae*) que *Arabidopsis thaliana* (n=5), habiendo divergido ambos géneros hace 15-21 millones de años (Koch *et al.*, 2000). Los genomas de las Brassicas contienen grandes segmentos de cromosomas muy similares a la parte superior del cromosoma 5 de *Arabidopsis sp.* (At5), y en esos segmentos han sido localizados varios QTL que influyen en el tiempo de floración (Lagercrantz *et al.*, 1996; Osborn *et al.*, 1997). La parte superior del cromosoma At5 contiene varios genes que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis* (Koornneef *et al.*, 1998). A través del estudio de poblaciones derivadas del cruzamiento de plantas anuales x bienales en *B. rapa* (Teutonico y Osborn, 1995), *B. napus* (Ferreira *et al.*, 1995) y *B. oleracea* (Lan and Paterson 2000) se determinó que el gen *FLC* era el candidato para explicar los QTL encontrados.

Entre las monocotiledóneas, fueron los cereales de invierno los más estudiados en sus requerimientos de vernalización. En ellos se encontró que existe un gen represor, similar a lo encontrado en *Arabidopsis*, que inhibe la floración durante el otoño (Yan *et al.*, 2004). Sin embargo, este represor, llamado *VRN-2* en el caso del trigo diploide, es un tipo de proteína con dedos de zinc no encontrado en el genoma de *Arabidopsis* (Yan *et al.*, 2004). En trigo, el rol del gen *VRN-2* es reprimir la acción del gen *VRN-1* uniéndose a su promotor, mientras que el gen *VNR-1* codifica una proteína MADS-box que promueve la floración (Yan *et al.*, 2003). Los altos niveles de *VNR-2*-ARNm observados al comienzo del tratamiento de vernalización y los bajos niveles al finalizar el tratamiento confirman su función como represor del gen *VNR-1* (Yan *et al.*, 2004).

Los loci relacionados con la vernalización fueron mapeados en varios cereales. Los genes *VRN-Am1* y *VRN-Am2* del trigo diploide fueron localizados en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 5A (Dubcovsky *et al.*, 1998). Luego por mapeo comparativo se determinó la existencia de genes ortólogos al gen *VRN-Am1*: los genes *VRN-A1* y *VRN-D1* del trigo hexaploide, el gen *VRN-H1* de la cebada, el gen *VRN-R1* del centeno (*Secale cereale* L.) y un QTL relacionado con la vernalización en avena (*Avena sativa* L.) (Dubcovsky *et al.*, 1998).

Otros estudios realizados, comparando las variantes alélicas que determinan los distintos hábitos de floración del gen *VRN-1* en trigo diploide (Yan *et al.*, 2003), trigo

poliploide (Yan *et al.*, 2004b, Fu *et al.*, 2005) y cebada (Fu *et al.*, 2005), revelaron asociaciones entre las deleciones encontradas, tanto en el promotor del gen como en el primer intrón, y el hábito de crecimiento primaveral (Fu *et al.*, 2005).

Reeves *et al.* (2007) determinaron mediante estudios filogenéticos y moleculares, que existían genes homólogos al gen *FLC* en algunas especies de los tres principales clados de las dicotiledóneas: remolacha y *Mesembryanthemum crystallinum* del clado Cariofilidas, *Arabidopsis*, Brassicas, soja y álamo del clado Rósidas, y tomate, papa y lechuga del clado Astéridas. Sin embargo, estos genes encontrados presentaban una alta divergencia. Los autores concluyen que la familia de genes *FLC* se originó antes de la diversificación de los tres principales clados de las eudicotiledóneas y por lo tanto se encontraría este tipo de genes en todas las especies incluídas en los mismos.

La zanahoria es una dicotiledónea diploide con 9 pares de cromosomas ($2n=2x=18$). El núcleo haploide contiene aproximadamente 1 pg de ADN y el genoma se estima que tiene 473Mpb, 4 veces más grande que el genoma de *Arabidopsis*, similar tamaño al genoma del arroz, la mitad del tamaño del genoma del tomate y una quinta parte del genoma del maíz. El 40 % del genoma de la zanahoria es altamente repetitivo y contiene altos niveles de variación molecular (revisado por Bradeen y Simon, 2007).

Los cultivares de zanahoria son clasificados en dos grandes grupos: cultivares templados o bienales y cultivares subtropicales o anuales. Ambos grupos se diferencian por sus requerimientos de vernalización, carácter que influye tanto en la producción de raíces como de semillas. En base al estudio de poblaciones segregantes, en el capítulo 2 se determinó que el carácter respuesta a la vernalización en zanahoria está controlado por un gen simple, dominante para la anualidad. Esto es similar a lo encontrado en otras especies vegetales ya estudiadas, siendo entonces probable que se trate de genes ortólogos.

Hipótesis: las regiones cromosómicas que codifican para el carácter requerimientos de vernalización en zanahoria tienen secuencias similares al gen *FLC* ya encontrado en otras especies dicotiledóneas.

Objetivos específicos:

1. Establecer si en el genoma de la zanahoria se encuentra conservada la secuencia del gen *FLC* que codifican para la respuesta a la vernalización en otras especies dicotiledóneas.

2. Determinar si esas secuencias encontradas se relacionan con los requerimientos de vernalización en zanahoria.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.2.1. Material vegetal:

Se trabajó con ADN (ácido desoxirribonucleico) de 125 plantas individuales de una familia F2, cuyos progenitores fueron el material bienal B2 y el material anual Criolla INTA, que segregaba para el carácter requerimientos de vernalización. La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la EEA La Consulta INTA y de la FCA, UNCuyo. Se siguió un protocolo de extracción con CTAB y mercaptoetanol (Briard *et al.*, 2000).

El análisis molecular se realizó, durante tres estadias de investigación, en el Laboratorio de Biología Molecular del Dr. Simon, perteneciente al Departamento de Horticultura de la Universidad de Wisconsin-Madison y a la Unidad de Investigaciones en Cultivos Hortícolas (Vegetable Crops Research Unit), Programa de Genética en Zanahoria y Ajo, del USDA, EE.UU. El primer paso fue cuantificar y evaluar la calidad de cada una de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa y utilización del instrumental “Nanodrop”. Las muestras fueron llevadas a una misma concentración de ADN (ng/ul).

4.2.2. Metodología:

Entre enero y abril de 2006 se realizó la búsqueda de genes relacionados con los requerimientos de vernalización en el banco de genes GenBank del NCBI (www.ncbi.nih.gov/GenBank). En 5 especies vegetales (*Arabidopsis thaliana* L., *Brassica oleracea* L., *Brassica rapa* L., *Raphanus sativus* L. y *Triticum monococcum* L.) se encontraron genes secuenciados relacionados con la vernalización. De las secuencias presentadas en GenBank se seleccionaron las más completas y provenientes de mRNA. Se trabajó con las 4 secuencias pertenecientes al gen *FLC*, por su mayor grado de parentesco entre las especies originarias y la zanahoria (dicotiledóneas). Estas secuencias fueron alineadas mediante el programa ClustalX y de las zonas más conservadas se diseñaron cebadores degenerados específicos. Estos cebadores fueron analizados mediante el programa Oligoanalyzer 3.0 (www.primer3.com) para determinar su temperatura de trabajo y la complementariedad de sus bases. Mediante este análisis se seleccionaron 8 cebadores

que cumplieran con las condiciones requeridas y cubrieran los 7 exones que conforman la secuencia del gen *FLC*.

Fueron diseñados cinco cebadores “forward” (hacia adelante), tres a partir del exón 1 (CebadorF1a: 5’CAAGTYACCTTCTCCAAACG’3; CebadorF1b: 5’GAGAAAGCTCGTCAGCTTTC’3; CebadorF1c: 5’CTTTCTGTTCTCTGYGAYGC’3) y dos a partir del exón 2 (CebadorF2a: 5’GTCAGGATCCTTCATCGATATG’3; CebadorF2b: 5’CATGCTGRTGATCTTAAAGCC’3), y 3 cebadores “reverse” (reversos) a partir del exón 7 (CebadorR7a: 5’GGACCAAGAGAAGAAAGTCG’3; CebadorR7b: 5’AAGAAGAGGTTAGACCGATCG’3; CebadorR7c: 5’TTCATCACCTCTCAATGGC’3). Además, fueron probados dos cebadores diseñados (exón 2 y exón 7) para encontrar múltiples copias del *FLC* en *Brassica rapa* L., nombrados F2d y R7d (ver figura 4.1., extraída de Schranz *et al.*, 2002).

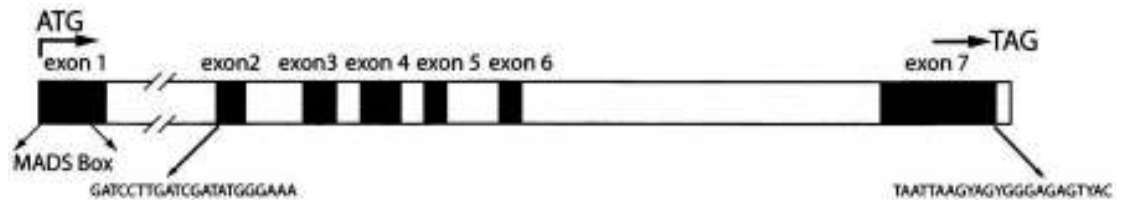


Figura 4.1. Estructura genómica del gen *FLC* de *Arabidopsis thaliana* con las secuencias de los cebadores de exones 2 y 7 utilizados para clonar homólogos del gen en *Brassica rapa*.

Los cebadores fueron probados de a pares en el ADN de 2 individuos de la población segregante, uno anual y otro bienal, mediante reacciones en cadena de polimerasa (PCR). Se utilizó un protocolo básico (Anexo III, III.1), al que se le fue variando la temperatura de templado del cebador. Para cada par de cebadores probados, se realizaron reacciones de PCR con un gradiente de, en promedio, diez temperaturas distintas. Luego se seleccionó la temperatura de trabajo óptima para cada par de cebadores y se realizaron reacciones con más cantidad de individuos de la población.

Los productos o bandas resultantes de las reacciones en cadena de polimerasa fueron cortados de los geles agarosa, limpiados (Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit, MO BIO Laboratorios, Inc.) y secuenciados mediante dos métodos. Método 1: secuenciación directa utilizando los mismos cebadores y posterior electroforesis capilar (Anexo III, III.2). Método 2: ligación de los fragmentos en plásmidos, incorporación de los plásmidos en *E. coli* mediante transformación, reproducción de la bacteria en agar, extracción y

amplificación del fragmento de ADN de interés utilizando cebadores específicos del vector (plásmido pGEM-T), secuenciación del producto obtenido mediante electroforesis capilar (Anexo III, III.3).

Las secuencias obtenidas fueron evaluadas mediante BLAST.

4.3. RESULTADOS

Luego de analizar mediante electroforesis en geles de agarosa los productos de las reacciones de amplificación, se observó que la amplificación con los diversos cebadores fue inconsistente. En varias reacciones no se producía ningún producto, en otras existía amplificación solo en algunos genotipos y el tamaño del fragmento no era el esperado.

Cuando se utilizaron los cebadores F1a y R7a, se observaron productos amplificados en las pruebas con gradientes de temperatura para el templado de los cebadores utilizando ADN de dos plantas de zanahoria, una anual y otra bienal (figura 4.2.). En el mismo se observa bandas amplificadas, de 750 pares de bases, entre las temperaturas 48 y 50°C para ambas plantas evaluadas, aunque en la planta anual las bandas fueron más tenues (figura 4.2.). Sin embargo, cuando se probaron otros genotipos de zanahoria con la temperatura óptima seleccionada no se produjo ningún producto amplificado (figuras 4.3. y 4.4.) o se amplificaron bandas de diferentes tamaños, aunque las diferencias entre bandas observadas no se relacionaron con la anualidad o bienalidad de las plantas utilizadas (figura 4.5.).

Los cebadores F1b, F1c, F2a, F2b, R7b y R7c no produjeron productos de amplificados (figura 4.4.). Al utilizar los cebadores F2d y R2d, se observaron bandas amplificadas de diversos tamaños en algunos de los materiales, aunque nuevamente sin diferencias entre plantas anuales y bienales (figura 4.5.).

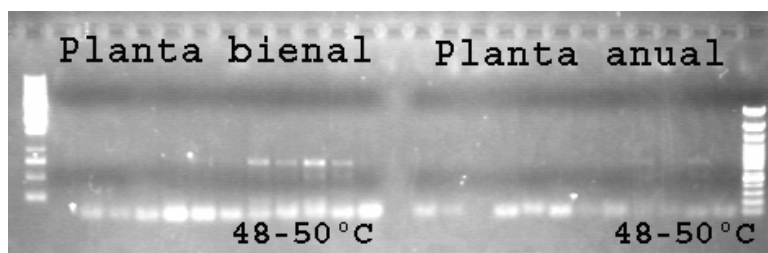


Figura 4.2. Gel de agarosa con las pruebas de gradiente de temperatura de templado de los cebadores F1a y R7a.

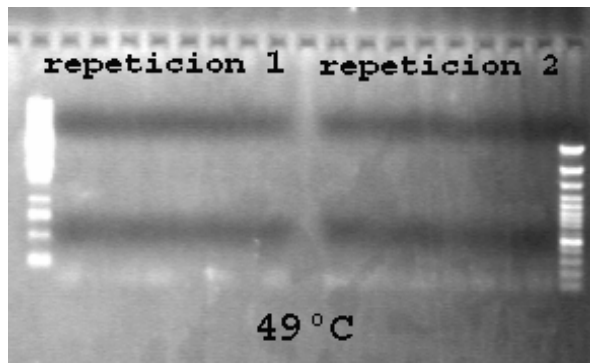


Figura 4.3. Gel de agarosa con los productos resultantes de la amplificación a 49°C con los cebadores F1a y R7a en 8 plantas de zanahorias anuales y bienales, en dos repeticiones.

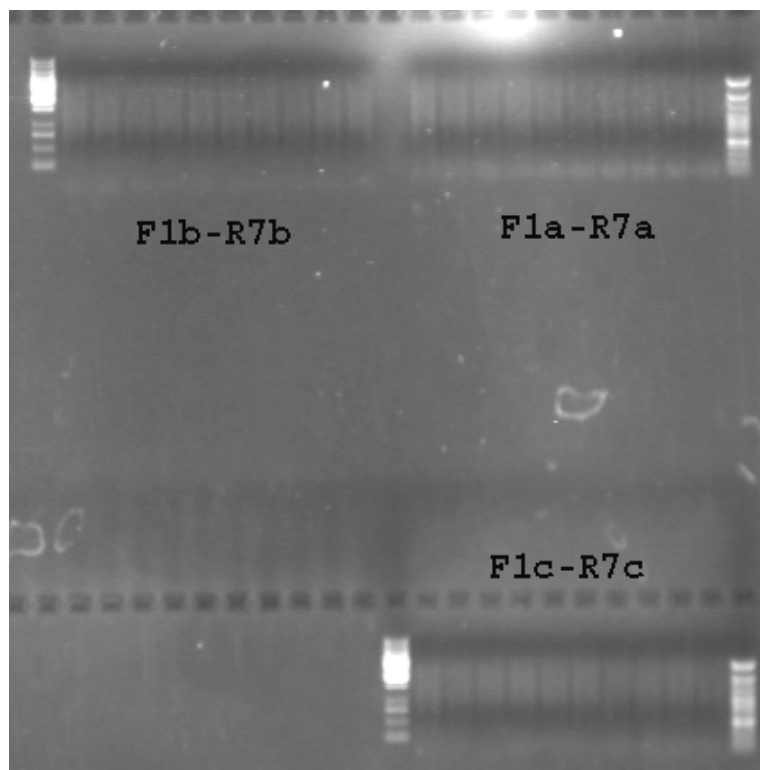


Figura 4.4. Gel de agarosa con los productos de amplificación de 8 genotipos anuales y bienales con los cebadores F1a y R7a, F1b y R7b, y F1c y R7c.

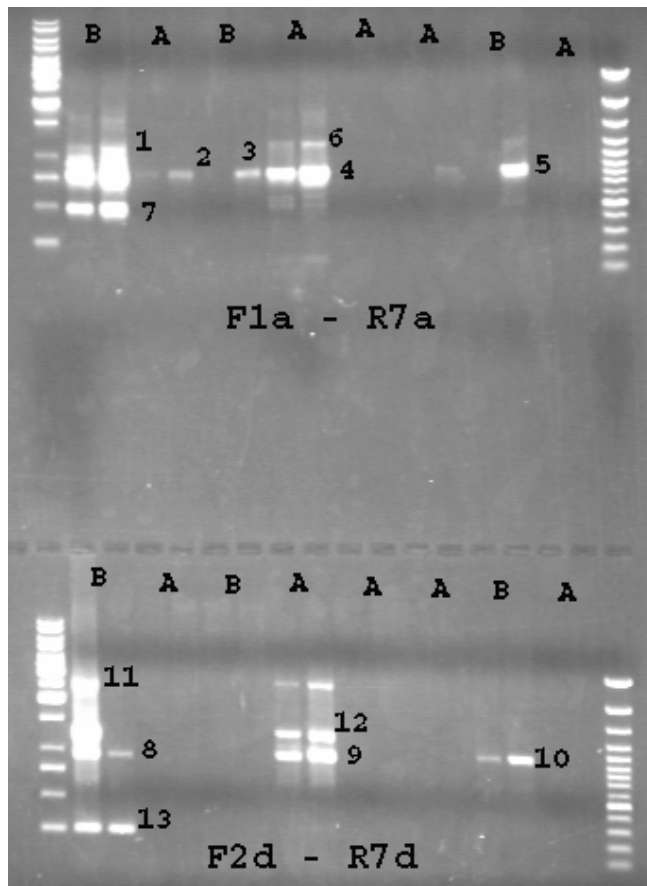


Figura 4.5. Gel de agarosa con los productos de amplificación de los cebadores F1a-R7a con dos temperaturas de templado (48,2 y 49,6°C) y de los cebadores F2d-R7d con dos temperaturas de templado (48,7 y 52°C). Fueron utilizadas 3 plantas bienales (B) y 5 plantas anuales (A). Se observan bandas amplificadas de 500 (Banda 7), 750 (Bandas 1, 2, 3, 4 y 5) y 1000 (Banda 6) pares de bases para F1a-R7a, y bandas de 250 (Banda 13), 1000 (Bandas 8, 9 y 10), 2000 (Banda 12) y 3000 (Banda 11) pares de bases para los cebadores F2d-R7d.

A pesar de la inconsistencia de los resultados, se decidió cortar y secuenciar las bandas amplificadas a partir de los cebadores F1a-R7a y F2d-R7d. En total fueron aisladas y secuenciadas 13 bandas de diversos tamaños (figura 4.5). Una vez obtenida la secuencia de cada una, lo primero que se determinó fue el grado de similitud entre bandas utilizando el programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En las bandas con altos grados de similitud entre sí, solo se presenta la secuencia de ADN y el análisis de BLAST de una de ellas.

Para los cebadores F1a y R7a se encontró alto grado de similitud entre las bandas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (tabla 4.1.). Para los cebadores F2d y R7d se encontró alto grado de similitud entre las bandas 8, 9 y 10 (tabla 4.2.). En la tabla 4.3. se presentan las secuencias correspondientes a las bandas amplificadas 5, 7, 10, 11, 12 y 13.

Tabla 4.1. Grado de similitud entre bandas amplificadas por los cebadores F1a y R7a.

	Banda 5	
	Bases idénticas / Bases totales	Porcentaje coincidencia
Banda 1	725/811	89 %
Banda 2	729/810	90 %
Banda 3	796/802	99 %
Banda 4	695/841	82 %
Banda 6	794/798	99 %

Tabla 4.2. Grado de similitud entre bandas amplificadas por los cebadores F2d y R7d.

	Banda 10	
	Bases idénticas / Bases totales	Porcentaje coincidencia
Banda 8	945/958	98 %
Banda 9	945/956	98 %

Tabla 4.3. Secuencias de bandas amplificadas por los cebadores F1a y R7a (bandas 5 y 7), y por los cebadores F2d y R7d (bandas 10, 11, 12 y 13).

Banda	Secuencia
5	ttagtcaccttctccaaacgcatcaaccaacanttttnatgcaaccgggttcgtaaagttgccagg aaacggagtgaggagtaagttacttgggtcaaccgcagctctgtcttctctaagaagcaaaggt ggaagccttggagacatctgcagcctcatccttgtctttccaaaaggcttggactggaacatgc attaaaacagtcctctggactcattctctctacaggatgatgccattgaaatgaccgacctgccac ggtgccctgtacagagtcaggcactacgctagcactcacgctagtgaagccaaacaaatacac aggttactatgtttactgagtgacagattttcaaaaaccaagttactatgcaagataattttct gatcactctttctttatgatcaggagctacttggcagcgtgcaagtaaacctgcctcacaggc atccggaggacaatttgttctcactaccttgaaccatatacagggaacattggtagtatata caggtacaacgggaagtgtgaatgaacaaagtgaagaaagacaaacaccgagcgatacacatgca cgtgaggagagtgaaacagctctgagtgtagctgaggtgagtgacacactgaccggctctgtt tgaggaacaaatgacaaagctaaaagctgagcttggccggatgatttcgaaaaatgagaaattga aaggtgaacagttagtcacctaggagaagaaacagatgagcagccatatagctcttacagagat gagctgaaagaagagaaccagga
7	ttcaagtcaccttctccaaacggagctgggaatttgaattttaggtgcgtgacagaagtgatggc ttcgattttgtttagaccggggcgccaatgatcacattgtaagaggaaggagtgctgtgacat agaatttgatcatgtggatgacctgggttggggctgtacaaaacgaaccgggaggttaaaggggt cccaggaccgggacaatgctgttcccgaatccgtataagaggtcctcctgtagtcggtcatccg gatgttcccttagttgcatcgggtccatggatgtttgaacaagatgtttgcgtgaggagccgttgt cgactaggatccgtctgacctcattctcggctataccaaggttaccaccagggcctgatttgta ccccgggtgactcctcgaagtccttgcctgctgaaggaaatgacttgttcggggaaggtctgtat ggacattaccttttgacatgagtcgggctgaaagaagagaacaagga
10	tgatccttgatcgatatgggaaagatgcgctcaattcatgcgaagaaagccggccttactcaaca cctttattagtaaggttgccttggtttccactcatgaaagattctatctacaaaagaaggtcaacgg

	<p>gggataactaaaagcaaatggctctcactgacaccatctacgagaaggtgaggtcgtctttcttc cagccgccatacgggtcgccttaaagacggagaaggtgaggagcagttatctatgtaattacggt ctttggtggccggttgccttaagacggagaaggtgaggactctttctttgccaattccgtcttacc gactgacttcttaccacccgcgaaggggtgtgaggctggaccaggtatgaagaatgaatctata tctgtgcacggaagttgctggccggcggcgcctcaactgttcgagcgcggtggtattggttccga ttcgacaaaggtataatgcctggctgggggtccagtagcagtaggttagcagcgtggtcgtttgt tttggcttccgagcgagaaataggcaatgcaccatgcttgctgctacgtacgttgaccttactt gacagattcatccaatttcactcacactcaaaggagggaatacaacttccattgaagcagcttc cccggaactagctgccattgaatcgggttggtgccattgattctcttggaggcagggcaatagatt aagatttggcggtaagcgaaggaactttagggcttagggtagcaggtgagccttatcataaagca taaagggtaggcaacttcaataggtctaggggaggaagaaggagttgttcatagctaagaatcgc taaggccaatcattccctagtctatccnatatctttctatnctagccggatattctctctat tcaagcggataanaaacggcggtnacttgtgcctctcccactactnaaa</p>
11	<p>tattagtttagtgggagaggtaccttccgaggcaattcaganaaatggatcnnaggagatcgc tcatggaattagaggagccctctcctcccaaaaagcctttgacgatacgccttcagaaccaagg gnaancccgcnccagttcgacttctnacttatcaccgagattacccatgcaagtgcggaacacag ggccagctgaggatacnaatcgacgtgcannttacaccgggagtgatggnnagatcntgaanata gggtccaaactaggtncagaggtaaagagcangctgatagaattccttacaantanccttgacgt atgtgcttggagccacgnagacatgggtggggatagaccggcagttatgtgccatcacctgaatg tcnaccctcttaannaaggtgctatacnaaagagaagaccnatcagcggtgaaagagccgagggc ntgcagggaagtgatcgcctcttgnnnncangattgntnaangaatcnttaccnccgnntg gctnnnaaccncgtacttgttaagaaaccnagcgggaagtggcgcacgtgcatanatttcaca natctctgcangcgtgtcctaganacagcttncngntccntcgnantgacnnactantatattc nncggtggnnncgcctcctnngctttatggatgctnctcngatacaatcanatcncatgt ntgagcctgaccaagagcacactnccttcttacggacagggggctatnctgctacattgntatg ccatttgggcttattnacgcangggcgacttncnncntttgggtgaatatgatgtttanggatca nattgggaanaccatggangntacntggatganntgctgntcaatcg</p>
12	<p>tgatccttgatcgatatgggaaagatgcgctcaagcatgccaagaaagccggccttactcaacac ctttattagtaaggtgcttgtttccactcattgaagattctatctacaaaagaaggtcaacggg ggatactaaaagcaaatggctctcactgacaccatctacgagaaggtgaggtcgtctttcttcc agccgccatacgggtcgccttaaagacggagaaggtgaggagcagttatctatgtaattacggtc tttgttggccggttgccttaagacggagaaggtgaggagcagttatctatgtaattacggtc actgacttcttaccacccgcgaaggggtgtgaggctggaccaggtatgaagaatgaatctatat ctgtgcacggaagttgctggccggcggcgcctcaactgttcgagcgcggtggtattggttccgat tcgacaaaaggtataatgcctggctgggggtccagtagcagtaggttagcagcgtggtcgtttgtt ttggcttccgagcgagaaataggcaatgcaccatgcttgctgctacgtacgttgaccttacttg acagattcatccaatttcactcacactcaaaggagggaatacaacttccattgaagcagcttcc ccggaactagctgccattgaatcgggttggtgccattgattctcttggaggcagggcaatagatta agatttggcggtaagcgaaggaactttagggcttagggtagcaggtgagccttatcataaagcat aaagggtaggcaacttcaataggtctagggganagaagaggttgttcatagctaanaatcgc taaggccaatcattccctagtctatcctatataatctctctattctagccgggatattctctctat tcaagcggataanaaacggcggttacttgtacctctcccactacttaata</p>
13	<p>tgatccttgatcgatatgggaagagaattatcttcaatggagtcagatgatttgccttatgtc tcaacaatcattggcaatggtatgttgggatttggccactctaatgacttgttgtgagggaggt gagcaactatgttctcaggtggtcatatagcagatgatgatattctgtgggataatctcagct ccaccaatagcgcacagtgatatttgggatagcattcgtccctctcccactacttaata</p>

Las secuencias presentadas en la tabla 8 fueron analizadas mediante BLAST y se observó que ninguna de ellas presentó homología con genes que codifican para la vernalización en otras especies vegetales (tablas 4.4., 4.5., 4.6., 4.7., 4.8. y 4.9.).

Tabla 4.4. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 5.

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
FJ148714.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C154P02 genomic sequence	806	806	97%	0.0	85%
FJ149520.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C234M06 genomic sequence	765	765	75%	0.0	89%
FJ149448.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C160G04 genomic sequence	606	606	65%	5e- 170	87%
FJ150302.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C034A06 genomic sequence	383	383	46%	9e- 103	85%
FJ149298.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C019C12 genomic sequence	377	377	47%	4e- 101	84%
FJ150363.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C103A15 genomic sequence	268	268	30%	3e-68	86%
FJ150148.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C122A04 genomic sequence	220	220	34%	7e-54	81%
FJ148029.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C145C04 genomic sequence	215	215	27%	3e-52	84%
FJ149483.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C160M02 genomic sequence	209	209	29%	2e-50	82%
FJ150087.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C100E12 genomic sequence	84.2	84.2	7%	1e-12	93%
FJ150045.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C079A12 genomic sequence	84.2	84.2	7%	1e-12	93%

Tabla 4.5. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 7.

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
FJ148827.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C044E04 genomic sequence	421	421	84%	2e-114	81%
XM_001660764.1	<i>Aedes aegypti</i> camp-dependent rap1 guanine-nucleotide exchange factor partial mRNA	46.4	46.4	10%	0.15	80%
CP001619.1	<i>Dyadobacter fermentans</i> DSM 18053, complete genome	42.8	42.8	5%	1.8	92%
XM_002263107.1	PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein LOC100256085 (LOC100256085), mRNA	42.8	42.8	4%	1.8	100%
AM425225.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X043668.11, whole genome shotgun sequence	42.8	42.8	4%	1.8	100%
AM488415.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X260316.6, whole genome shotgun sequence	42.8	42.8	6%	1.8	88%
XM_002590540.1	<i>Branchiostoma floridae</i> hypothetical protein, mRNA	41.0	41.0	4%	6.3	100%
XM_001299158.1	<i>Trichomonas vaginalis</i> G3glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylases family protein (TVAG_509780)	41.0	41.0	5%	6.3	90%
XM_001094650.1	PREDICTED: <i>Macaca mulatta</i> nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 (NFE2L3), mRNA	41.0	41.0	6%	6.3	90%
BX897667.19	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-278K1 in linkage group 13 Contains three CpG islands, complete sequence	41.0	41.0	4%	6.3	96%
CR854915.21	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-4G13 in linkage group 13, complete sequence	41.0	41.0	4%	6.3	96%

Tabla 4.6. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 10.

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
EU431224.1	<i>Carica papaya</i> mitochondrion, complete genome	754	754	60%	0.0	90%
BA000042.1	<i>Nicotiana tabacum</i> mitochondrial DNA, complete genome	736	736	60%	0.0	89%
AM183222.2	<i>Helianthus annuus</i> mitochondrial ccb206 gene for cytochrome c biogenesis protein and tRNA-Lys gene for transfer RNA-Lys	730	730	64%	0.0	88%
GQ220325.1	<i>Vitis vinifera</i> strain PN40024 mitochondrion, partial genome	686	686	54%	0.0	90%
FM179380.1	<i>Vitis vinifera</i> complete mitochondrial genome, cultivar Pinot noir clone ENTAV115	686	686	54%	0.0	90%
AJ630374.1	<i>Cicer arietinum</i> partial mitochondrial tRNA-Lys gene	640	640	58%	6e-180	87%
BA000009.3	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> mitochondrial DNA, complete genome	542	542	57%	2e-150	84%
BA000024.1	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> mitochondrial DNA, complete genome	542	1084	57%	2e-150	84%
AC145156.6.1	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-7h6, complete sequence	255	255	20%	2e-64	90%
EU365401.1	<i>Bambusa oldhamii</i> mitochondrion, complete genome	213	213	15%	1e-51	93%
EU534409.1	<i>Triticum aestivum</i> cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome	213	213	15%	1e-51	93%
AP008982.1	<i>Triticum aestivum</i> mitochondrial DNA, complete genome	213	213	15%	1e-51	93%
CU302231.4	<i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-291F9, complete sequence	174	174	28%	7e-40	79%

Tabla 4.7. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 11.

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
FJ148114.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C004G11 genomic sequence	504	504	46%	4e-139	86%
FJ148113.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C004E11 genomic sequence	495	495	44%	2e-136	86%
FJ148111.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C004A11 genomic sequence	471	471	44%	2e-129	86%
FJ150178.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C004G09 genomic sequence	405	405	37%	3e-109	86%
FJ147957.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C126H04 genomic sequence	140	140	25%	2e-29	70%
FJ148001.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C144G06 genomic sequence	138	138	50%	6e-29	65%
AC083835.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 1 BAC F2G19 genomic sequence, complete sequence	89.7	89.7	24%	3e-14	67%
AY854261.1	<i>Primula vulgaris</i> S-locus genomic sequence	89.7	89.7	15%	3e-14	72%
AC006067.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 2 clone T13P21 map mi398, complete sequence	78.8	78.8	24%	5e-11	65%
AB073155.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA, chromosome 4 centromere region, BAC clone:F19O5	78.8	78.8	24%	5e-11	65%
AB046434.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA, chromosome 5 centromere region, clone:F28L21	78.8	78.8	24%	5e-11	65%
AF296829.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> BAC F3D18	78.8	78.8	24%	5e-11	65%
AC018928.1	Genomic Sequence For <i>Arabidopsis thaliana</i> Clone F23C08, Chromosome V, complete sequence	78.8	78.8	24%	5e-11	65%
AB046439.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA, chromosome 5 centromere region, clone:F26J23	75.2	75.2	24%	6e-10	65%

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
AC051625.6	Genomic Sequence For <i>Arabidopsis thaliana</i> Clone F19N02 From Chromosome V, complete sequence	75.2	75.2	24%	6e-10	65%
AB073166.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA, chromosome 4 centromere region, BAC clone:F15N16	73.4	73.4	24%	2e-09	65%
AL161505.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA chromosome 4, contig fragment No. 17	73.4	73.4	24%	2e-09	65%
AF147260.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> BAC F14G16	73.4	73.4	24%	2e-09	65%
AC007209.6	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 2 clone F14O4 map PR1, complete sequence	68.0	68.0	24%	8e-08	64%
AC006920.11	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 2 clone F26H6 map mi398, complete sequence	64.4	64.4	41%	1e-06	61%
FJ148694.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> clone BAC C003D02 genomic sequence	60.8	60.8	7%	1e-05	79%

Tabla 4.8. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 12.

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
AM183222.2	<i>Helianthus annuus</i> mitochondrial ccb206 gene for cytochrome c biogenesis protein and tRNA-Lys gene for transfer RNA-Lys	810	810	63%	0.0	87%
EU431224.1	<i>Carica papaya</i> mitochondrion, complete genome	800	853	64%	0.0	94%
BA000042.1	<i>Nicotiana tabacum</i> mitochondrial DNA, complete genome	796	844	64%	0.0	100%
GQ220325.1	<i>Vitis vinifera</i> strain PN40024 mitochondrion, partial genome	733	908	66%	0.0	97%
FM179380.1	<i>Vitis vinifera</i> complete mitochondrial genome, cultivar Pinot noir clone ENTAV115	733	1010	66%	0.0	97%

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
AJ630374.1	<i>Cicer arietinum</i> partial mitochondrial tRNA-Lys gene	722	722	60%	0.0	86%
BA000024.1	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> mitochondrial DNA, complete genome	630	1261	59%	4e-177	83%
BA000009.3	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> mitochondrial DNA, complete genome	625	625	59%	2e-175	82%
AC145156.61	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-7h6, complete sequence	271	271	21%	4e-69	88%
CU302231.4	<i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-291F9, complete sequence	223	435	28%	2e-54	78%
EU365401.1	<i>Bambusa oldhamii</i> mitochondrion, complete genome	217	314	25%	8e-53	93%
EU534409.1	<i>Triticum aestivum</i> cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome	217	492	25%	8e-53	94%
AP008982.1	<i>Triticum aestivum</i> mitochondrial DNA, complete genome	217	492	25%	8e-53	94%
AM447695.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X229092.5, whole genome shotgun sequence	194	194	22%	9e-46	79%
AM458642.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X079658.2, whole genome shotgun sequence	176	176	20%	2e-40	76%
AM474475.1	<i>Vitis vinifera</i> , whole genome shotgun sequence, contig VV78X103295.6, clone ENTAV 115	102	102	7%	4e-18	87%
BA000029.3	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group mitochondrial DNA, complete genome	96.9	96.9	10%	2e-16	80%

Tabla 4.9. Secuencias que producen alineamientos significativos con la banda 13.

Accesión	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Cobertura secuencia	Valor E	Similitud
FJ222554.1	Iridovirus barramundi/Quang Ninh/VNM/2008 laminin-like protein gene, partial cds	44.6	44.6	15%	0.25	87%
AY989904.1	Dwarf gourami iridovirus unknown gene	44.6	44.6	15%	0.25	87%
AF371960.1	Infectious spleen and kidney necrosis virus, complete genome	44.6	44.6	15%	0.25	87%
AY936206.1	Murray cod iridovirus IRB6 amplicon, partial sequence	44.6	44.6	15%	0.25	87%
AC069548.6	<i>Homo sapiens</i> chromosome 10 clone RP11-522H2, complete sequence	44.6	44.6	13%	0.25	88%
AY059399.1	Grouper iridovirus 1F-2R amplicon, complete sequence	44.6	44.6	15%	0.25	87%
FM178379.1	<i>Aliivibrio salmonicida</i> LFI1238 chromosome 1 complete genome	41.0	41.0	10%	3.0	92%
AC189857.1	<i>Pongo abelii</i> chromosome UNK clone CH276-2H12, complete sequence	41.0	41.0	14%	3.0	84%
AL353633.13	Human DNA sequence from clone RP11-452B18 on chromosome 13 Contains a novel pseudogene and a novel gene, complete sequence	41.0	41.0	10%	3.0	92%

4.4. DISCUSIÓN

A pesar de que la zanahoria pertenece al clado Astéridas, uno de los tres clados de la dicotiledóneas citados por Reeves *et al.* (2007) en los que se encontraron genes *FLC*, no se encontró en la misma el gen *FLC* a través del método de BLAST. La inconsistencia de los resultados obtenidos podría atribuirse a lo enunciado por Reeves *et al.* (2007) sobre la alta divergencia encontrada en los genes *FLC* presentes en las distintas especies vegetales dicotiledóneas. Estos autores argumentan que la alta divergencia encontrada explicaría los intentos fallidos de encontrar el gen *FLC* fuera de la familia *Brassicaceae* por métodos que se basan en una similitud completa, como BLAST o “Southern Hidridization”.

La alta divergencia del *FLC* se explicaría porque los genes del tipo *FLC* en *Arabidopsis sp* han evolucionado bajo una selección Darwiniana positiva, a diferencia de la mayoría de los reguladores MADS-box. Esto permitió una rápida divergencia entre ortólogos, a través de la acumulación de duplicaciones y mutaciones, y una desviación en la uniformidad de las secuencias entre linajes de genes (Martínez-Castilla y Alvarez-Buylla, 2003).

Por lo mencionado anteriormente la búsqueda del gen *FLC* en el genoma de la zanahoria debería realizarse a través de otros métodos moleculares como el análisis de secuencias EST (expressed sequence tag) de zanahoria con una secuencia consenso de la unidad MADS-box y confirmando luego, si se encontrara algún EST candidato, que esa secuencia tuviera relación con el tiempo de floración en zanahoria a través del diseño de cebadores y análisis del ARN de plantas anuales y bienales. En remolacha se realizó este procedimiento encontrándose un gen homólogo al *FLC* que fue llamado *BvFL1* (Reeves *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se compararon los ARN de plantas anuales y bienales se observó que los niveles de *BvFL1* mRNA eran similares en ambos grupos, y además el gen *BvFL1* fue mapeado en el cromosoma 6 de la remolacha mientras que el *bolting gene B*, responsable de la diferencia entre plantas anuales y bienales, había sido mapeado en el cromosoma 2 (Boudry *et al.*, 1994; Reeves *et al.*, 2007). Los autores concluyen que el gen *B* estaría fuera de la ruta metabólica de la vernalización y estaría relacionado con una pérdida de función por mutación (*bb*) en la ruta metabólica del fotoperíodo, habiendo evolucionado el requerimiento de vernalización en plantas bienales (*bb*) como la única ruta metabólica para florecer por la incapacidad de estas plantas de sensor los días largos (Reeves *et al.*, 2007).

Los componentes mayores de la respuesta al fotoperíodo aparecen conservados entre *Arabidopsis* y el arroz (Hayama y Coupland, 2004). Esto indica que la sensibilidad al fotoperíodo evolucionó antes que los mayores grupos de plantas con flores (dicotiledóneas y monocotiledóneas) divergieran. Sin embargo, estos grupos de plantas podrían haber evolucionado en un clima cálido, en el cual la respuesta a la vernalización no era necesaria. Si esto fuera así, la respuesta a la vernalización se habría desarrollado de manera independiente en los distintos grupos de plantas de acuerdo a la regulación de la floración que debían realizar durante el invierno en las distintas regiones que fueron evolucionando (Amasino, 2004). En trigo y otros cereales de invierno no se han encontrado genes homólogos al *FLC* de *Arabidopsis* (Amasino, 2004; Reeves *et al.*, 2007). Por lo tanto, los

roles similares que cumplen *FLC* y *VRN2* en trigo son un ejemplo de la evolución convergente entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Amasino, 2004).

El tiempo de floración es un carácter de importancia ecológica y evolutiva. De hecho, la evolución de diferentes tiempos de floración basados en mecanismos genéticos ha sido citado como un mecanismo de especiación muy importante, a través del aislamiento reproductivo por fenologías florales divergentes (Coyne y Orr, 2004). Entender los mecanismos moleculares que contribuyen a determinar el tiempo de floración en diversas especies también podría contribuir a entender algunas bases genéticas de la especiación en vegetales.

La evidente complejidad y variabilidad en el mecanismo de respuesta a la vernalización resalta la importancia de estudiar el proceso en cada especie de interés en particular, más allá de las posibles comparaciones que se puedan realizar entre especies. Para ello la evaluación de poblaciones segregantes, el mapeo físico de genes y el estudio de la expresión de los mismos, resultan metodologías muy importantes para comprender el proceso de vernalización desde el punto de vista genético y molecular en una especie determinada.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- AMASINO, R. M. 2004. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell* 2004, 16: 2553-2559.
- BOUDRY, P., R.WIEBER, P. SAUMITOU-LAPRADE, K. PILLEN, H. VAN DIJK y C. JUNG. 1994. Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene B and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 852–858.
- BRADEEN, J. M. y P. W. SIMON. 2007. Carrot. En: *Genome mapping and molecular breeding in plants*, Vol. 5 Vegetables, Capítulo 4. C. Kole (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- BRIARD, M.; V. LE CLERC, D. GRZEBELUS, D. SENALIK y P.W. SIMON. 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 235-241.
- CAMARGO, L.E.A. y T.C. OSBORN. 1996. Mapping loci controlling flowering time in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 92:610-616.
- CLARKE, J.H. y C. DEAN. 1994. Mapping FRI, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 81-89.
- COYNE, J. A., y H. A. ORR. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- COUPLAND, G. 1995. Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 20:785-789.
- DUBCOVSKY, J., D. LIJAVETZKY, L. APPENDINO y G. TRANQUILLI. 1998. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor Appl Gen* 97:968-975
- FERREIRA, M.E., J. SATAGOPAN, B.S. YANDELL, P.H. WILLIAMS y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 90:727-732
- FU D., P. SZIICS, L. YAN, M. HELHUERA, J.S. SKINNER, J.V. ZITZEWITZ, P.M. HAYES y J. DUBCOVSKY. 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Gen Genomics* 273: 54–65.
- HAYAMA, R. y G. COUPLAND. 2004. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 135: 677-684.
- KOCH, M.A., B. HAUBOLD, T. MITCHELL-OLDS. 2000. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis* and related genera (*Brassicaceae*). *Mol Biol Evol* 17:1483-1498.
- KOORNNEEF, M., C. ALONSO-BLANCO, A.J.M. PEETERS y W. SOPPE. 1998. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49:345-370.
- LAGERCRANTZ, U., J. PUTTERILL, G. COUPLAND y D. LYDIATE. 1996. Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time. *Plant J.* 9:13-20.

- LAN, T.H. y A.H. PATERSON. 2000. Comparative mapping of quantitative trait loci sculpting the curd of *Brassica oleracea*. *Genetics* 155:1927-1954.
- LEE, I. y R. M. AMASINO. 1995. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the *FRIGIDA* gene. *Plant Physiol.* 108, 157-162.
- MARTINEZ-CASTILLA, L. P. y E. R. ALVAREZ-BUYLLA. 2003. Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 13407–13412.
- MARTINEZ-ZAPATER, J. M., G. COUPLAND, C. DEAN y M. KOORNNEEF. 1994. The transition to flowering in *Arabidopsis*. En: Arabidopsis, E. M. Meyerowitz y C. R. Somerville (eds.). Cold spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- MICHAELS, S. D. y R. M. AMASINO. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11:949-956.
- OSBORN, T.C., C. KOLE, I.A.P. PARKIN, A.G. SHARPE, M. KUIPER, D. J. LYDIATE y M. TRICK. 1997. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146:1123-1129
- REEVES, P. A.; Y. HE; R. J. SCHMITZ; R. M. AMASINO; L. W. PANELLA y C. M. RICHARDS. 2007. Evolutionary conservation of the FLOWERING LOCUS C-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* 176:295-307.
- SCHRANZ, M.E., P. QUIJADA, S-B. SUNG, L. LUKENS, R. AMASINO y T.C. OSBORN. 2002. Characterization and effects of the replicated flowering time gene FLC in *Brassica rapa*. *Genetics* 162:1457-1468
- TEUTONICO R.A. y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 91:1279-1283
- YAN L., A. LOUKOIANOV, G. TRANQUILI, M. HELGUERA, T. FAHIMA y J. DUBCOVSKY. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization VRN1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 6263-6268.
- YAN L., A. LOUKOIANOV, A. BLENCHL, G. TRANQUILI, W. RAMAKRISHNA, P. SANMIGUEL, J.L. BENNETZEN, V. ECHENIQUE y J. DUBCOVSKY. 2004a. The Wheat VRN2 Gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, vol. 303: 1640-1644.
- YAN L., M. HELGUERA, S. FUKUYAMA, J. SHERMAN y J. DUBCOVSKY. 2004b. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet* 109: 1677-1686

CAPÍTULO 5

IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS QUE CODIFICAN PARA EL CARÁCTER REQUERIMIENTO DE VERNALIZACIÓN EN ZANAHORIA: EMPLEO DE UN MAPA DE LIGAMIENTO.

5.1. INTRODUCCIÓN

Una de las maneras de localizar genes en el genoma es a través de la construcción de mapas genéticos o de ligamiento. Para ello es necesario trabajar con poblaciones segregantes, tales como F₂, Retrocruzas, Dobles haploides o RILs, para el o los genes de interés. Un mapa genético consiste en el ordenamiento secuencial de marcadores (morfológicos, bioquímicos o moleculares) en los cromosomas de un individuo. Para ello debe estimarse primero la frecuencia de recombinación entre pares de marcadores, luego agrupar los marcadores en grupos de ligamiento y posteriormente estimar su orden en cada grupo. Una vez identificados los marcadores que rodean al gen de interés, se procede a la secuenciación de la región existente entre ambos marcadores a través de la utilización de mapas físicos obtenidos por bandeamiento cromosómico e hibridación *in situ*.

En términos generales, los marcadores para la construcción de mapas pueden ser divididos en dos categorías: marcadores bioquímicos, como las isoenzimas, y marcadores moleculares, basados en el ADN. Las isoenzimas reflejan las mutaciones acumuladas en los loci que las codifican a través de la modificación en la movilidad de la proteína en geles de poliacrilamida. Los datos generados por este tipo de marcador son en general codominantes, permitiendo la diferenciación entre individuos heterocigotas y homocigotas para cada clase parental. La utilidad de las isoenzimas para la construcción de mapas de ligamiento está limitada por la cantidad de loci que pueden ser analizados sin ambigüedad.

Los marcadores moleculares detectan polimorfismos a nivel de ADN y su cantidad sería casi ilimitada. Existen diversos tipos de marcadores moleculares. La técnica de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), descrita por primera vez por Botstein *et al.* (1980), se basa en la hibridación de ADN con ADN, detectando variaciones en una secuencia de ADN a través de la especificidad de las enzimas de restricción. Los marcadores RFLP presentan como ventaja el ser codominantes y como desventaja que es un método que consume mucho tiempo y es relativamente caro.

La técnica de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), descrita por Williams *et al.* (1990), consiste en la amplificación de fragmentos de ADN, mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores cortos (10 pares de bases). Cada cebador puede amplificar simultáneamente entre 1 y 10 sitios genómicos diferentes, y el tamaño de los fragmentos puede estar entre 0,5 y 5 kilobases. Los RAPD detectan polimorfismos causados por cambios en bases nucleotídicas, inserciones o deleciones. Las ventajas de esta técnica son su simplicidad y bajo costo. Además, no se

necesita información molecular previa de la especie a estudiar, ya que existen numerosos cebadores desarrollados de uso general para todas las especies y disponibles comercialmente. Por tratarse de una técnica de PCR, poca cantidad de ADN es necesaria para su funcionamiento. Como desventajas se presentan su baja reproducibilidad y que son marcadores dominantes.

La técnica de microsatélites o SSR (“Simple Sequence Repeats”) se basa en secuencias de nucleótidos repetidas (di o trinucleótidos) que se encuentran en abundancia en el genoma. Por la técnica de PCR se amplifican estas secuencias repetidas utilizando cebadores diseñados a partir de secuencias conservadas que las rodean. Los polimorfismos detectados por esta técnica son los causados por la variación en el número de repeticiones. La principal ventaja de este tipo de marcadores es que son del tipo codominante. La desventaja es que se debe invertir mucho tiempo y dinero en desarrollarlos.

La técnica de AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”), informada por primera vez por Vos *et al.* (1995), consiste en la digestión del ADN con enzimas de restricción específicas, luego la ligación de adaptadores (oligonucleótidos) en los extremos de los fragmentos cortados, una preamplificación de los fragmentos resultantes con cebadores complementarios a los adaptadores y a los sitios de restricción, y una amplificación con pares de cebadores selectivos. Los fragmentos de ADN resultantes pueden ser leídos mediante la marcación con radioisótopos, colorantes fluorescentes o tinción de plata. La separación de los fragmentos se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (fragmentos radioactivos y tinción de plata) o electroforesis capilar (fluorescencia). La presencia o ausencia de fragmentos de ADN en los distintos individuos es la que determina si existen diferencias o no a nivel de nucleótidos entre ellos, ya sea por cambios de bases, inserciones o deleciones. La principal ventaja de esta técnica consiste en la gran cantidad de información (fragmentos amplificados polimórficos) que se puede obtener sin necesidad de tener información molecular previa. Como desventajas se presentan la laboriosidad de la técnica, el trabajar con radioactividad y que se obtienen marcadores del tipo dominante.

La técnica de SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”) consiste en la amplificación de ADN mediante PCR utilizando cebadores diseñados a partir de fragmentos de interés (ligados a algún carácter) resultantes de las técnicas de RAPD o AFLP. La ventajas de esta técnica son su simplicidad y especificidad, pudiéndose obtener a

veces marcadores codominantes. Su desventaja es el trabajo previo necesario para desarrollarlos.

El primer mapa de ligamiento realizado en zanahoria, como en muchas otras especies, fue con isoenzimas (Westphal y Wricke, 1991). Los autores trabajaron con poblaciones de retrocruzas y analizaron 10 diferentes sistemas de isoenzimas, asignando 12 loci en 4 grupos de ligamientos (Westphal y Wricke, 1991). Más tarde, Schulz *et al.* (1993) combinaron marcadores RFLP, RAPD e isoenzimas en la construcción de un mapa. Trabajaron con 4 poblaciones S1 de 70 individuos cada una, mapeando 10 isoenzimas, 14 RFLP y 28 RAPD. Además, utilizaron 6 fragmentos de RAPD que resultaron monomórficos en las poblaciones para diseñar nuevos RFLP, llevando el total de marcadores a 58. Este mapa estuvo compuesto por 8 grupos de ligamiento con entre 2 y 9 marcadores cada uno y con largos que variaron entre 1,7 cM (centimorgan) y 78,6 cM. Posteriormente, Westphal y Wricke (1997), usando las mismas poblaciones, expandieron el mapa a 200 marcadores incluyendo AFLP y microsatélites. Este mapa final estuvo compuesto por nueve grupos de ligamiento.

Vivek y Simon (1999) informaron sobre un mapa de ligamiento compuesto por 106 marcadores, 96 de los cuales fueron AFLP, 6 RFLP, dos RAPD y dos microsatélites. La población mapeada fue una F₂ compuesta por 103 individuos y definieron, utilizando un LOD de 4.0, 11 grupos de ligamiento cada uno con 15 marcadores aproximadamente y luego 17 marcadores más en grupos de dos o tres. El tamaño total del mapa fue de 524,1 cM con una distancia entre marcadores a proximada de 4,9 cM. Estos autores estimaron que el tamaño total del genoma de la zanahoria sería 900 cM (Vivek y Simon, 1999).

Los mapas genéticos más recientes en zanahoria fueron contruidos combinando los datos moleculares de dos poblaciones F₂ independientes (Santos y Simon, 2004). Se utilizaron 277 y 242 marcadores dominantes, del tipo AFLP, de cada población, y 10 y 8 marcadores codominantes. La fusión de 6 de los 9 grupos de ligamiento permitió llegar a una distancia entre marcadores de 3,75 cM y a una cobertura total de 910 cM y 933 cM en cada una de las poblaciones F₂ (Santos y Simon, 2004).

Hasta el momento, utilizando la técnica de mapeo, fueron localizados en el genoma de la zanahoria siete caracteres monogénicos: *yel*, *cola*, *Rs*, *Mj-1*, *Y*, *Y₂* y *P₁* (Simon *et al.*, 2008) y varios QTL (“quantitative trait loci”) relacionados con la ruta metabólica de los carotenoides (Santos y Simon, 2002; Just *et al.*, 2007). La localización del gen que controla los requerimientos de vernalización en zanahoria será de suma utilidad para futuros

estudios moleculares del carácter, así como para la selección asistida por marcadores en mejoramiento genético.

Hipótesis: es posible localizar una región cromosómica ligada al carácter requerimiento de vernalización en zanahoria.

Objetivo general: localizar en el genoma de la zanahoria la región cromosómica que determina los requerimientos de vernalización.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.2.1. Material vegetal:

Se trabajó con ADN (ácido desoxirribonucleico) de 125 plantas individuales de una familia F₂ segregante para el carácter requerimiento de vernalización, obtenida a partir de la autofecundación de una planta F₁, proveniente del cruzamiento entre el material bienal B2 y el material anual Criolla INTA. Además, la familia segregaba para el carácter restauración de la fertilidad. La evaluación de la población se realizó a campo en la EEA La Consulta INTA. La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la EEA La Consulta INTA y de la FCA, UNCuyo. Se siguió un protocolo de extracción con CTAB y mercaptoetanol (Briard *et al.*, 2000).

5.2.2. Metodología:

El análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Dr. Simon, perteneciente al Departamento de Horticultura de la Universidad de Wisconsin-Madison y a la Unidad de Investigaciones en Cultivos Hortícolas (Vegetable Crops Research Unit), Programa de Genética en Zanahoria y Ajo, del USDA, EE.UU. El primer paso fue cuantificar y evaluar la calidad de cada una de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa y utilización del instrumental “Nanodrop”. Las muestras fueron llevadas a una misma concentración de ADN (ng/ul).

Durante las estadias de investigación de 2007 y 2008, la población segregante fue sometida a un análisis con marcadores moleculares. Al no disponer del ADN de los progenitores de la población, solo se trabajó con individuos F₂. Por lo tanto, con una parte de los individuos (8 – 16) fueron evaluados 304 marcadores microsatélites, 6 marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) y 193 marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Para ello se realizaron reacciones en cadena de polimerasa (PCR) y comparación en geles de agarosa de los productos obtenidos con cada uno de los

marcadores. En los marcadores donde se observaron patrones de segregación polimórfica se realizaron reacciones en cadena de polimerasa en el total de la población.

Los marcadores microsatélites utilizados fueron desarrollados en el Laboratorio de Biología Molecular del Dr. Simon (Departamento de Horticultura de la Universidad de Wisconsin-Madison y USDA, EEUU) (Cavagnaro *et al.*, 2009). Para evaluarlos se utilizó un protocolo básico (Anexo III, III.4) al que se le fue variando la temperatura de templado del cebador y el tiempo de electroforesis utilizado para separar las bandas. Se probaron en la población 6 marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region): Y2, Q1/800, Q1/800Flanking, Q6-500, Scar-AFLP3 del GGTCTT 471-4/H y PSY1. En este caso, para cada marcador se utilizó un protocolo específico (Anexo III, III.5). Fueron evaluados 193 marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pertenecientes a las series de cebadores desarrollados por OPERON y University of British Columbia. El listado de los cebadores evaluados y el protocolo utilizado se encuentran en el Anexo III (III.6 y III.7).

En la técnica de AFLP se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y MseI para digerir el ADN, luego se realizó la ligación de adaptadores (oligonucleótidos) en los extremos de los fragmentos cortados y una preamplificación de los fragmentos resultantes con cebadores complementarios a los adaptadores y a los sitios de restricción. Posteriormente se realizaron amplificaciones con 19 pares de cebadores selectivos. Los fragmentos de ADN resultantes fueron leídos mediante la marcación con radioisótopos y electroforesis en geles de poliacrilamida. El protocolo completo de la técnica de AFLP, así como los cebadores utilizados se encuentran detallados en el Anexo III (III.8 y III.9).

Los datos obtenidos a partir de los geles de agarosa y poliacrilamida fueron pasados a planillas de cálculo mediante interpretación visual (“1”= presencia de banda, “0”= ausencia de banda y “.”= dudoso) y luego fueron traducidos a letras (“A”= ausencia, “C”= presencia, “.”= dudoso). En un principio todos los marcadores fueron considerados como dominantes y provenientes de un mismo padre. Los marcadores codominantes fueron analizados como dos marcadores dominantes e identificados con letras (ejemplo: gssr46A y gssr46B). Para cada marcador polimórfico se comparó la segregación de bandas observada (presencia/ausencia) con la esperada para una familia F2 (3:1) mediante la prueba de χ^2 . Los datos moleculares, que presentaban un patrón de segregación cercano al esperado, fueron correlacionados con los datos fenotípicos tomados a campo sobre respuesta a la vernalización y restauración de la fertilidad mediante el programa “Joinmap

3.0” (Van Ooijen y Voorrips, 2001) que permite la construcción del mapa de ligamiento y la identificación de las regiones cromosómicas de interés. Se utilizó la función de mapeo de Kosambi y se consideró un LOD mínimo de 4.0 para la construcción de los grupos de ligamiento.

En una primera aproximación se obtuvieron pares de grupos de ligamiento que fueron identificados en base a los marcadores codominantes. Luego dentro de cada par se reasignaron las letras correspondientes a los marcadores en base a la dominancia de cada padre (“C”= dominancia padre B / “A”= ausencia banda; “D”= dominancia del padre A / “B”= ausencia banda), y los marcadores codominantes fueron analizados como tales (“A”= presencia de A o ausencia banda B / “B”= presencia de B o ausencia banda A / “H”= heterocigoto). Cada par de grupos con su nueva asignación de letras fue analizado por separado con el programa “Joinmap 3.0” para confirmar si pertenecían a un mismo grupo de ligamiento y posteriormente los datos en su totalidad fueron analizados en conjunto para la conformación final de los grupos de ligamiento.

5.3. RESULTADOS

De los 304 marcadores microsatélites evaluados, 19 resultaron codominantes y 5 dominantes, ajustándose sus frecuencias de presencia/ausencia de banda a los patrones de segregación 3:1 esperados para una F_2 (tabla 5.1.). Los marcadores con valores de χ^2 mayores a 12 fueron descartados para la construcción del mapa de ligamiento. En las figuras 5.1., 5.2. y 5.3. se observan los productos amplificados, en una parte de los individuos de la población F_2 , con 3 marcadores microsatélites codominantes, mientras que en la figura 5.4. se observan los productos de amplificación con un marcador microsatélite que fue considerado dominante.

Tabla 5.1. Valores observados en los productos de amplificación de cada marcador microsatélite en la población F2. Análisis del ajuste a los patrones de segregación esperados, 3:1 para una F₂, mediante los valores de chi-cuadrado (χ^2) y significancia.

Locus	a	h	b	c	d	-	X2	GL	Significancia	Clases
*GSSR3S	39	0	0	82	0	5	3.4	1	*	[a:h+b+c]
*GSSR3L	47	0	0	69	0	10	14.9	1	*****	[a:h+b+c]
*GSSR6A	26	0	0	96	0	4	0.9	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR6B	20	0	0	102	0	4	4.8	1	**	[a:h+b+c]
*GSSR14A	38	0	0	80	0	8	3.3	1	*	[a:h+b+c]
*GSSR14B	24	0	0	94	0	8	1.4	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR19A	14	0	0	107	0	5	11.6	1	*****	[a:h+b+c]
*GSSR19B	28	0	0	93	0	5	0.2	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR20A	22	0	0	94	0	10	2.3	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR20B	25	0	0	91	0	10	0.7	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR31A	25	0	0	90	0	11	0.7	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR31B	28	0	0	91	0	7	0.1	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR35A	25	0	0	97	0	4	1.3	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR35B	26	0	0	96	0	4	0.9	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR46A	45	0	0	80	0	1	8.1	1	****	[a:h+b+c]
*GSSR46B	25	0	0	100	0	1	1.7	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR54A	33	0	0	83	0	10	0.7	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR54B	22	0	0	94	0	10	2.3	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR66A	32	0	0	90	0	4	0.1	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR66B	34	0	0	88	0	4	0.5	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR80	26	0	0	87	0	13	0.2	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR88	46	0	0	73	0	7	11.8	1	*****	[a:h+b+c]
*GSSR91A	21	0	0	100	0	5	3.8	1	*	[a:h+b+c]
*GSSR91B	35	0	0	86	0	5	1.0	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR96A	29	0	0	95	0	2	0.2	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR96B	24	0	0	100	0	2	2.1	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR103A	21	0	0	97	0	8	3.3	1	*	[a:h+b+c]
*GSSR103B	37	0	0	81	0	8	2.5	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR104	34	0	0	92	0	0	0.3	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR107A	23	0	0	103	0	0	3.1	1	*	[a:h+b+c]
*GSSR107B	29	0	0	97	0	0	0.3	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR111A	8	0	0	117	0	1	23.1	1	*****	[a:h+b+c]
*GSSR111B	46	0	0	79	0	1	9.3	1	****	[a:h+b+c]
*GSSR122A	18	0	0	103	0	5	6.6	1	**	[a:h+b+c]
*GSSR122B	29	0	0	92	0	5	0.1	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR138A	41	0	0	82	0	3	4.6	1	**	[a:h+b+c]
*GSSR138B	27	0	0	96	0	3	0.6	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR140A	34	0	0	88	0	4	0.5	1	-	[a:h+b+c]
*GSSR140B	20	0	0	102	0	4	4.8	1	**	[a:h+b+c]
*BSSR54A	31	0	0	69	0	26	1.9	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR54B	20	0	0	80	0	26	1.3	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR73A	32	0	0	90	0	4	0.1	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR73B	29	0	0	94	0	3	0.1	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR88A	35	0	0	82	0	9	1.5	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR88B	31	0	0	91	0	4	0.0	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR105A	32	0	0	80	0	14	0.8	1	-	[a:h+b+c]
*BSSR105B	4	0	0	109	0	13	27.8	1	*****	[a:h+b+c]

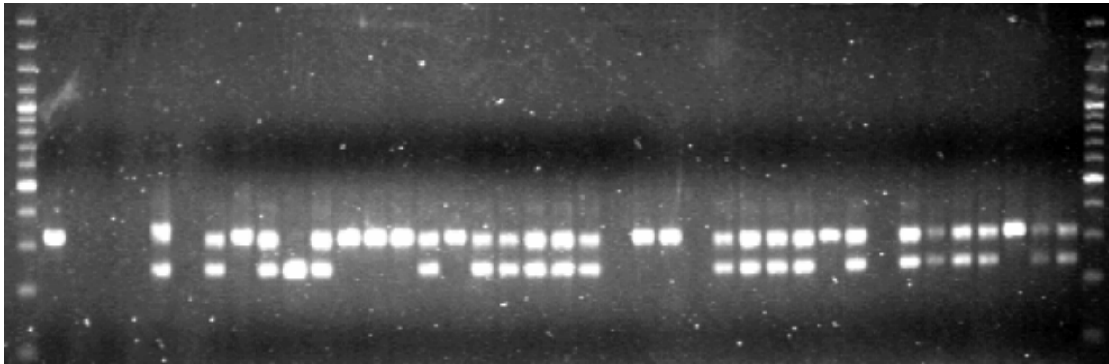


Figura 5.1. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite GSSR91.

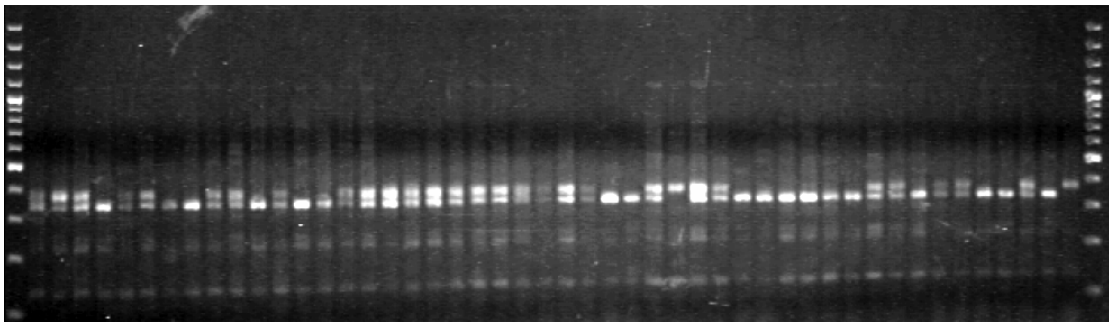


Figura 5.2. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite GSSR111.

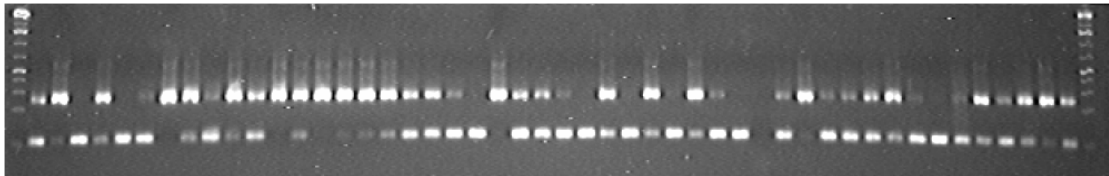


Figura 5.3. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite BSSR73.

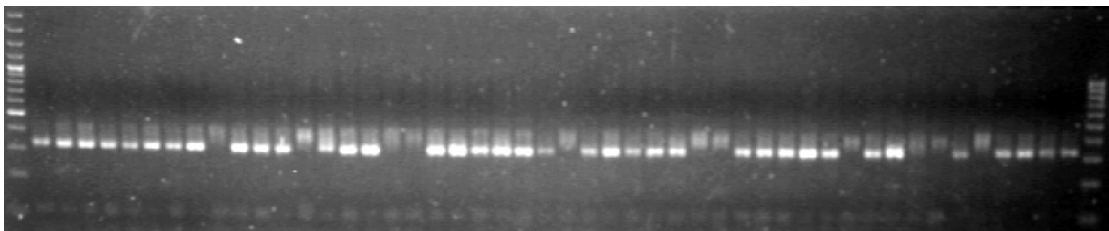


Figura 5.4. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador microsatélite GSSR104. En este caso el marcador fue considerado dominante.

A partir de los 193 marcadores RAPD se obtuvieron gran cantidad de productos amplificados, aunque solo 12 de ellos resultaron con una segregación polimórfica que se ajustaba al patrón de segregación esperado 3:1 para una población F₂ (tabla 5.2.). En el caso de los RAPD se tomó como límite superior un valor de χ^2 de 10, los marcadores con valores superiores fueron descartados para la construcción del mapa de ligamiento. En las figuras 5.5. y 5.6. se observan los productos amplificados con dos marcadores RAPD.

Tabla 5.2. Valores observados en los productos de amplificación de los marcadores RAPD en la población F₂. Análisis del ajuste a los patrones de segregación esperados, 3:1 para una F₂, mediante los valores de chi-cuadrado (χ^2) y significancia. Los marcadores con valores de χ^2 mayores a 10 fueron descartados para la construcción del mapa de ligamiento.

Locus	a	h	b	c	d	-	X2	GL	Significancia	Clases
*Rg191	7	0	0	90	0	29	16.4	1	*****	[a:h+b+c]
*Rg192	1	0	0	99	0	26	30.7	1	*****	[a:h+b+c]
*Rg193	41	0	0	47	0	38	21.9	1	*****	[a:h+b+c]
*Rg194	58	0	0	35	0	33	69.3	1	*****	[a:h+b+c]
*Rg195	29	0	0	73	0	24	0.6	1	-	[a:h+b+c]
*Re141	14	0	0	98	0	14	9.3	1	****	[a:h+b+c]
*Re142	9	0	0	106	0	11	18.1	1	*****	[a:h+b+c]
*Re143	36	0	0	75	0	15	3.3	1	*	[a:h+b+c]
*Re144	1	0	0	114	0	11	35.7	1	*****	[a:h+b+c]
*Re145	59	0	0	50	0	17	49.3	1	*****	[a:h+b+c]
*Re146	52	0	0	63	0	11	25.1	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac41	46	0	0	45	0	35	31.7	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac42	28	0	0	62	0	36	1.8	1	-	[a:h+b+c]
*Rac43	7	0	0	82	0	37	13.9	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac44	3	0	0	89	0	34	23.2	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac45	6	0	0	88	0	32	17.4	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac46	37	0	0	54	0	35	11.9	1	****	[a:h+b+c]
*Rac47	45	0	0	46	0	35	29.0	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac51	6	0	0	92	0	28	18.6	1	*****	[a:h+b+c]
*Rac52	50	0	0	48	0	28	35.4	1	*****	[a:h+b+c]
*Rab51	11	0	0	82	0	33	8.6	1	****	[a:h+b+c]
*Rab52	41	0	0	53	0	32	17.4	1	*****	[a:h+b+c]
*Rg21	23	0	0	97	0	6	2.2	1	-	[a:h+b+c]
*Rg22	13	0	0	104	0	9	12.0	1	*****	[a:h+b+c]
*Rau11	37	0	0	83	0	6	2.2	1	-	[a:h+b+c]
*Raa171	19	0	0	94	0	13	4.0	1	**	[a:h+b+c]
*Raa172	15	0	0	99	0	12	8.5	1	****	[a:h+b+c]
*Raa173	24	0	0	89	0	13	0.9	1	-	[a:h+b+c]
*Rbc6001	29	0	0	87	0	10	0.0	1	-	[a:h+b+c]
*Rbc6002	29	0	0	82	0	15	0.1	1	-	[a:h+b+c]

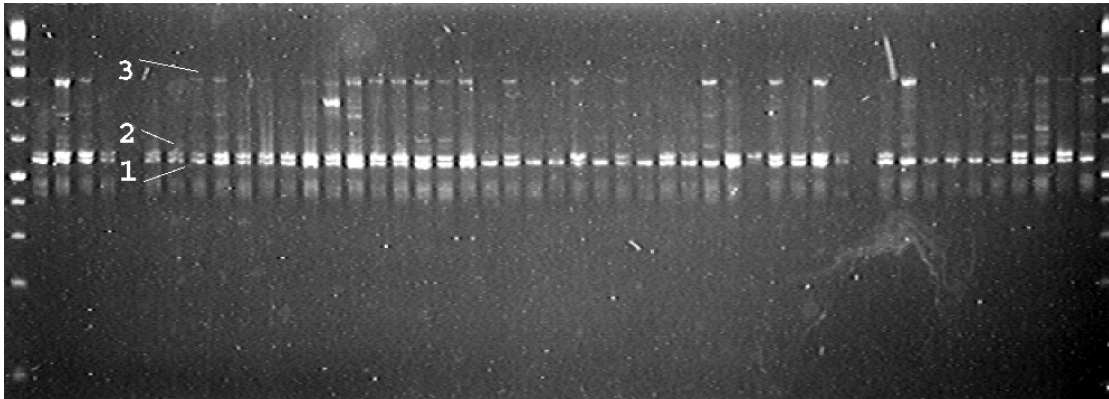


Figura 5.5. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador RAPD OPaa17. Las bandas 1, 2 y 3 resultaron polimórficas en la población F2.

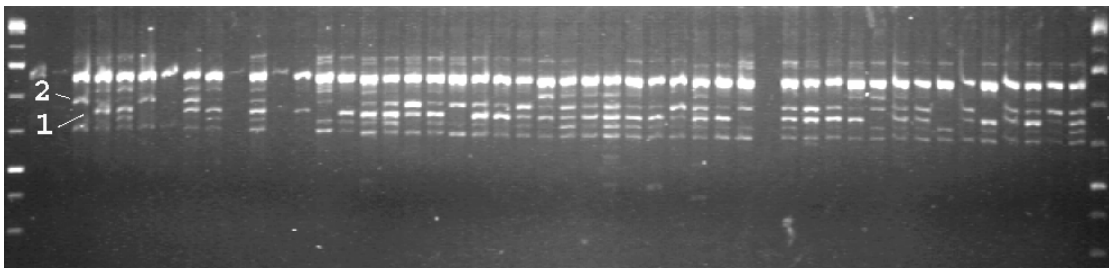


Figura 5.6. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador RAPD BC600. Las bandas 1 y 2 resultaron polimórficas en la población F2.

De los 6 SCAR analizados en la población solo el Q1/800Flanking resultó polimórfico y codominante, ajustándose su patrón de segregación al esperado para una población F₂ (tabla 5.3. y figura 5.7.).

Tabla 5.3. Valores observados en los productos de amplificación del marcador RAPD Q1/800Flanking en la población F₂. Análisis del ajuste a los patrones de segregación esperados, 3:1 para una F₂, mediante los valores de chi-cuadrado (χ^2) y significancia.

Locus	a	h	b	c	d	-	X2	GL	Significancia	Clases
*Q800fA	28	0	0	84	0	14	0.0	1	-	[a:h+b+c]
*Q800fB	22	0	0	90	0	14	1.7	1	-	[a:h+b+c]

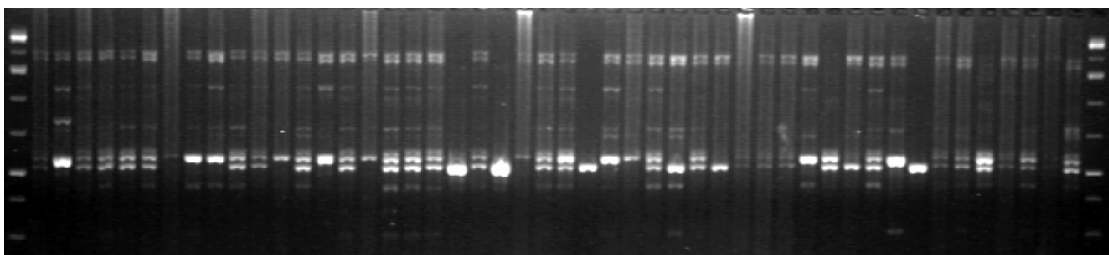


Figura 5.7. Gel de agarosa con los productos de amplificación del marcador SCAR Q800flanking.

A partir de la técnica de AFLP se obtuvieron 342 productos de segregación polimórfica que se ajustaban al patrón de segregación esperado, tomándose como límite superior un valor de χ^2 de 10. En la tabla 5.4. se presentan la cantidad de bandas totales y la cantidad de bandas polimórficas por cada combinación de cebadores específicos utilizados. En las fotos 5.8. y 5.9. pueden apreciarse partes de los geles de acrilamida con los productos de amplificación resultantes a partir de la técnica de AFLP.

Tabla 5.4. Bandas totales y bandas polimórficas resultantes de las reacciones de amplificación con cada combinación de cebadores específicos utilizados en la técnica de AFLP.

Nº Combinación	Cebadores	Nº Total de bandas	Bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas
1	EAAC/MCTA	44	16	36,4
2	EAAC/MCAT	59	19	32,2
3	EAAC/MCAA	52	18	34,6
4	EAAG/MCAG	46	20	43,5
5	EAAG/MCAA	73	26	35,6
6	EAAG/MCTA	48	22	45,8
7	EAAG/MCTT	68	33	48,5
8	EACA/MCAA	41	21	51,2
9	EACC/MCTA	22	10	45,5
10	EACC/ MCAG	17	5	29,4
11	EACA/MCAT	52	26	50,0
12	EACA/MCAG	41	19	46,3
13	EAAG/MCAT	85	27	31,8
14	EAAC/MCTT	46	11	23,9
15	EAAC/MCAG	31	18	58,1
16	EGGA/MCTC	38	15	39,5
17	EAAG/MCAC	37	13	35,1
18	EAAG/MCTC	36	12	33,3
19	EAAC/MCAC	31	11	35,5
Total		867	342	-
Promedio		45,6	18	39,8

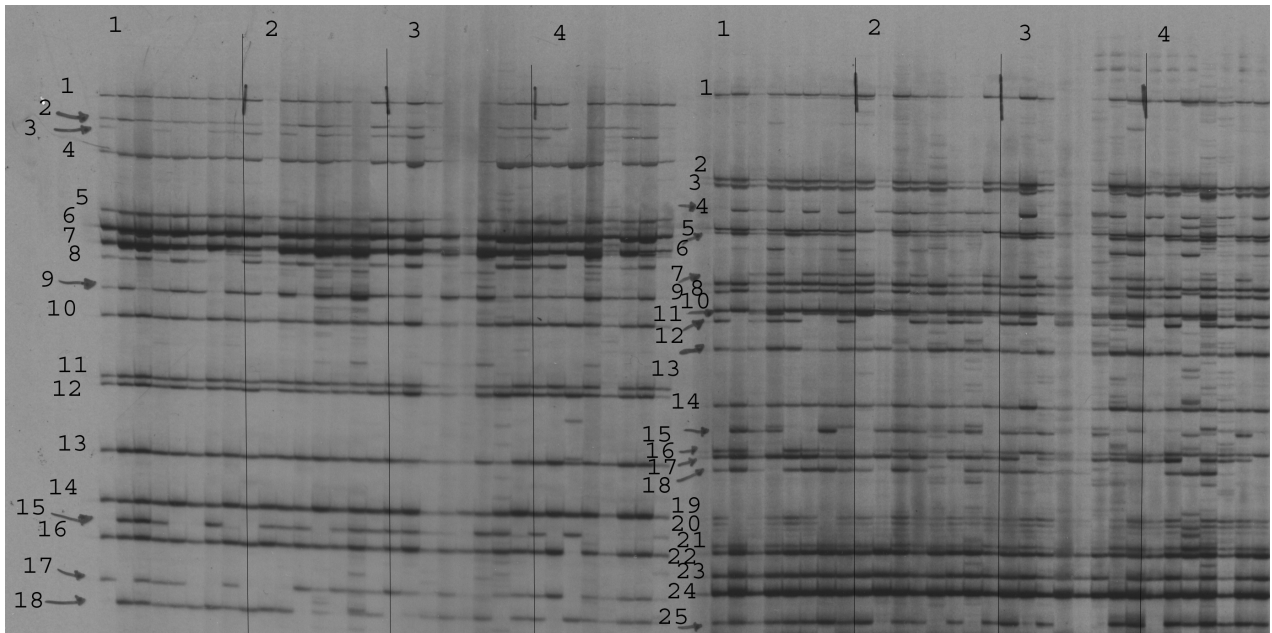


Figura 5.8. Gel de poliacrilamida con parte de los productos de amplificación de los marcadores específicos EAAC-MCTA, a la izquierda, y EAAC-MCAT, a la derecha, en 32 individuos de la población F2.

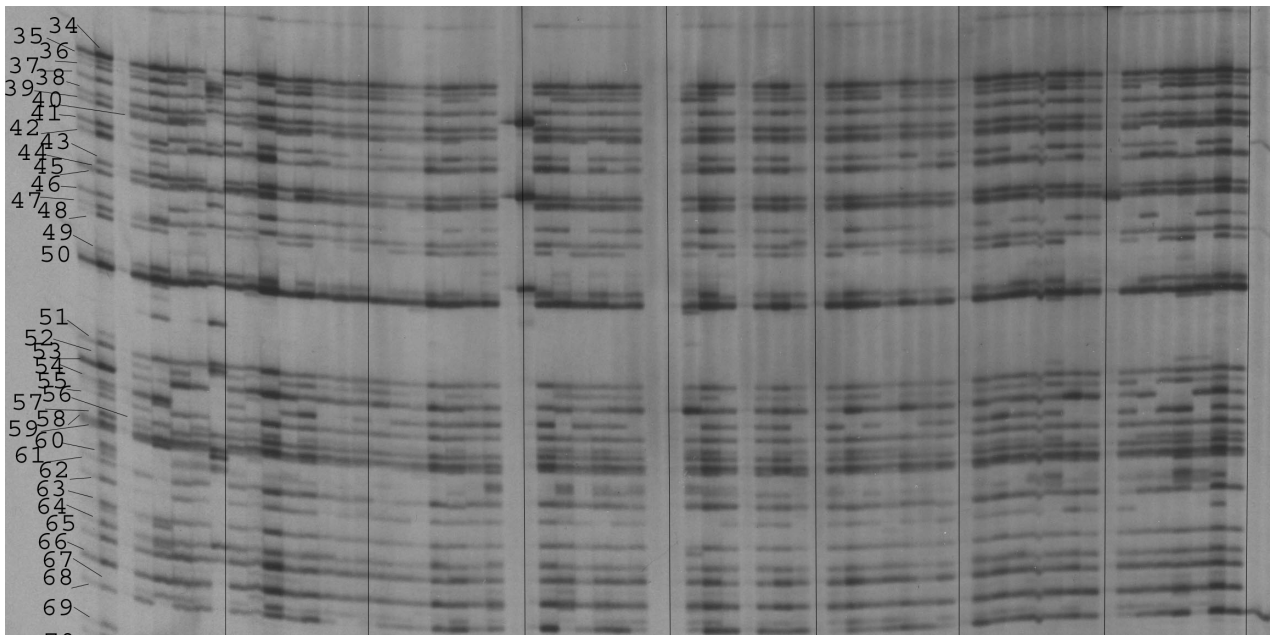


Figura 5.9. Gel de poliacrilamida con parte de los productos de amplificación de los marcadores específicos EAAG-MCAT en 64 individuos de la población F2.

Para la construcción del mapa de ligamiento fueron seleccionados 400 marcadores moleculares que se ajustaban al patrón de segregación 3:1 (19 microsatélites codominantes, 5 microsatélites dominantes, 12 RAPD, 1 SCAR codominante y 342 marcadores AFLP) y

dos marcadores fenotípicos dominantes, *VERN* o los requerimientos de vernalización (plantas anuales vs plantas bienales) y *REST* o la restauración de la fertilidad (plantas fértiles vs plantas estériles). Los datos de presencia – ausencia del total de marcadores fueron analizados mediante el programa JoinMap3.0, utilizando la función de mapeo de Kosambi.

Considerando un LOD mínimo de 4.0 se obtuvo un mapa conformado por 336 marcadores agrupados en 18 grupos de ligamiento, quedando 67 marcadores moleculares sin agrupar. En la tabla 5.5. se presentan los grupos de ligamiento 1, 2, 3 y 4 con sus correspondientes marcadores y LOD de formación. En la tabla 5.6. se presentan los grupos 5, 6, 7 y 8; en la tabla 5.7. los grupos 9, 10, 11 y 12; en la tabla 5.8. los grupos 13, 14, 15 y 16; y en la tabla 5.9. los grupos 17 y 18.

Tabla 5.5. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 1, 2, 3 y 4.

Grupo 1 LOD 6.0		Grupo 2 LOD 6.0		Grupo 3 LOD 6.0		Grupo 4 LOD 6.0	
Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)
*aagcat40	0,000	*aagctt37	0,000	*acacaa35	0,000	*acacaa16	0,000
*aaccag8	3,291	*aagctt41	9,360	*acacaa19	4,670	*ggactt4	10,983
*aagcta45	6,987	*aaccat4	18,257	*aagcag39	12,514	*aaccat12	15,297
*acacat23	11,366	*ggactt11	28,888	*aaccaa50	14,641	*ggactt25	18,083
*aagcat32	14,115	*aaccaa20	32,066	*acacat35	16,170	*acacag32	20,503
*aagcaa32	18,119	*acacat10	36,019	*BSSR54A	19,567	*GSSR6A	21,492
*aagcag32	20,605	*acacaa15	38,850	*aaccag16	21,771	*aagctt19	23,915
*aagcac23	23,491	*acacat42	41,037	*aagcaa68	24,865	*aagctt27	24,914
*aagcac26	25,815	*ggactt26	44,291	*aagcat48	28,914	*aagctt18	26,883
*aagcat52	27,228	*aagcat46	48,463	*aagcta28	31,055	*aagcat67	29,474
*aagcat36	29,140	*acacag5	50,424	*acacat43	34,417	*acacag34	31,209
*GSSR91A	30,179	*acacag28	54,781	*aaccta36	36,956	*aagcag17	32,756
*acacag37	32,236	*acacaa30	55,986	*aaccaa33	40,598	*aaccat50	34,529
*aaccta19	32,975	*aagcag24	60,320	*aagcat54	44,462	*GSSR96A	35,196
*aaccag22	34,221	*BSSR54B	63,946	*aagctt9	47,666	*aaccta17	37,201
*acccta12	36,152	*aaccag14	64,911	*aaccag20	53,755	*GSSR140A	38,027
*aaccta2	37,894	*acacaa34	67,265	*aaccta31	65,275	*aaccag6	39,544
*acacat8	39,701	*aaccta26	70,246	*aaccta24	78,620	*aagcaa28	43,211
*acccta7	42,274	*aagcag22	73,623	*aaccat25	81,621	*aagcag15	43,701
*aagcta19	45,730	*aagcaa51	78,256	*aagctt24	89,706	*acacat50	45,370
*aagcat11	48,996	*acacaa40	82,487			*acacag27	48,243
*aagcag46	51,223	*acacaa9	90,112			*acacat36	49,810
*aaccaa25	53,497					*aacctt19	52,152
*aaccat17	57,129					*aagcaa30	56,313
						*aaccac18	57,939

Tabla 5.6. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 5, 6, 7 y 8.

Grupo 5 LOD 6.0		Grupo 6 LOD 6.0		Grupo 7 LOD 6.0		Grupo 8 LOD 6.0	
Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)
*aagctt20	0,000	*ggactt3	0,000	*aagctt38	0,000	*aagcaa15	0,000
*aaccat38	8,563	*GSSR20B	2,278	*aagcta18	9,436	*aacctt24	5,618
*aagctt26	11,218	*acacaa27	3,409	*aagcat56	13,995	*acccta11	8,915
*GSSR6B	17,578	*acacat34	6,582	*aagctc1	17,474	*aaccag19	16,199
*acacat22	18,953	*aagcac7	8,335	*aaccta23	19,792	*GSSR111B	21,834
*aagcaa27	21,418	*aagcac33	11,909	*aacctt14	21,783	*aaccat11	26,320
*aaccac6	24,052	*aaccat18	14,760	*ggactt2	21,962	*aagcta6	28,109
*ggactt9	26,330	*Q800fA	15,984	*aagctc12	24,262	*aagctt35	36,174
*aagcag18	28,181	*aagcta1	16,662	*aaccac16	25,542	*aagcag28	40,116
*aaccta18	29,960	*aagcaa39	18,219	*aagcta44	29,131	*aagctt63	47,751
*aaccat56	31,433	*acacat17	20,210	*Q800fB	31,072	*aaccaa29	49,718
*aagctt30	32,565	*GSSR35B	22,239	*GSSR35A	31,919	*acccta2	54,940
*GSSR140B	36,150	*aagcag11	24,231	*GSSR107A	32,938	*aagctt15	62,553
*aaccag5	38,635	*acccta15	26,058	*aaccta33	34,487	*aagctt50	74,847
*GSSR96B	43,024	*aagcat62	27,828	*aaccaa21	35,826	*aaccag7	80,723
*aagcat83	47,264	*aaccta41	29,297	*aaccat13	38,250	*aagctc9	89,282
*aagcaa24	51,309	*GSSR107B	30,661	*aaccag10	41,104		
*acacaa12	66,623	*aaccag18	32,863	*acacag24	43,646		
		*aagctt48	35,859	*aagcag23	45,842		
		*aagcac2	38,077	*aagctt29	47,019		
		*aagctc10	39,051	*aaccaa46	50,229		
		*aagcaa46	43,156	*acacag1	56,456		
		*aagctt28	44,988	*aagcat49	58,948		
		*aagcac25	48,231				

Tabla 5.7. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 9, 10, 11 y 12.

Grupo 9 LOD 5.0		Grupo 10 LOD 5.0		Grupo 11 LOD 7.0		Grupo 12 LOD 7.0	
Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)
*Rbc6002	0,000	*aagcaa20	0,000	*aagcat60	0,000	*aaccat48	0,000
*Raa171	10,769	*aagctc25	15,049	*ggactt22	1,962	*aaccac8	3,406
*acacaa33	13,658	*acacat21	23,738	*VERN	5,610	*aagcaa56	9,188
*aagctt12	18,917	*gssr3S	31,177	*aagcaa29	9,492	*aagcat16	13,216
*acacag41	22,332	*GSSR103B	32,763	*aagctt44	12,100	*aaccat15	15,670
*aagctt62	28,370	*aaccac19	38,844	*aagcaa31	14,240	*aaccaa52	17,504
*REST	36,011	*aagcta5	46,593	*aagcaa25	15,455	*GSSR66B	21,398
*aagcag33	44,365	*aagctc3	53,493	*aagctc21	16,274	*aaccta21	23,870
*aaccaa41	51,753			*aaccac27	17,990	*Rau11	26,030
*acccta1	57,251			*aaccac11	20,256	*aaccta15	27,463
*aagctc7	66,279			*aagcat24	23,448	*aagcta21	28,963
*aagcat18	72,584			*acacag40	25,354	*aaccat34	30,784
*aagcat20	82,507			*aagcta34	26,998	*aagcat31	34,272
*acacat44	91,541			*aaccac20	28,481	*aaccaa6	36,234
*Raa172	103,007			*aagcag38	30,844	*aagcag41	37,818
				*GSSR20A	32,155	*acacag23	41,997
				*GSSR66A	34,483	*aagcaa23	43,898
				*Rg195	35,458	*acacat7	46,384
				*aagctc14	37,176	*aagcag13	49,737
				*aaccat26	40,144	*ggactt16	53,128
				*aagctt17	42,641	*aagctt65	58,769
				*acacat51	50,045	*acacat20	66,902
				*aaccat40	52,035		
				*ggactt17	54,486		

Tabla 5.8. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 13, 14, 15 y 16.

Grupo 13 LOD 6.0		Grupo 14 LOD 7.0		Grupo 15 LOD 7.0		Grupo 16 LOD 4.0	
Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)
*aagcaa55	0,000	*aagctc13	0,000	*aagcaa42	0,000	*aagcat23	0,000
*aagctt13	9,420	*acacat19	3,766	*acccta5	8,894	*aagcaa22	1,242
*aagcat12	13,031	*acacaa1	5,849	*aagcaa58	14,732	*aagcac4	8,477
*aagcta32	19,204	*aaccag31	12,760	*aagcaa44	17,614	*ggactt1	10,931
*aagcat72	24,718	*aaccaa45	16,044	*aagcaa34	18,567	*aaccaa31	15,119
*aagcta9	31,020	*aaccaa44	19,098	*aagcag19	23,270	*acacat15	17,450
*GSSR91B	33,379	*aagcag40	21,888	*aagcag30	27,536	*acacat27	19,077
*aagcta24	33,990	*GSSR46B	22,882	*GSSR46A	30,617	*aagcat41	20,572
*aagctt59	37,496	*GSSR14B	23,990	*GSSR138A	32,331	*GSSR19B	21,891
*aaccaa16	39,746	*GSSR138B	25,520	*GSSR14A	34,894	*GSSR122B	21,938
*aagctc24	42,733	*aaccag30	26,225	*aagcta7	38,143	*aagcta8	28,139
*gssr104	47,289	*aaccag9	31,048	*aagctt64	41,647	*aaccaa7	29,838
*acccta4	48,523	*aaccac4	36,242	*acacag26	49,456	*Rg21	33,275
*aaccta35	49,660	*aagcaa17	39,271			*aagcac24	36,412
*aagcac29	51,196	*aagcat73	41,275			*aaccag21	37,134
*aacctt15	53,677	*acacat12	49,474			*aaccac29	41,011
*acacat46	54,861	*aagcta36	56,242			*Rbc6001	43,900
*acacat32	55,620					*aagctt16	49,205
*aagctt33	58,673					*acacag12	54,647
*GSSR31B	61,132					*aagctt42	58,472
*aagcaa49	63,114					*aagcag14	76,233
*acacat13	65,463					*GSSR54B	81,302
*aagcat7	69,137					*aagcaa4	89,064
*aaccta8	74,551						
*aacat28	77,378						
*acacag10	84,831						

Tabla 5.9. Marcadores posicionados en los grupos de ligamiento 17 y 18.

Grupo 17 LOD 4.0		Grupo 18 LOD 8.0	
Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)
*GSSR54A	0,000	*aacat59	0,000
*aagcat19	17,404	*aagcta15	15,709
*acacag14	25,801	*aagctt7	28,602
*aagcat25	32,878		
*acccta9	43,091		
*aagcag44	49,339		
*acacag15	53,422		
*aaccac12	60,452		
*aaccaa30	63,890		
*acacat26	67,038		
*acacat14	68,172		
*GSSR19A	70,898		
*GSSR122A	73,621		
*aagcaa21	79,611		

Como los progenitores de la familia F2 no fueron incluidos en el análisis molecular, se utilizaron los marcadores codominantes, señalados con negrita en las tablas 5.5., 5.6., 5.7.,

5.8. y 5.9., para establecer cuales grupos de ligamiento representaban pares de cromosomas. En base a este análisis se conformaron los siguientes pares: 1 y 13; 3 y 2; 4 y 5; 7 y 6; 11 y 12; 15 y 14; 17 y 16; 8 y 9; y 10 y 18. Al analizar cada par con el programa “Joinmap 3.0” se confirmó que los grupos 1 y 13, 3 y 2, 4 y 5, 7 y 6, 11 y 12, 15 y 14, y 17 y 16 representaban pares de cromosomas, mientras que los grupos 8, 9, 10 y 18 conformaban grupos separados.

Cuando los datos moleculares, con su nueva asignación de letras, fueron analizados en conjunto se conformaron 10 grupos de ligamiento, de los cuales 9 fueron grupos con más de 8 marcadores y un grupo solo contuvo 3 marcadores (figura 5.10). El grupo de ligamiento 1 (antes par 1 y 13) quedó conformado con un LOD de 6.0 por 49 marcadores distanciados a 1,50 cM, con un tamaño total de 73,49 cM. El grupo 2 (antes par 2 y 3) se formó con un LOD de 6.0 conteniendo 41 marcadores distanciados a 1,95 cM y con un tamaño total de 80,056 cM. El grupo 3 se formó, con un LOD de 9.0, a partir de dos pares de grupos: 6 y 7, y 11 y 12, por lo tanto fue el que contuvo la mayor cantidad de marcadores (79) distanciados a 1,32 cM, y un tamaño total de 103,901 cM. El grupo 4 (antes par 4 y 5) quedó conformado, con un LOD de 6.0, por 40 marcadores distanciados a 1,56 cM y un tamaño total de 62,417 cM. El grupo 5 (antes grupo 8) quedó conformado, con un LOD de 6.0, por 16 marcadores distanciados a 5,56 cM, con un tamaño total de 88,922 cM. El grupo 6 (antes grupo 9) se conformó, considerando un LOD de 5.0, con 15 marcadores distanciados a 6,87 cM y un tamaño total de 103 cM. El grupo 7 (antes grupo 10) quedó con 8 marcadores y un tamaño total de 54,528 cM. El grupo 8 (antes par 16 y 17) se formó con un LOD de 6.0 con 31 marcadores distanciados a 3,09 cM y un tamaño total de 95,696 cM. El grupo 9 (antes grupo 18) quedó con 3 marcadores. Y el grupo 10 (antes par 14 y 15) quedó conformado, con un LOD de 6.0, por 27 marcadores distanciados a 2,33 cM y un tamaño total de 62,918 cM. (Figura 5.10 y Tabla 5.10)

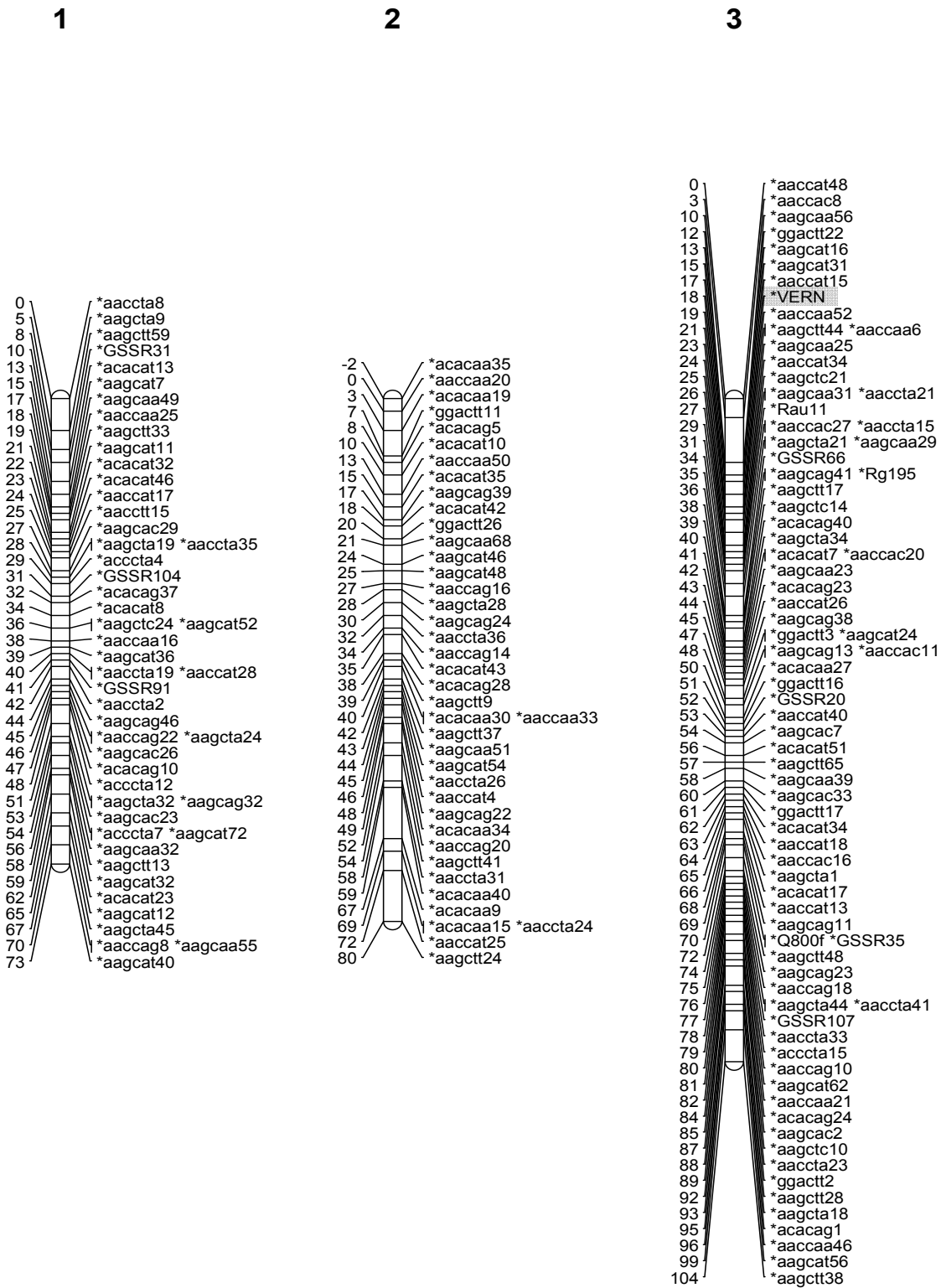


Figura 5.10. Mapa final con los 10 grupos de ligamiento.

4

5

6

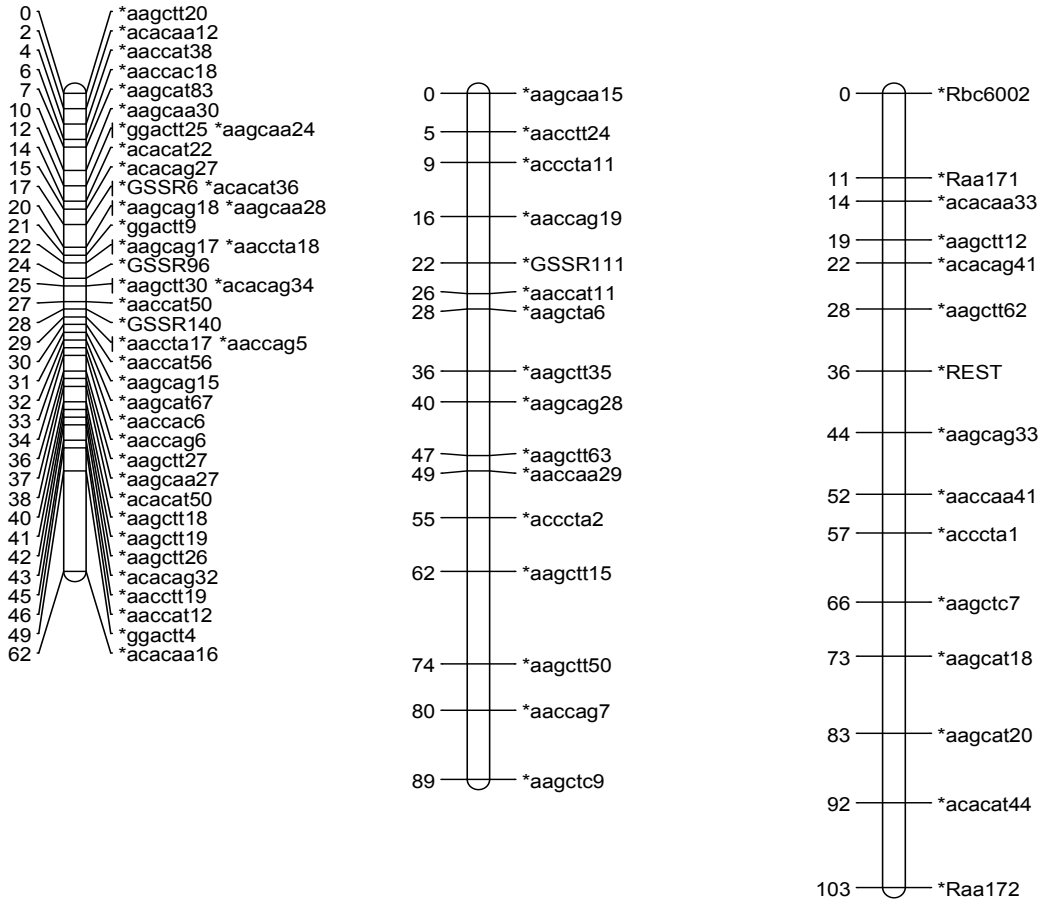


Figura 5.10. Mapa final con los 10 grupos de ligamiento (continuación).

7

8

9

10

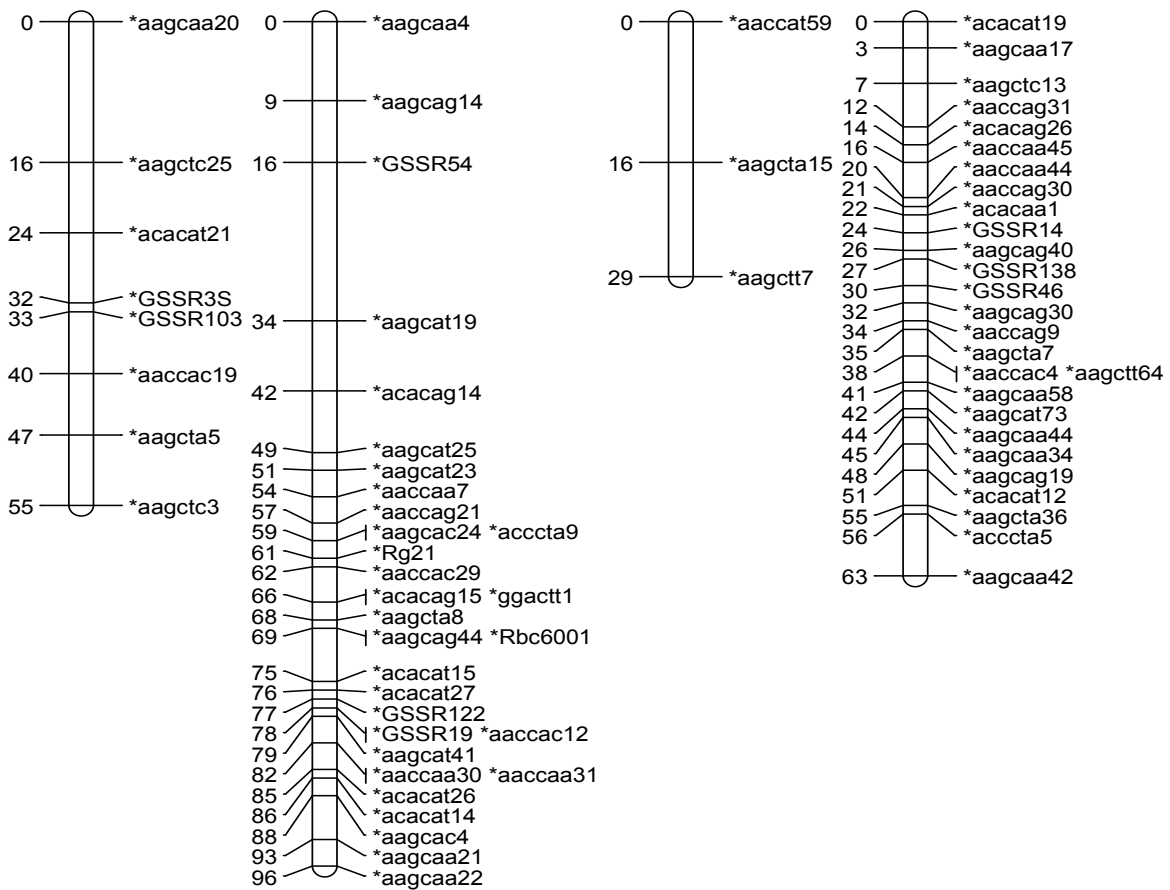


Figura 5.10. Mapa final con los 10 grupos de ligamiento (continuación).

El nuevo mapa presentó 309 marcadores, un tamaño total de 753,928 cM y una distancia promedio entre marcadores de 2,44 cM. Los marcadores más abundantes fueron los del tipo AFLP (280) que estuvieron distribuidos en todos los grupos, luego siguieron los microsatélites (19) presentes en 7 de los 10 grupos y por último los RAPDs (7) y SCAR (1) (tabla 5.10.).

Tabla 5.10. Distribución de los marcadores en los grupos de ligamiento.

Grupo	Número de marcadores							Largo (cM)	Espaciamiento (cM)
	Fenotípico	RAPD	SSR	AFLP	SCAR	Total	Codominantes		
1	0	0	3	46	0	49	3	73,490	1,50
2	0	0	0	41	0	41	0	80,056	1,95
3	1	2	4	71	1	79	5	103,901	1,32
4	0	0	3	37	0	40	3	62,417	1,56
5	0	0	1	15	0	16	1	88,922	5,56
6	1	3	0	11	0	15	0	103,007	6,87
7	0	0	2	6	0	8	1	54,528	6,82
8	0	2	3	26	0	31	3	95,696	3,09
9	0	0	0	3	0	3	0	28,602	9,53
10	0	0	3	24	0	27	3	62,918	2,33
Total	2	7	19	280	1	309	19	753,928	2,44

El gen *VERN* se ubicó en el grupo de ligamiento 3 junto con otros 78 marcadores, entre los que se incluyen cuatro microsatélites codominantes y un SCAR codominante. La distancia entre el gen *VERN* y sus marcadores más cercanos fue de 0,692 cM con el marcador *aacat15 y 0,79 cM con el marcador *aacaa52, ambos marcadores AFLP (tabla 5.11.).

Tabla 5.11. Marcadores posicionados en el grupo de ligamiento 3.

Locus	Posición (cM)	Locus	Posición (cM)
*aacat48	0,000	*GSSR20	52,288
*aaccac8	3,398	*aacat40	53,239
*aagcaa56	9,999	*aagcac7	54,258
*ggactt22	12,462	*acacat51	56,178
*aagcat16	12,873	*aagctt65	56,741
*aagcat31	15,245	*aagcaa39	57,893
*aacat15	17,174	*aagcac33	60,152
*VERN	17,866	*ggactt17	60,829
*aaccaa52	18,656	*acacat34	62,019
*aagctt44	20,665	*aacat18	62,911
*aaccaa6	21,375	*aaccac16	63,527
*aagcaa25	22,902	*aagcta1	64,627
*aacat34	23,859	*acacat17	66,341
*aagctc21	24,726	*aacat13	68,419
*aagcaa31	25,666	*aagcag11	68,503
*aaccta21	26,048	*Q800f	69,687
*Rau11	26,990	*GSSR35	70,353
*aaccac27	28,617	*aagctt48	72,359
*aaccta15	29,429	*aagcag23	74,064
*aagcta21	30,826	*aaccag18	74,936
*aagcaa29	31,088	*aagcta44	75,682
*GSSR66	33,702	*aaccta41	75,907
*aagcag41	34,522	*GSSR107	76,950
*Rg195	35,001	*aaccta33	78,109
*aagctt17	36,329	*acccta15	78,541
*aagctc14	37,576	*aaccag10	80,193
*acacag40	38,765	*aagcat62	81,082
*aagcta34	39,886	*aaccaa21	81,749
*acacat7	40,645	*acacag24	83,598
*aaccac20	41,371	*aagcac2	84,943
*aagcaa23	41,852	*aagctc10	87,487
*acacag23	43,147	*aaccta23	87,705
*aacat26	44,071	*ggactt2	89,489
*aagcag38	45,016	*aagctt28	91,672
*ggactt3	46,686	*aagcta18	93,282
*aagcat24	46,754	*acacag1	95,316
*aagcag13	47,805	*aaccaa46	95,908
*aaccac11	48,419	*aagcat56	98,887
*acacaa27	50,124	*aagctt38	103,901
*ggactt16	51,322		

5.4. DISCUSIÓN

El mapa de ligamiento obtenido tiene un alto número de marcadores (309) respecto a los mapas previamente obtenidos en zanahoria (Santos y Simon, 2004; Schulz *et al.*, 1993; Vivek y Simon, 1999). Con 10 grupos de ligamiento, se obtuvo un grupo para cada cromosoma de la zanahoria (n=9) más un pequeño grupo de 3 marcadores. El tamaño total del mapa fue de 753,928 cM, un valor similar al obtenido por Schulz *et al.* (1993) de 800 cM, aunque menor al estimado por Vivek y Simon (1999) y a los obtenidos por Santos y Simon (2004) para el genoma de la zanahoria. La distancia promedio entre marcadores fue de 2,44 cM, aunque si no se tomara en cuenta el grupo 9 que contiene solo 3 marcadores, la distancia sería de 2,37 cM lo que refleja una buena cobertura respecto a los mapas anteriores para la especie.

El mapa estuvo constituido principalmente por AFLP (90% de los marcadores), microsatélites (6%), RAPD (2%) y en menor número los SCAR (0,3 %). En cuanto a la eficiencia de los marcadores, los AFLP fueron los más eficientes ya que de 867 productos o bandas amplificadas casi el 40 % resultó polimórfico para la población y de éstos el 90 % pudieron ser incorporados en el mapa. Los SCAR, aunque se evaluaron pocos, siguieron en eficiencia con un 16,6 % de marcadores polimórficos y de estos el 100% fueron codominantes y se encontraron ligados en el mapa. Los microsatélites presentaron una baja eficiencia en cuanto a la cantidad de productos polimórficos (7,9 %), aunque el aporte de marcadores codominantes (80 %) resulta muy valioso para el mapeo. Los RAPD fueron los menos eficientes, de 193 marcadores evaluados solo el 6,2 % resultó polimórficos y de éstos solo el 58 % pudo ser incorporado al mapa de ligamiento.

Mediante la técnica de mapeo se pudo localizar una región, en el genoma de la zanahoria, ligada al carácter requerimiento de vernalización. El gen *VERN* se ubicó en el grupo de ligamiento 3 a una distancia de 0,692 cM del marcador *accat15 y 0,79 cM del marcador *accaa52. A partir del mapa se podrán desarrollar marcadores moleculares ligados al carácter. Ya que los marcadores más cercanos fueron productos amplificados a través de la técnica de AFLP, será necesario cortar y secuenciar las bandas amplificadas para luego diseñar cebadores específicos (SCAR). Estos marcadores servirían para identificar plantas anuales o bienales en etapas tempranas del cultivo, sin depender de un ambiente de evaluación a campo particular, lo cual aumentaría la eficiencia del proceso de mejoramiento genético.

El mapa de ligamiento obtenido también podrá ser utilizado como base para el mapeo de precisión y clonado posicional, ya que los marcadores ligados al carácter encontrados están suficientemente cerca. Para avanzar en esta técnica será necesario trabajar con más individuos F2, ya que se requieren grandes poblaciones segregantes para el carácter de interés, y con una librería génica (BACs, YACs, etc) utilizando la técnica de “chromosome walking” (Bradeen *et al.*, 2003). Recientemente fue desarrollada y caracterizada una librería génica de BACs (Bacterial Artificial Chromosome) de zanahoria de alta cobertura genómica (Cavagnaro *et al.*, 2008). Estos recursos genómicos y moleculares harán posible realizar un mapeo fino en la región cromosómica que incluye a *Vern*. Posteriormente se podría establecer un mapa físico de clones de BACs que incluyan la región de interés para luego secuenciarla.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- BOTSTEIN D., R.L. WHITE, M. SKOLNICK y R.W. DAVIS. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Hum. Genet.* 32:314–331.
- BRADEEN, J. M., I. C. BACH, M. BRIARD, V. LE CLERC, D. GRZEBELUS, D. A. SENALIK y P. W. SIMON. 2002. Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild *Daucus* populations reveals a genetically nonstructured composition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(3): 383 – 391.
- BRADEEN, J. M., S. K. NAESS, J. SONG, G. T. HABERLACH, S. M. WIELGUS, C. R. BUELL, J. JIANG y J. P. HELGESON. 2003. Concomitant reiterative BAC walking and fine genetic mapping enable physical map development for the broad-spectrum late blight resistance region, RB. *Mol Gen Genomics* (2003) 269: 603–611
- BRIARD, M.; V. LE CLERC, D. GRZEBELUS, D. SENALIK y P.W. SIMON. 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 235-241.
- CAVAGNARO, P. F.; S. CHUNG; M. SZKLARCZYK; D. GRZEBELUS; D. SENALIK; A. E. ATKINS Y P. W. SIMON. 2008. Characterization of a deep-coverage carrot (*Daucus carota* L.) BAC library and initial analysis of BAC-end sequences. *Mol Genet Genomics* DOI 10.1007/s00438-008-0411-9.
- CAVAGNARO, P. F.; S. CHUNG; A. ALI; M. YILDIZ; M. S. ALESSANDRO; R. SCHROLL Y P. W. SIMON. 2009. Development of 304 new microsatellite markers for carrot. Analysis of their potential for linkage mapping, assessment of genetic diversity and cross-taxa utilization. 33rd International Carrot Conference. EEUU.
- JUST, B.J., C.A.F. SANTOS, M.E.N. FONSECA, L.S. BOITEUX, B.B. OLOIZIA y P.W. SIMON. 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet* 114:693–704.
- SANTOS, C.A.F. y P.W. SIMON. 2002. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F2 populations of carrot. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 2, 195-201.
- SANTOS C.A.F. y P.W. SIMON. 2004. Merging carrot linkage groups based on conserved dominant AFLP markers in F2 populations. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129:211–217.
- SCHULZ B., L. WESTPHAL y G. WRICKE. 1993. Linkage groups of isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Daucus carota* L. *sativus*). *Euphytica* 74:67–76.
- SIMON, P.W., R. E. FREEMAN, J. V. VIEIRA, L. S. BOITEUX, M. BRIARD, T. NOTHNAGEL, B. MICHALIK y YOUNG-SEOK KWON. 2008. Carrot: In *Handbook of Plant Breeding, Volume 2, Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae*. Edited by: J. Prohens and F. Nuez. Springer-Verlag, GmbH, Heidelberg, Germany pp. 327-357.
- VAN OOIJEN JW y VOORRIPS RE. 2001. JoinMap® Version 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.

- VIVEK B.S. y P.W. SIMON. 1999. Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*). Theor. Appl. Genet. 99:58–64.
- VOS P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER y M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids. Res. 23:4407–4414.
- WESTPHAL L. y G. WRICKE. 1991. Genetic and linkage analysis of isozyme loci in *Daucus carota* L. Euphytica 56:259–267.
- WESTPHAL L. y G. WRICKE. 1997. Construction of a linkage map of *Daucus carota* L. *sativus* and its application for the mapping of disease resistance and restorer genes. J Appl Genet 38A:13–19.
- WILLIAMS J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI y S.V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 18:6531–6535.

CAPÍTULO 6
DISCUSIÓN GENERAL

6.1. DISCUSIÓN GENERAL

El carácter respuesta a la vernalización ha sido estudiado, desde el punto de vista genético, en numerosas especies como: *Arabidopsis sp.* (Sheldon *et al.*, 1999), en especies del género *Brassica* como *B. napus*, *B. rapa*, y *B. oleracea* (Camargo y Osborn, 1996; Ferreira *et al.*, 1995; Teutonico y Osborn, 1995), en *Beta vulgaris* L. (Abe *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2007), en *Triticum sp.* (Yan *et al.*, 2004) y otros cereales. En la mayoría de los casos se encontró que la respuesta a la vernalización estaba determinada por genes simples. En base a esos resultados, se planteó como primera hipótesis en esta tesis que la respuesta a la vernalización en zanahoria está determinada por pocos genes de acción simple. Esta hipótesis pudo ser verificada a través del estudio de familias segregantes (F_1 , F_2 , F_3 y RC), obtenidas a partir del cruzamiento de 2 líneas bienales y un cultivar anual. Los patrones de segregación observados se ajustaron a la segregación de un gen simple con dominancia completa para la anualidad. Estos resultados no concuerdan con el trabajo de Wijnheijmer *et al.* (1989), quienes sugirieron que el comportamiento bienal en zanahoria era un carácter dominante, aunque estos autores trabajaron con especies de zanahoria silvestre (*D. carota ssp. carota*) y cultivadas, y nunca estudiaron los cruzamientos entre ellas. Sin embargo, sí coincide con las observaciones preliminares realizadas por Dickson (1958), quien sostuvo la hipótesis de que la anualidad era dominante sobre la bienalidad, aunque no tuvo suficientes evidencias para llegar a una conclusión final.

Los datos obtenidos resultaron originales, permitiendo la publicación de los mismos en una revista científica internacional, y sumamente útiles para el manejo y el mejoramiento del cultivo de la zanahoria. La floración es una característica adaptativa importante, tanto para la producción de raíces como de semillas, en consecuencia el conocimiento del mecanismo genético de este carácter resulta de suma importancia en los planes de mejoramiento genético.

La segunda hipótesis planteada fue que el tipo de herencia observado para los requerimientos de vernalización, en los cruzamientos entre Criolla INTA y dos materiales bienales, es el mismo en cruzamientos con zanahorias de diversos orígenes. Para comprobar esta hipótesis se evaluaron materiales genéticos, en su mayoría anuales, provenientes de EEUU, India, Pakistán, Turquía, Japón y Argentina, y los cruzamientos (F_1) obtenidos a partir de los mismos.

El comportamiento de los cruzamientos entre materiales anuales y bienales de distintos orígenes confirmó la dominancia de la anualidad sobre la bienalidad. Aunque

también se observó variabilidad en el ciclo a floración entre los materiales de distintos orígenes. Esto podría deberse a la presencia de alelos múltiples o a interacciones génicas que influyen en el carácter.

La clasificación de la zanahorias en base a su lugar de origen las divide en dos grupos: las zanahorias del Este, cuyo centro de origen sería Asia Central, y las zanahorias del Oeste, cuyo centro de origen sería Asia Menor (Mackevic, 1929; Vavilov, 1951; Heywood, 1983). Las zanahorias del Este tienen tendencia a la floración temprana, raíces púrpuras o amarillas, y hojas ligeramente disectadas, verde-grisáceas y pubescentes. Las zanahorias del Oeste tienen menor tendencia a la floración prematura, raíces naranjas, rojas, amarillas o blancas, y hojas profundamente disectadas y menos pubescentes (Small, 1978; Rubatzky *et al.*, 1999).

En las poblaciones evaluadas en este trabajo de tesis, tanto las zanahoria del este como del oeste se comportaron como anuales. Sin embargo, los materiales de India y Pakistán fueron más precoces. Es probable que el ambiente en el cual evolucionaron estas poblaciones favoreciera la presencia de alelos con menor requerimiento de vernalización o la selección natural de genes que interactúan provocando una floración más temprana. Las poblaciones provenientes de Turquía, centro de origen de las zanahorias del oeste, también se comportaron como anuales aunque con un ciclo desde siembra a entallamiento más largo. Esto coincidiría en parte con lo citado por otros autores respecto a la tendencia a la floración prematura de las zanahorias del este y del oeste, aunque es evidente que el ambiente en el cual se hacen las evaluaciones es de gran influencia en los resultados. También fueron observadas diferencias entre los materiales bienales evaluados, tanto los del capítulo 2 (B1 y B2) como los evaluados en el capítulo 3 (B2 y EEUU), y coincidente con lo citado por Astorquizaga *et al.* (2004).

La variabilidad en los requerimientos de vernalización, dentro del modelo de genes simples, ha sido observada en otras especies como *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Hordeum vulgare* L., *Triticum monococcum* L., *Triticum aestivum* L. y *Arabidopsis thailiana*. La variabilidad en estas especies fue explicada por la acción de 2 o 3 genes con distintos grados de dominancia o epistasia, o por la acción de alelos múltiples.

El capítulo 3 de esta tesis confirma por un lado la dominancia de la anualidad y deja planteado como estudio futuro la evaluación en un mismo ambiente de materiales anuales y bienales de zanahoria de distintos orígenes geográficos, así como el estudio de nuevos cruzamientos tanto entre genotipos anuales y bienales como entre anuales de diferente

ciclo y entre bienales de diferente ciclo. Esto podría contribuir a un mayor entendimiento de los mecanismos genéticos que determinan un carácter tan importante como el requerimiento de vernalización. La evaluación de las F2 obtenidas a partir de algunos de los cruzamientos evaluados en esta tesis, así como otras F2 obtenidas a partir de nuevos cruzamientos, permitiría explicar si la variabilidad observada se debe a un solo gen con varios alelos o a más genes que están interactuando.

La tercer hipótesis de esta tesis planteaba que las regiones cromosómicas que codifican para el carácter requerimientos de vernalización en zanahoria tienen secuencias similares al gen *FLC* que controla este carácter en otras especies dicotiledóneas. A pesar de que la zanahoria pertenece al clado Astéridas, uno de los tres clados de la dicotiledóneas citados por Reeves *et al.* (2007) en los que se encontraron genes *FLC*, no se encontró en la misma el gen *FLC* a través del método de BLAST. La inconsistencia de los resultados obtenidos podría atribuirse a lo enunciado por Reeves *et al.* (2007) sobre la alta divergencia encontrada en los genes *FLC* presentes en las distintas especies vegetales dicotiledóneas. Estos autores argumentan que la alta divergencia encontrada explicaría los intentos fallidos de encontrar el gen *FLC* fuera de la familia *Brassicaceae* por métodos que se basan en una similitud completa, como BLAST o “Southern Hybridization”.

En un estudio futuro, la búsqueda del gen *FLC* en el genoma de la zanahoria podría realizarse a través de otros métodos moleculares como el análisis de secuencias EST (expressed sequence tag) de zanahoria con una secuencia consenso de la unidad MADS-box y confirmando luego, si se encontrara algún EST candidato, que esa secuencia tuviera relación con el tiempo de floración en zanahoria a través del diseño de cebadores y análisis del ARN de plantas anuales y bienales.

Los componentes mayores de la respuesta al fotoperíodo aparecen conservados entre *Arabidopsis* y el arroz (Hayama y Coupland, 2004). El gen *FT* (*Flowering locus T*) es un promotor de la floración en respuesta a la duración del día tanto en *Arabidopsis* como en cereales, sin embargo existen genes y factores ambientales distintos actuando en la rutas metabólicas e influyendo sobre *FT* en cada grupo de especies (*Arabidopsis*, arroz y cereales templados) (Greenup *et al.*, 2009).

En la respuesta a la vernalización, al comparar *Arabidopsis* con cereales, no se han encontrado genes homólogos cumpliendo la misma función, lo que indicaría que la respuesta a la vernalización evolucionó luego de que ambos grupos de plantas (dicotiledóneas y monocotiledóneas) se separaran (Amasino, 2004; Greenup *et al.*, 2009;

Reeves *et al.*, 2007). Dentro de las dicotiledóneas, Reeves *et al.* (2007) determinaron mediante estudios filogenéticos y moleculares, que existían genes homólogos al gen *FLC* en algunas especies de los tres principales clados (Cariofilidas, Rósidas y Astéridas). Sin embargo, estos genes encontrados presentaban una alta divergencia.

La evidente complejidad y variabilidad en el mecanismo de respuesta a la vernalización resalta la importancia de estudiar el proceso en cada especie de interés en particular, más allá de las posibles comparaciones que se puedan realizar entre especies. Es por ello que nos planteamos la cuarta y última hipótesis de esta tesis: es posible localizar una región cromosómica ligada al carácter requerimiento de vernalización en zanahoria. La verificación de esta hipótesis se realizó a través de la construcción de un mapa de ligamiento, utilizando una población F2 segregante para el carácter requerimientos de vernalización. Mediante la técnica de mapeo se encontró una región cromosómica ligada a este carácter en zanahoria. El gen de interés se ubicó en el grupo de ligamiento 3 a una distancia de 0,69 cM del marcador *aacat15 y 0,79 cM del marcador *aacaa52.

Este mapa servirá como base para el desarrollo de marcadores moleculares, ligados al carácter, que asistirán al mejoramiento genético. Estos marcadores servirían para identificar plantas anuales o bienales en etapas tempranas del cultivo, sin depender de un ambiente de evaluación a campo particular, lo cual aumentará la eficiencia del proceso de mejoramiento genético. También a partir del mapa, junto con la población segregante y una librería génica de BACs recientemente desarrollada, se podrá realizar mapeo físico y secuenciación de la región de interés.

La identificación de genotipos de zanahoria con distintos requerimientos de vernalización, mediante evaluaciones a campo y utilización de marcadores moleculares específicos, permitiría un mejor aprovechamiento de los recursos genéticos para la producción de raíces y semillas. Para la producción de raíces, se podrían utilizar en los climas más calurosos los genotipos más precoces acortando así el ciclo de producción. Mientras que en las zonas con inviernos más rigurosos la utilización de cultivares con altos requerimientos de vernalización permitiría evitar la floración prematura, un defecto muy importante y ampliamente observado en los cultivos de zanahoria. Para la producción de semillas, empleando el método de producción semilla – semilla, el conocimiento de los distintos requerimientos de vernalización permitiría ajustar las fechas de siembra acortando el ciclo del cultivo en los materiales precoces y asegurando un 100 % de floración en los materiales más tardíos.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- ABE, J., G. P. GUAN y Y. SHIMAMOTO. 1997. A gene complex for annual habit in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* 94: 129-135.
- AMASINO, R. M. 2004. Vernalization, competence and the epigenetic memory of winter. *The Plant Cell*, 16, 2553–2559.
- ASTORQUIZAGA; R.; M. S. ALESSANDRO y C. R. GALMARINI. 2004. Efecto de la fecha de siembra en la producción de semillas de zanahoria en el Valle de Uco. *Horticultura Argentina*, Vol. 23, Nro. 54: 69.
- CAMARGO, L.E.A. y T.C. OSBORN. 1996. Mapping loci controlling flowering time in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 92:610-616.
- DICKSON, M.H. 1958. The physiology and inheritance of flowering in carrots. Ph.D. Thesis. Michigan State University. 69 p.
- FERREIRA, M.E., J. SATAGOPAN, B.S. YANDELL, P.H. WILLIAMS y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 90:727-732
- GREENUP, A., W. J. PEACOCK, E. S. DENNIS Y B. TREVASKIS. 2009. The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Annals of Botany* 103:1165-1172.
- HAYAMA, R. y G. COUPLAND. 2004. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 135: 677-684.
- HEYWOOD, V.H. 1983. Relationship and evolution in the *Daucus carota* complex. *Israel Journal of Botany* 32:51-65.
- MACKEVIC, V.I. 1929. The carrot of Afghanistan. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* 20: 517-562.
- REEVES, P. A.; Y. HE; R. J. SCHMITZ; R. M. AMASINO; L. W. PANELLA y C. M. RICHARDS. 2007. Evolutionary conservation of the FLOWERING LOCUS C-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* 176:295-307.
- RUBATZKY, V. E., C. F. QUIROS, y P. W. SIMON, 1999. Carrots and related vegetable umbelliferae. *Crop production science in horticultural series*; 10. CABI Publ., Nueva York.
- SHELDON, C.C., J.E. BURN, P.P. PEREZ, J. METZGER, J.A. EDWARDS, W.J. PEACOCK y E.S. DENNIS: The FLOWERING LOCUS C gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 1999, 11:445-458.
- SMALL, E. 1978. A numerical taxonomic analysis of the *Daucus carota* complex. *Can J Bot* 56:248–276.
- TEUTONICO R.A. y T.C. OSBORN. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 91:1279-1283
- VAVILOV, N.I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chron. Botany* 13: 1-336.

- WIJNHEIJMER, E.H.M., W.A. BRANDENBURG y S.J. TER BORG. 1989. Interactions between wild and cultivated carrots (*Daucus carota* L.) in the Netherlands. *Euphytica* 40:147-154.
- YAN L., A. LOUKOIANOV, A. BLENCHL, G. TRANQUILI, W. RAMAKRISHNA, P. SANMIGUEL, J.L. BENNETZEN, V. ECHENIQUE y J. DUBCOVSKY. 2004. The Wheat VRN2 Gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, vol. 303: 1640-1644.

ANEXO I
DATOS CLIMÁTICOS

I.1. Datos climáticos correspondientes al período 2004.

Tabla I.1.1: temperaturas media, máxima media, mínima media, máxima absoluta y mínima absoluta por mes para el año 2004. Datos de la Estación Meteorológica de la EEA La Consulta INTA.

Meses	Temperatura Media Mensual (°C)	Temperatura Máxima Med. Mensual (°C)	Temperatura Mínima Med. Mensual (°C)	Temperatura Máxima Absoluta (°C)	Temperatura Mínima Absoluta (°C)
Enero	23,9	32,1	15,6	38,8	11,2
Febrero	21,0	28,4	13,6	33,1	7,0
Marzo	19,7	26,8	12,6	33,1	3,7
Abril	14,4	21,8	7,0	31,9	0,7
Mayo	7,6	13,4	1,8	24,7	-2,3
Junio	7,6	15,8	-0,6	21,1	-6,5
Julio	6,0	13,4	-1,3	23,5	-7,4
Agosto	8,5	16,1	0,9	29,8	-3,5
Setiembre	11,9	20,1	3,7	28,3	-1,7
Octubre	15,2	23,8	6,6	30,4	1,9
Noviembre	17,2	25,2	9,3	34	-1,1
Diciembre	21,2	29,5	13,0	33,7	8,5

Tabla I.1.2: horas y unidades de frío por mes y acumuladas entre mayo y diciembre de 2004. Datos elaborados por la Dirección de Agricultura y Contingencias Climáticas del Gobierno de Mendoza. Estación Meteorológica EEA La Consulta INTA.

Fecha	Horas Frío*	Unidades Frío**	Horas Frío Acumuladas	Unidades Frío Acumuladas
05-2004	470,0	541,5	470,0	541,5
06-2004	455,0	363,0	925,0	904,5
07-2004	443,0	363,5	1368,0	1268,0
08-2004	389,0	290,5	1757,0	1558,5
09-2004	184,0	151,0	1941,0	1709,5
10-2004	52,0	0,0	1993,0	1709,5
11-2004	26,0	0,0	2019,0	1709,5
12-2004	0,0	0,0	2019,0	1709,5

* Horas por debajo de 7°C
** Unidades Frío Richardson, Universidad de Utah, EEUU.

I.2. Datos climáticos correspondientes al período 2005.

Tabla I.2.1: temperaturas media, máxima media, mínima media, máxima absoluta y mínima absoluta por mes para el año 2005. Datos de la Estación Meteorológica de la EEA La Consulta INTA.

Meses	Temperatura Media Mensual (°C)	Temperatura Máxima Med. Mensual (°C)	Temperatura Mínima Med. Mensual (°C)	Temperatura Máxima Absoluta (°C)	Temperatura Mínima Absoluta (°C)
Enero	21,8	30,2	13,3	35,2	5,5
Febrero	21,4	29,0	13,9	34,6	6,7
Marzo	17,3	25,2	9,4	34,3	4,0
Abril	12,0	20,5	3,5	26,5	-2,6
Mayo	9,1	17,7	0,4	25,6	-6,5
Junio	6,7	13,2	0,2	24,1	-4,4
Julio	6,9	14,7	-1,0	22,0	-5,6
Agosto	7,7	14,4	1,0	22,3	-7,1
Setiembre	9,8	17,1	2,4	25,6	-2,0
Octubre	14,3	23,3	5,3	33,1	1,3
Noviembre	20,3	29,6	11	34,0	3,4
Diciembre	21,3	30,5	12,2	34,3	3,7

Tabla I.2.2: horas y unidades de frío por mes y acumuladas entre mayo y diciembre de 2005. Datos elaborados por la Dirección de Agricultura y Contingencias Climáticas del Gobierno de Mendoza. Estación Meteorológica EEA La Consulta INTA.

Fecha	Horas Frío*	Unidades Frío**	Horas Frío Acumuladas	Unidades Frío Acumuladas
05-2005	322,0	299,5	322,0	299,5
06-2005	438,0	437,0	760,0	736,5
07-2005	433,0	328,0	1193,0	1064,5
08-2005	376,0	384,0	1569,0	1448,5
09-2005	294,0	233,0	1863,0	1681,5
10-2005	72,0	0,0	1935,0	1681,5
11-2005	13,0	0,0	1948,0	1681,5
12-2005	5,0	0,0	1953,0	1681,5

* Horas por debajo de 7°C
 ** Unidades Frío Richardson, Universidad de Utah, EEUU.

I.3. Datos climáticos correspondientes al período 2006.

Tabla I.3.1: temperaturas media, máxima media, mínima media, máxima absoluta y mínima absoluta por mes para el año 2006. Datos de la Estación Meteorológica de la EEA La Consulta INTA.

Meses	Temperatura Media Mensual (°C)	Temperatura Máxima Med. Mensual (°C)	Temperatura Mínima Med. Mensual (°C)	Temperatura Máxima Absoluta (°C)	Temperatura Mínima Absoluta (°C)
Enero	23,4	32,2	14,5	37,9	9,1
Febrero	20,2	29,9	13,4	34,3	4,9
Marzo	18,0	27,4	8,7	33,1	1,9
Abril	14,2	22,8	5,6	28,3	-0,8
Mayo	9,3	16,7	1,6	23,2	-4,4
Junio	7,9	14,9	0,4	19	-2,9
Julio	8,6	15,5	1,2	26,5	-3,5
Agosto	9,4	17,4	1,4	27,1	-5,0
Setiembre	11,6	20,0	3,2	27,1	-4,7
Octubre	15,9	24,5	7,4	33,1	1,0
Noviembre	18,5	27,5	9,6	34,9	3,7
Diciembre	21,8	30,8	13,2	36,1	5,5

Tabla I.3.2: horas y unidades de frío por mes y acumuladas entre mayo y diciembre de 2006. Datos elaborados por la Dirección de Agricultura y Contingencias Climáticas del Gobierno de Mendoza. Estación Meteorológica EEA La Consulta INTA.

Fecha	Horas Frío*	Unidades Frío**	Horas Frío Acumuladas	Unidades Frío Acumuladas
05-2006	295,0	355,0	295,0	355,0
06-2006	327,0	397,5	622,0	752,5
07-2006	378,0	370,5	1000,0	1123,0
08-2006	335,0	288,5	1335,0	1411,5
09-2006	200,0	170,5	1535,0	1582,0
10-2006	33,0	0,0	1568,0	1582,0
11-2006	14,0	0,0	1582,0	1582,0
12-2006	0,0	0,0	1582,0	1582,0

* Horas por debajo de 7°C
 ** Unidades Frío Richardson, Universidad de Utah, EEUU.

I.4. Datos climáticos correspondientes al período 2007.

Tabla I.4.1: temperaturas media, máxima media, mínima media, máxima absoluta y mínima absoluta por mes para el año 2007. Datos de la Estación Meteorológica de la EEA La Consulta INTA.

Meses	Temperatura Media Mensual (°C)	Temperatura Máxima Med. Mensual (°C)	Temperatura Mínima Med. Mensual (°C)	Temperatura Máxima Absoluta (°C)	Temperatura Mínima Absoluta (°C)
Enero	22,8	31,0	14,6	35,5	7,9
Febrero	20,9	29,5	12,3	36,7	1,9
Marzo	18,6	25,9	10,9	31,9	7,0
Abril	14,0	21,9	6,1	28	0,4
Mayo	7,4	14,5	0,1	21,7	-4,4
Junio	6,2	14,9	-2,6	22,0	-6,5
Julio	4,9	13,0	-3,3	24,7	-11,0
Agosto	4,2	11,4	-3,0	21,1	-7,1
Setiembre	11,4	20,3	3,3	29,5	-2,6
Octubre	15,6	24,5	6,7	34,0	1,9
Noviembre	17,9	27,0	8,7	34,0	1,6
Diciembre	18,8	27,3	10,3	36,1	5,5

Tabla I.4.2: horas y unidades de frío por mes y acumuladas entre mayo y diciembre de 2007. Datos elaborados por la Dirección de Agricultura y Contingencias Climáticas del Gobierno de Mendoza. Estación Meteorológica EEA La Consulta INTA.

Fecha	Horas Frío*	Unidades Frío**	Horas Frío Acumuladas	Unidades Frío Acumuladas
05-2007	394,0	337,0	394,0	337,0
06-2007	487,0	289,0	881,0	626,0
07-2007	478,0	297,5	1359,0	923,5
08-2007	564,0	253,5	1923,0	1177,0
09-2007	187,0	188,5	2110,0	1365,5
10-2007	59,0	0,0	2169,0	1365,5
11-2007	34,0	0,0	2203,0	1365,5
12-2007	4,0	0,0	2207,0	1365,5

* Horas por debajo de 7°C

** Unidades Frío Richardson, Universidad de Utah, EEUU.

I.5. Datos climáticos correspondientes al período 2008.

Tabla I.5.1: temperaturas media, máxima media, mínima media, máxima absoluta y mínima absoluta por mes para el año 2008. Datos de la Estación Meteorológica de la EEA La Consulta INTA.

Meses	Temperatura Media Mensual (°C)	Temperatura Máxima Med. Mensual (°C)	Temperatura Mínima Med. Mensual (°C)	Temperatura Máxima Absoluta (°C)	Temperatura Mínima Absoluta (°C)
Enero	21,0	30,1	14,3	36,7	6,7
Febrero	21,1	29,3	12,8	34,3	8,5
Marzo	18,5	25,6	11,3	31,3	8,5
Abril	14,1	23,2	5,1	28,6	-2,9
Mayo	10,2	18,4	1,6	26,8	-6,5
Junio	6,4	14,4	-1,7	23,2	-5,6
Julio	7,9	16,8	-0,8	24,7	-4,1
Agosto	8,0	16,9	-0,6	28,6	-6,8
Setiembre	10,9	19,2	3,3	28,6	-2,3
Octubre	15,3	23,9	6,6	30,7	0,4
Noviembre	20,9	30,2	11,7	35,5	2,8
Diciembre	19,9	27,3	12,4	34,9	8,8

Tabla I.5.2: horas y unidades de frío por mes y acumuladas entre mayo y diciembre de 2008. Datos elaborados por la Dirección de Agricultura y Contingencias Climáticas del Gobierno de Mendoza. Estación Meteorológica EEA La Consulta INTA.

Fecha	Horas Frío*	Unidades Frío**	Horas Frío Acumuladas	Unidades Frío Acumuladas
05-2008	305,0	208,5	305,0	208,5
06-2008	482,0	330,5	787,0	539,0
07-2008	402,0	355,0	1189,0	894,0
08-2008	364,0	317,5	1553,0	1211,5
09-2008	218,0	195,5	1771,0	1407,0
10-2008	44,0	0,0	1815,0	1407,0
11-2008	7,0	0,0	1822,0	1407,0
12-2008	0,0	0,0	1822,0	1407,0

* Horas por debajo de 7°C
 ** Unidades Frío Richardson, Universidad de Utah, EEUU.

ANEXO II

ANÁLISIS DE VARIANCIA Y PRUEBAS DE

DIFERENCIAS DE MEDIAS

II.1. Análisis de Varianza y Pruebas de Duncan. Primer año, primer fecha de siembra
(3/3/04).

Variable: días a 50 % entallamiento

N	R ²	R ² Aj	CV
23	0,91	0,83	1,86

Tabla II.1.1: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% entallamiento. Siembra 3/3/04.

Fuente	Suma	Grados	Cuadrado	F	valor p
Variación	Cuadrados	libertad	Medio		
Modelo	2000,5	10	200,1	12,05	0,0001
bloque	64,89	2	32,44	1,95	0,1842
genotipo	1935,6	8	242	14,58	<0,0001
Error	199,19	12	16,6		
Total	2199,7	22			

Tabla II.1.2: Prueba Duncan para variable días a 50% entallamiento. Siembra 3/3/04. (α :0,05 Error:16,6 gl:12)

Genotipo	Medias	n			
A4	211	3	A		
A3	212	3	A		
A2	213	3	A		
B2xA2	215	3	A		
B2xA4	216	2	A		
B2xA3	216	2	A		
A1	218	2	A	B	
B1xA1	226	2		B	
B2	241	3			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 100 % entallamiento

N	R ²	R ² Aj	CV
24	0,69	0,49	2,39

Tabla II.1.3: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 100% entallamiento. Siembra 3/3/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	924,17	9	102,7	3,49	0,0181
bloque	31	2	15,5	0,53	0,602
genotipo	893,17	7	127,6	4,33	0,0095
Error	412,33	14	29,45		
Total	1336,5	23			

Tabla II.1.4: Prueba Duncan para variable días a 100% entallamiento. Siembra 3/3/04. (α :0,05 Error:29,5 gl:14)

Genotipo	Medias	n			
A4	214	3	A		
B2xA4	222	3	A	B	
A3	225	3		B	C
A2	228	3		B	C
A1	229	3		B	C
B2xA3	231	3		B	C
B2xA2	232	3		B	C
B1xA1	234	3			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 50 % primordios

N	R ²	R ² Aj	CV
27	0,89	0,82	1,89

Tabla II.1.5: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% primordios. Siembra 3/3/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	2587,7	10	258,8	12,63	<0,0001
bloque	37,63	2	18,81	0,92	0,4191
genotipo	2550,1	8	318,8	15,56	<0,0001
Error	327,7	16	20,48		
Total	2915,4	26			

Tabla II.1.6: Prueba Duncan para variable días a 50% primordios. Siembra 3/3/04. (α :0,05 Error:20,5 gl:16)

Genotipo	Medias	n			
A4	229	3	A		
A3	234	3	A	B	
A2	236	3	A	B	
A1	236	3	A	B	
B2xA4	236	3	A	B	
B2xA3	237	3	A	B	
B2xA2	242	3		B	C
B1xA1	246	3			C
B2	264	3			D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: **días a 100 % primordios**

N	R ²	R ² Aj	CV
24	0,69	0,49	2,55

Tabla II.1.7: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 100% primordios. Siembra 3/3/04.

Fuente	Suma	Grados	Cuadrado		
Variación	Cuadrados	libertad	Medio	F	valor p
Modelo	1262,6	9	140,3	3,49	0,0181
bloque	116,58	2	58,29	1,45	0,2677
genotipo	1146	7	163,7	4,07	0,0122
Error	562,75	14	40,2		
Total	1825,3	23			

Tabla II.1.8: Prueba Duncan para variable días a 100% primordios. Siembra 3/3/04. (α :0,05 Error:40,2 gl:14)

Genotipo	Medias	n			
B2xA4	241	3	A		
A1	241	3	A		
A4	242	3	A		
A2	246	3	A		
A3	248	3	A	B	
B2xA2	253	3	A	B	
B1xA1	259	3		B	
B2xA3	259	3		B	

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 50 % floración

N	R ²	R ² Aj	CV
22	0,78	0,57	2,07

Tabla II.1.9: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% floración. Siembra 3/3/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	1134,8	10	113,5	3,83	0,0186
bloque	114,71	2	57,36	1,94	0,1901
genotipo	1020,1	8	127,5	4,31	0,0142
Error	325,58	11	29,6		
Total	1460,4	21			

Tabla II.1.10: Prueba Duncan para variable días a 50% floración. Siembra 3/3/04. (α :0,05 Error:29,6 gl:11)

Genotipo	Medias	n			
B2xA3	254	2	A		
A4	257	3	A		
B2xA4	258	3	A		
A3	258	1	A		
A2	259	3	A		
A1	261	1	A	B	
B2xA2	263	3	A	B	
B1xA1	273	3		B	C
B2	277	3			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 100 % floración

N	R ²	R ² Aj	CV
24	0,72	0,54	1,42

Tabla II.1.11: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 100% floración. Siembra 3/3/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	535,88	9	59,54	4,03	0,01
bloque	73,58	2	36,79	2,49	0,119
genotipo	462,29	7	66,04	4,46	0,0084
Error	207,08	14	14,79		
Total	742,96	23			

Tabla II.1.12: Prueba Duncan para variable días a 100% floración. Siembra 3/3/04. (α :0,05 Error:14,8 gl:14)

Genotipo	Medias	n		
A2	267	3	A	
A1	267	3	A	
A4	267	3	A	
B2xA4	269	3	A	
B2xA3	272	3	A	
A3	272	3	A	
B2xA2	274	3	A	B
B1xA1	281	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

II.2. Análisis de Varianza y Pruebas de Duncan. Primer año, segunda fecha de siembra (20/4/04).

Variable: días a 50 % entallamiento

N	R ²	R ² Aj	CV
22	0,5	0,19	4,42

Tabla II.2.1: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% entallamiento. Siembra 20/4/04.

Fuente	Suma	Grados	Cuadrado		
Variación	Cuadrados	libertad	Medio	F	valor p
Modelo	949,4	9	105,49	1,56	0,2319
bloque	47,14	2	23,57	0,35	0,7123
genotipo	902,3	7	128,9	1,91	0,1553
Error	810,6	12	67,55		
Total	1760	21			

Tabla II.2.2: Prueba Duncan para variable días a 50% entallamiento. Siembra 20/4/04. (α :0,05 Error:67,5 gl:12)

Genotipo	Medias	n		
A3	176	3	A	
B2xA3	178	3	A	B
A1	179	2	A	B
A2	185	3	A	B
B2xA4	188	2	A	B
A4	190	3	A	B
B2xA2	192	3	A	B
B1xA1	194	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 100 % entallamiento

N	R ²	R ² Aj	CV
23	0,7	0,5	5,5

Tabla II.2.3: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 100% entallamiento. Siembra 20/4/04.

Fuente	Suma	Grados	Cuadrado		
Variación	Cuadrados	libertad	Medio	F	valor p
Modelo	3968	9	440,86	3,46	0,0212
Bloque	840,1	2	420,04	3,3	0,0693
genotipo	3128	7	446,81	3,51	0,0243
Error	1655	13	127,28		
Total	5622	22			

Tabla II.2.4: Prueba Duncan para variable días a 100% entallamiento. Siembra 20/4/04. (α :0,05 Error:127,3 gl:13)

Genotipo	Medias	n		
A3	187	3	A	
A1	187	2	A	
A2	199	3	A	B
B2xA4	202	3	A	B
A4	209	3	A	B
B2xA2	216	3		B
B1xA1	217	3		B
B2xA3	219	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 50 % primordios

N	R ²	R ² Aj	CV
22	0,4	0,01	3,99

Tabla II.2.5: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% primordios. Siembra 20/4/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	635,6	9	70,63	1,03	0,4681
Bloque	21,29	2	10,64	0,16	0,8576
genotipo	614,4	7	87,76	1,28	0,3359
Error	821	12	68,41		
Total	1457	21			

Tabla II.2.6: Prueba Duncan para variable días a 50% primordios. Siembra 20/4/04. (α :0,05 Error:68,4 gl:12)

Genotipo	Medias	n		
A1	191	2	A	
A3	201	3	A	B
A2	203	3	A	B
B2xA3	206	3	A	B
A4	209	3		B
B2xA4	210	2		B
B2xA2	211	3		B
B1xA1	213	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 100 % primordios

N	R ²	R ² Aj	CV
23	0,8	0,58	3,77

Tabla II.2.7: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 100% primordios. Siembra 20/4/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	2823	9	313,67	4,4	0,0082
Bloque	518,3	2	259,14	3,63	0,0558
genotipo	2305	7	329,25	4,62	0,0085
Error	927	13	71,3		
Total	3750	22			

Tabla II.2.8: Prueba Duncan para variable días a 100% primordios.
Siembra 20/4/04. (α :0,05 Error:71,3 gl:13)

Genotipo	Medias	n		
A1	204	2	A	
A3	209	3	A	
A2	217	3	A	B
B2xA4	229	3		B
B1xA1	229	3		B
A4	229	3		B
B2xA2	234	3		B
B2xA3	234	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 50 % floración

N	R ²	R ² Aj	CV
22	0,3	0	3,59

Tabla II.2.9: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% floración. Siembra 20/4/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	418	9	46,44	0,66	0,729
bloque	21,5	2	10,75	0,15	0,8598
genotipo	396,5	7	56,64	0,81	0,5983
Error	843,1	12	70,26		
Total	1261	21			

Tabla II.2.10: Prueba Duncan para variable días a 50% floración.
Siembra 20/4/04. (α :0,05 Error:70,3 gl:12)

Genotipo	Medias	n	
A1	225	2	A
A3	228	3	A
B2xA3	229	3	A
A4	234	3	A
B2xA4	236	2	A
B2xA2	236	3	A
B1xA1	238	3	A
A2	238	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 100 % floración

N	R ²	R ² Aj	CV
23	0,8	0,58	2,8

Tabla II.2.11: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 100% floración. Siembra 20/4/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	1878	9	208,69	4,43	0,0079
bloque	270	2	134,99	2,87	0,0931
genotipo	1608	7	229,75	4,88	0,0068
Error	612,2	13	47,1		
Total	2490	22			

Tabla II.2.12: Prueba Duncan para variable días a 100% floración. Siembra 20/4/04. (α :0,05 Error:47,1 gl:13)

Genotipo	Medias	n			
A1	229	2	A		
A3	235	3	A		
A2	237	3	A	B	
B2xA4	249	3		B	C
A4	250	3		B	C
B2xA3	250	3		B	C
B2xA2	252	3			C
B1xA1	255	3			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

II.3. Análisis de Varianza y Pruebas de Duncan. Primer año, tercer fecha de siembra (4/6/04).

Variable: días a 50 % entallamiento

N	R ²	R ² Aj	CV
19	0,56	0,21	5,52

Tabla II.3.1: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% entallamiento. Siembra 4/6/04.

Fuente	Suma	Grados	Cuadrado		
Variación	Cuadrados	libertad	Medio	F	valor p
Modelo	963,3	8	120,41	1,59	0,2407
bloque	103,25	2	51,63	0,68	0,527
genotipo	860,05	6	143,34	1,9	0,1769
Error	755,33	10	75,53		
Total	1718,6	18			

Tabla II.3.2: Prueba Duncan para variable días a 50% entallamiento. Siembra 4/6/04. (α :0,05 Error:75,5 gl:10)

Genotipo	Medias	n		
A3	146,33	3	A	
A1	147	1	A	
A2	154	3	A	B
B2xA3	158,33	3	A	B
B2xA2	159,67	3	A	B
A4	164,33	3	A	B
B1xA1	166,33	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 50 % primordios

N	R ²	R ² Aj	CV
19	0,83	0,69	2,25

Tabla II.3.3: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% primordios. Siembra 4/6/04.

Fuente	Suma	Grados	Cuadrado		
Variación	Cuadrados	libertad	Medio	F	valor p
Modelo	741,87	8	92,73	6	0,0054
bloque	68,92	2	34,46	2,23	0,1582
genotipo	672,94	6	112,16	7,26	0,0034
Error	154,56	10	15,46		
Total	896,42	18			

Tabla II.3.4: Prueba Duncan para variable días a 50% primordios. Siembra 4/6/04. (α :0,05 Error:15,5 gl:10)

Genotipo	Medias	n				
A1	161	1	A			
A3	167,67	3	A	B		
A2	169	3	A	B	C	
B2xA3	175	3		B	C	D
B2xA2	176,33	3			C	D
A4	179,67	3				D
B1xA1	183	3				D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: días a 50 % floración

N	R ²	R ² Aj	CV
19	0,82	0,68	2,02

Tabla II.3.5: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable días a 50% floración. Siembra 4/6/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	730,9	8	91,36	5,82	0,006
bloque	66,36	2	33,18	2,11	0,1714
genotipo	664,54	6	110,76	7,06	0,0038
Error	156,89	10	15,69		
Total	887,79	18			

Tabla II.3.6: Prueba Duncan para variable días a 50% floración. Siembra 4/6/04. (α :0,05 Error:15,7 gl:10)

Genotipo	Medias	n				
A1	184	1	A			
A3	189,67	3	A	B		
A2	191,67	3	A	B		
B2xA2	195,67	3		B	C	
B2xA3	196	3		B	C	
A4	202	3			C	D
B1xA1	205,67	3				D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Variable: % plantas sin entallar

N	R ²	R ² Aj	CV
25	0,95	0,92	34

Tabla II.3.7: Cuadro de Análisis de la Varianza para variable % plantas sin entallar. Siembra 4/6/04.

Fuente Variación	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	F	valor p
Modelo	37016	10	3701,6	29,1	<0,0001
bloque	386,58	2	193,29	1,52	0,2533
genotipo	36630	8	4578,7	35,9	<0,0001
Error	1783,4	14	127,39		
Total	38800	24			

Tabla II.3.8: Prueba Duncan para variable % plantas sin entallar. Siembra 4/6/04. (α :0,05 Error:127,4 gl:14)

Genotipo	Medias	n		
A1	0	1	A	
A3	0	3	A	
B2xA2	6,8	3	A	
A2	11,97	3	A	B
A4	13,33	3	A	B
B2xA3	14,43	3	A	B
B1xA1	29,93	3		B
B2	100	3		C
B1	100	3		C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

II.4. Prueba de Duncan. Tercer año, datos pre-entallamiento.

Tabla II.4.1. Medias por genotipo para las variables peso de planta, largo de hojas, largo de raíces, número de hojas y relación parte aérea / raíces.

Genotipo	Peso planta (g)		Largo hojas (cm)		Largo raíces (cm)		Número hojas		Relación hojas/raíz
F2a	0,34	a	5,69	b	6,98	a	5,38	ab	3,00
B2	0,36	a	3,70	a	9,40	ab	6,00	ab	1,33
F2b	0,43	ab	5,09	ab	8,96	ab	5,50	ab	1,83
B1 x A1	0,46	ab	4,40	ab	9,94	b	6,00	ab	1,44
B1	0,68	abc	3,42	a	9,24	ab	6,20	ab	0,60
B2 x A2	0,78	bc	7,32	c	11,0	b	5,8	ab	2,33
A2	0,90	c	7,88	c	11,1	b	6,25	b	1,69
B2 x A3	0,93	c	8,00	c	10,6	b	5,25	a	2,36
Criolla INTA	0,95	c	7,75	c	9,75	b	7,25	c	3,75

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

ANEXO III
PROTOCOLOS UTILIZADOS EN LABORATORIO

III.1. Protocolo básico utilizado para las reacciones en cadena de polimerasa con cebadores degenerados

Preparación de reacción para amplificar:

Componente	Cantidad
Buffer para PCR 10x sin Magnesio	1,5 µl
dNTP 2,5 mM	1,2 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,43 µl
Taq polimerasa	0,2 µl
H ₂ O	4,67 µl
Cebador 1 (5 µM)	1 µl
Cebador 2 (5 µM)	1 µl
ADN (10 ng)	3 µl

Programa de PCR: 2 minutos a 94°C
 30 segundos a 94°C
 1 minuto a X°C
 2,5 minuto a 71°C
 5 minutos a 72°C
 mantener a 4°C

} 34 ciclos

III.2. Protocolo para secuenciación directa de ADN

1. Reacción de PCR con ADN purificado. Se utilizan como cebadores los que dieron origen a la banda amplificada de interés, con su correspondiente temperatura de templado.

Preparación de reacción para amplificar:

Componente	Cantidad
Buffer para PCR 10x sin Magnesio	1,5 µl
dNTP 2,5 mM	1,2 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,43 µl
ExTaq polimerasa	0,2 µl
H ₂ O	2,67 µl
Cebador 1 (5 µM)	1 µl
Cebador 2 (5 µM)	1 µl
ADN	5 µl

Programa de PCR: 2 minutos a 94°C
 30 segundos a 94°C
 1 minuto a X°C
 2,5 minutos a 72°C
 5 minutos a 72°C
 mantener a 4°C

} 29 ciclos

2. Purificación de la reacción de PCR

A 10 μ l de la reacción de PCR se le agrega 2 μ l de Fosfatasa Alcalina Shrimp (1 U/ μ l) y 0,5 μ l de Exonucleasa I (20 U/ μ l, Fermentas). Mezclar e incubar durante 30 minutos a 37°C. Inactivar a 80°C durante 15 minutos.

3. Reacción de secuenciación.

Se realizan dos reacciones por cada muestra de ADN, una con el cebador 1 y otra con el cebador 2.

Preparación mezcla: 3,5 μ l de H₂O; 1,5 μ l de 2,5x Buffer (pH 9, 200 mM Tris, 5 mM MgCl₂); 2 μ l del cebador (1 o 2); 1 μ l de Big Dye y 2 μ l de ADN.

Programa PCR: 25 ciclos [10 minutos a 96°C, 2 minutos a 58°C] , 5 minutos a 72°C, mantener a 4°C.

Limpieza de la mezcla y envío a un secuenciador.

III.3. Protocolo para secuenciación de ADN mediante transformación de *E. coli*

1. Inserción del ADN dentro del plásmido pGEM-T (Promega):

Preparar la siguiente mezcla: 5 μ l del Buffer de ligación rápida 2x, 1 μ l del plásmido pGEM-T (50 ng/ μ l) y 1 μ l de T4 ADN Ligasa (3u/ μ l).

Agitar la mezcla suavemente y agregarle 3 μ l del ADN purificado. Dejar reposar durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

2. Transformación de células de *E. coli* con el plásmido y siembra en medio de cultivo:

Colocar, en un microtubo de 1,5 ml, 100 μ l de células de *E. coli* recién descongeladas (conservación a -80°C) con 10 μ l del plásmido preparado previamente, mezclar generosamente con micropipeta y colocar inmediatamente en hielo. Incubar los microtubos durante exactamente 50 segundos en un baño a 42°C. Luego volver a colocar los microtubos en hielo durante 10 minutos. Agregar 900 μ l de SOC*. Incubar con agitación a 37°C durante 1 hora y media.

En cajas de Petri, con medio de agar LB + ampicilina + X-gal**, colocar 300 μ l de la mezcla anteriormente preparada. Incubar las cajas de petri (boca abajo) a 37°C durante toda la noche.

* SOC (1000 ml)= 20 g Triptona
 5 g Extracto de levadura
 0,58 g Cloruro de Sodio (10 mM)
 0,19 g Cloruro dePotasio (2.5 mM)
 Ajustar a pH 7.0 con NaOH
 Autoclavar
 10 ml MgCl₂ 1 M (10 mM)
 10 ml MgSO₄ 1 M (10 mM)
 18 ml glucosa 20%

** LB (Lennox), 500 ml (5 g Triptona, 2,5 g Extracto de levadura, 2,5 g Cloruro de sodio, ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio, 6,0 g de Agar)
 1 ml de ampicilina (50 mg/ml)
 800 µl de X-gal (80 µg/ml)

3. Repique de colonias y reacción de PCR.

Luego de la incubación, aparecerán en la caja de petri colonias de *E. coli* blancas y azules. Las colonias blancas son las que tienen el plásmido inserto. Con un elemento punzante estéril se toca una colonia y se lleva a un microtubo con 5 µl de agua estéril. Se agrega ExTaq polimerasa (0,2 µl), Buffer para PCR 10x sin Magnesio (1,5 µl), dNTP 2,5 mM (1,2 µl), MgCl₂ 25 mM (2,43 µl), Cebador SP6 (1 µl), Cebador T7 (1 µl) y H₂O (2,67) µl. Programa de PCR: 2 minutos a 94°C

30 segundos a 94°C	} 29 ciclos
1 minuto a 50°C	
2,5 minutos a 72°C	
5 minutos a 72°C	
mantener a 4°C	

4. Purificación de la reacción de PCR

A 10 µl de la reacción de PCR se le agrega 2 µl de Fosfatasa Alcalina Shrimp (1 U/µl) y 0,5 µl de Exonucleasa I (20 U/µl, Fermentas). Mezclar e incubar durante 30 minutos a 37°C. Inactivar a 80°C durante 15 minutos.

5. Reacción de secuenciación.

Se realizan dos reacciones por cada muestra de ADN, una con el cebador SP6 y otra con el cebador T7.

Preparación mezcla: 3,5 µl de H₂O; 1,5 µl de 2,5x Buffer (pH 9, 200 mM Tris, 5 mM MgCl₂); 2 µl del cebador (SP6 o T7); 1 ul de Big Dye y 2 µl de ADN.

Programa PCR: 25 ciclos [10 minutos a 96°C, 2 minutos a 58°C] , 5 minutos a 72°C, mantener a 4°C.

Limpieza de la mezcla y envío a un secuenciador.

III.4. Protocolo para utilización de marcadores microsátélites

Preparación de reacción para amplificar:

Componente	Cantidad
Buffer para PCR 10x sin Magnesio	1,5 µl
dNTP 2,5 mM	1,2 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,43 µl
Taq polimerasa	0,2 µl
H ₂ O	4,67 µl
Cebador 1 (5 µM)	1 µl
Cebador 2 (5 µM)	1 µl
ADN (10 ng)	3 µl

Programa de PCR: 5 minutos a 94°C
20 segundos a 94°C
1 minuto a 50°C
1 minuto a 71°C
5 minutos a 72°C
mantener a 4°C

} 40 ciclos

Elaboración de geles de agarosa para separar las bandas de ADN amplificadas: los geles fueron elaborados con una concentración de 2% agarosa SFR (de alta resolución) o 3% de agarosa común en el buffer TAE 1x. La agarosa y el buffer son colocados dentro de un erlenmeyer y luego mezclados en un microondas a máxima potencia durante aproximadamente 4 minutos, agitando cada 1 minuto para lograr la completa disolución de la agarosa. Inmediatamente se agrega Bromuro de etidio, se deja entibiar y se vuelca el contenido en moldes, para colocar luego los peines que forman las celdas de contención del ADN.

Buffer TAE 50x: 242 g de tris base, 57 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M (ph 8). Completar con agua destilada hasta llegar a 1 litro.

Electroforesis para separación de bandas: fueron utilizadas cubas de electroforesis horizontal, potencia de 190 volts durante 3 horas.

Documentación: se toma una foto digital del gel colocado en un transiluminador de rayos UV.

III.5. Protocolos para la utilización de marcadores SCAR

- **Marcador:** Y2

Descripción: SCAR proveniente de un fragmento de AFLP ligado al locus Y2.

Reference: J.M. Bradeen, P.W. Simon "Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y_2 locus to a simple, codominant PCR-based marker" *Theor Appl Genet* (1998) 97:960-967.

Cebadores: DJB1tot5a 5'-TAAAGTCGTATAGGAAGAACAT-3'

DJB1tot5b..... 5'-TGGATCATCAGAACTCAACT-3'

Reacción PCR: 30 ng ADN, 1 μ l de cada cebador (5 μ M), 0,2 μ l de Taq polimerasa, 1,5 μ l Buffer para PCR 10x sin Magnesio, 2,43 μ l MgCl 25 mM, 1,2 μ l dNTP 2,5 mM.

Programa PCR: 35 ciclos {95°C 0:30; 42°C 0:30; 72°C 1:00}

- **Marcador:** Q1/800

Descripción: SCAR proveniente de un fragmento de RAPD ligado al locus *Mj-1*.

Reference: Leonardo Ph.D. Thesis page 201

Cebadores: Q1/800 Forward 5'-GGA CGA TGG CCA GGG AAA GC-3'

Q1/800 Reverse 5'-AAC CAA GTC ACG CCA ACA GTA AAT-3'

Reacción PCR: 30 ng ADN, 1 μ l de cada cebador (5 μ M), 0,2 μ l de Taq polimerasa, 1,5 μ l Buffer para PCR 10x sin Magnesio, 2,43 μ l MgCl 25 mM, 1,2 μ l dNTP 2,5 mM.

Programa PCR: 94°C 2:00; 40 ciclos {94°C 0:30; 59°C 1:00; 60°C 2:00}; 72°C 7:00

- **Marcador:** Q1/800Flanking

Descripción: SCAR derivado regiones adyacentes al marcador Q1-800.

Cebadores: Q1-800 Rev-2 B.....5'-CCG CTT CTG CAA TCA GGT AGG C-3'

Q1-800 Rev-2L B RC.....5'-GAT TCA ATG AAA CTC AAG TCA TCC TTT TCG C-3'

Reacción PCR: 30 ng ADN, 1 μ l de cada cebador (5 μ M), 0,2 μ l de Taq polimerasa, 1,5 μ l Buffer para PCR 10x sin Magnesio, 2,43 μ l MgCl 25 mM, 1,2 μ l dNTP 2,5 mM.

Programa PCR: 94°C 5:00, 40 ciclos {94°C 0:20; 51°C 1:00; 71°C 1:00}; 72°C 5:00

- **Marcador:** Q6-500

Descripción SCAR proveniente de un fragmento de RAPD ligado al locus *Mj-I*.

Reference: Leonardo Thesis Table 4.1

Cebadores: Q6 TIPICO 5'.....5'-GAG CGC CTT GAT TGA TGC TGT GTT
GCC-3'

Q6 TIPICO 3'.....5'-GAG CGC CTT GGC AGC ATC GAT TAG
TAG-3'

Reacción PCR: 30 ng ADN, 1 µl de cada cebador (5 µM), 0,2 µl de Taq polimerasa,
1,5 µl Buffer para PCR 10x sin Magnesio, 2,43 µl MgCl 25 mM, 1,2 µl dNTP 2,5
mM.

Programa PCR: 94°C 2:00, 40 ciclos {94°C 0:30; 59°C 1:00; 71°C 1:30}; 68°C
10:00

- **Marcador:** Scar-AFLP3 from GGTCTT 471-4/H

Descripción: SCAR derivado de una banda de AFLP conservada.

Reference: Carlos Santos, Ph.D. thesis 2001 p 119 (Table 3.3) pp 178-179; Genetics
and Molecular Biology, 25, 2, 195-201 (2002)

Cebadores: Frag2Left 5'-TAACTTCTCATTCAATCTTTCTGGA-3'

Frag2Right 5'-TGCAGGTACTAGGTGAAGCTTAT-3'

Reacción PCR: 30 ng ADN, 1 µl de cada cebador (5 µM), 0,2 µl de Taq polimerasa,
1,5 µl Buffer para PCR 10x sin Magnesio, 2,43 µl MgCl 25 mM, 1,2 µl dNTP 2,5
mM.

Programa PCR: 35 ciclos {94°C 0:30; 56°C 0:40; 70°C 1:00}

- **Marcador:** PSY1

Descripción: phytoene synthase

Reference: Brian Just Ph.D. Thesis, Table 2.1

Cebadores: PSY-UPQ2..... 5'-ggaggaaaatatggtaggccagtttcac-3'

PSYcons..... 5'-gcatactcagcacaacttcgcc-3'

PCR Reaction: 30 ng ADN, 1 μ l de cada cebador (5 μ M), 0,2 μ l de Taq polimerasa, 1,5 μ l Buffer para PCR 10x sin Magnesio, 2,43 μ l MgCl 25 mM, 1,2 μ l dNTP 2,5 mM.

PCR Program: 94°C 2:00, 40 ciclos {94°C 0:30; 56°C 1:00; 71°C 1:30}; 68°C 10:00

III.6. Protocolo para utilización de marcadores RAPDs

Preparación de reacción para amplificar:

Componente	Cantidad
Buffer para PCR 10x sin Magnesio	1,5 μ l
dNTP 2,5 mM	1,2 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1,8 μ l
Taq polimerasa	0,2 μ l
H ₂ O	6,5 μ l
Cebador (5 μ M)	1 μ l
ADN (10 ng)	3 μ l

Programa de PCR: 2 minutos a 94°C
 30 segundos a 94°C
 1 minuto a 36°C
 1,5 minuto a 72°C
 7 minutos a 68°C
 mantener a 4°C

} 49 ciclos

Elaboración de geles de agarosa para separar las bandas de ADN amplificadas: los geles fueron elaborados con una concentración de 2% agarosa SFR (de alta resolución) o 3% de agarosa común en el buffer TAE 1x. La agarosa y el buffer son colocados dentro de un erlenmeyer y luego mezclados en un microondas a máxima potencia durante aproximadamente 4 minutos, agitando cada 1 minuto para lograr la completa disolución de la agarosa. Inmediatamente se agrega Bromuro de etidio, se deja entibiar y se vuelca el contenido en moldes, para colocar luego los peines que forman las celdas de contención del ADN.

Buffer TAE 50x: 242 g de tris base, 57 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M (ph 8). Completar con agua destilada hasta llegar a 1 litro.

Electroforesis para separación de bandas: fueron utilizadas cubas de electroforesis horizontal, potencia de 190 volts. El tiempo de corrida fue variable según el tamaño de las bandas.

Documentación: se toma una foto digital del gel colocado en un transiluminador de rayos UV.

III.7. Cebadores RAPDs utilizados

Nombre*	Secuencia (5' - 3')
UBC-231	AGGGAGTTCC
UBC-242	CACTCTTTGC
UBC-252	CTGGTGATGT
UBC-257	CGTCACCGTT
UBC-299	TGTCAGCGGT
UBC-306	GTCCTCGTAG
UBC-318	CGGAGAGCGA
UBC-388	CGGTCGCGTC
UBC-450	CGGAGAGCCC
UBC-469	CTCCAGCAAA
UBC-523	ACAGGCAGAC
UBC-551	GGAAGTCCAC
UBC-592	GGGCGAGTGC
UBC-600	GAAGAACC GC
UBC-617	CGGACTATGT
UBC-618	CGGACTATGT
UBC-641	TGGAACCATG
UBC-642	GTGGTCTCGA
UBC-652	CCCAACACAC
OP E-01	CCCAAGGTCC
OP E-02	GGTGCGGGAA
OP E-03	CCAGATGCAC
OP E-04	GTGACATGCC
OP E-05	TCAGGGAGGT
OP E-07	AGATGCAGCC
OP E-08	TCACCACGGT
OP E-09	CTTCACCCGA
OP E-10	CACCAGGTGA
OP E-11	GAGTCTCAGG
OP E-12	TTATCGCCCC
OP E-13	CCCATTTCGG
OP E-14	TGCGGCTGAG
OP E-15	ACGCACAACC
OP E-16	GGTGACTGTG
OP E-17	CTACTGCCGT
OP E-18	GGACTGCAGA
OP E-19	ACGGCGTATG

Nombre*	Secuencia (5' - 3')
OP G-19	GTCAGGGCAA
OP H-01	GGTCGGAGAA
OP H-20	GGGAGACATC
OP I-09	TGGAGAGCAG
OP M-01	GTTGGTGGCT
OP M-02	ACAACGCCTC
OP M-03	GGGGGATGAG
OP M-04	GGCGGTTGTC
OP M-05	GGGAACGTGT
OP M-06	CTGGGCAACT
OP M-07	CCGTGACTCA
OP M-08	TCTGTTCCCC
OP M-09	GTCTTGCGGA
OP M-10	TCTGGCGCAC
OP M-11	GTCCACTGTG
OP M-12	GGGACGTTGG
OP M-13	GGTGGTCAAG
OP M-14	AGGGTCGTTT
OP O-12	CAGTGCTGTG
OP T-18	GATGCCAGAC
OP U-15	ACGGGCCAGT
OP W-07	CTGGACGTCA
OPAA-01	AGACGGCTCC
OPAA-02	GAGACCAGAC
OPAA-04	AGGACTGCTC
OPAA-05	GGCTTTAGCC
OPAA-06	GTGGGTGCCA
OPAA-07	CTACGCTCAC
OPAA-08	TCCGCAGTAG
OPAA-09	AGATGGGCAG
OPAA-11	ACCCGACCTG
OPAA-12	GGACCTCTTG
OPAA-13	GAGCGTCGCT
OPAA-14	AACGGGCCAA
OPAA-16	GGAACCCACA
OPAA-17	GAGCCCGACT
OPAA-18	TGGTCCAGCC

Nombre*	Secuencia (5' - 3')
OPAE-08	CTGGCTCAGA
OPAE-09	TGCCACGAGG
OPAE-10	CTGAAGCGCA
OPAE-11	AAGACCGGGA
OPAE-12	CCGAGCAATC
OPAE-13	TGTGGACTGG
OPAE-14	GAGAGGCTCC
OPAQ-01	GGCAGGTGGA
OPAQ-02	ACCCTCGGAC
OPAQ-03	GAGGTGTCTG
OPAQ-04	GACGGCTATC
OPAQ-05	ACGGAGCTGA
OPAQ-06	ACGGATCCCC
OPAQ-07	GGAGTAACGG
OPAQ-09	AGTCCCCCTC
OPAQ-10	CATACCCTCC
OPAQ-11	GACGCCTCCA
OPAQ-12	CAGCTCCTGT
OPAQ-13	GAGTCGGCTG
OPAT-03	GACTGGGAGG
OPAT-04	TTGCCTCGCC
OPAT-05	ACACCTGCCA
OPAT-06	CCGTCCCTGA
OPAT-08	TCCTCGTGGG
OPAT-09	CCGTTAGCGT
OPAT-10	ACCTCCGGTC
OPAT-11	CCAGATCTCC
OPAT-12	CTGCCTAGCC
OPAT-13	CTGGTGGAA
OPAT-14	GTGCCGCACT
OPAT-15	TGACGCACGG
OPAU-01	GGGATGGAAC
OPAU-02	CCAACCCGCA
OPAU-03	ACGAAACGGG
OPAU-04	GGCTTCTGTG
OPAU-05	GAGCTACCGT
OPAU-06	TCTCTAGGGG

OP E-20	AACGGTGACC	OPAA-19	TGAGGCGTGT	OPAU-07	AGACCCTTGG
OP F-01	ACGGATCCTG	OPAA-20	TTGCCTTCGG	OPAU-08	CACCGATCCA
OP F-02	GAGGATCCCT	OPAB-02	GGA AACCCCT	OPAU-09	ACGGCCAATC
OP F-03	CCTGATCACC	OPAB-03	TGGCGCACAC	OPAU-10	GGCGTATGGT
OP F-04	GGTATCAGG	OPAB-05	CCCGAAGCGA	OPAU-11	CTTCTCGGTC
OP F-05	CCGAATTCCC	OPAB-07	GTA AACCGCC	OPAU-12	CCACTCGTGT
OP F-06	GGGAATTTCGG	OPAB-08	GTTACGGACC	OPAU-13	CCAAGCACAC
OP F-07	CCGATATCCC	OPAB-09	GGGCGACTAC	OPAU-14	CACCTCGACC
OP F-08	GGGATATCGG	OPAB-10	TTCCCTCCCA	OPAU-15	TGCTGACGAC
OP F-09	CCAAGCTTCC	OPAB-11	GTGCGCAATG	OPAU-17	TTGGCATCCC
OP F-10	GGAAGCTTGG	OPAB-12	CCTGTACCGA	OPAU-18	CACCACTAGG
OP F-11	TTGGTACCCC	OPAB-13	CCTACCGTGG	OPAU-20	GTGAAAACCC
OP F-12	ACGGTACCAG	OPAB-15	CCTCCTTCTC	OPAV-01	TGAGGGGGAA
OP F-13	GGCTGCAGAA	OPAB-17	TCGCATCCAG	OPAV-02	TCACCGTGTG
OP F-14	TGCTGCAGGT	OPAB-18	CTGGCGTGTG	OPAV-03	TGTAGCCGTG
OP F-15	CCAGTACTCC	OPAB-19	ACACCGATGG	OPAV-05	GTGAGCGTGG
OP F-16	GGAGTACTGG	OPAB-20	CTTCTCGGAC	OPAV-06	CCCAGATCC
OP F-17	AACCCGGGAA	OPAC-01	TCCCAGCAGA	OPAX-01	GTGTGCCGTT
OP F-18	TTCCCGGGTT	OPAC-02	GTCGTCGTCT	OPAX-02	GGGAGGCAAA
OP F-19	CCTCTAGACC	OPAC-03	CACTGGCCCA	OPAX-03	CCAAGAGGCT
OP F-20	GGTCTAGAGG	OPAC-04	ACGGGACCTG	OPAX-04	TCCCCAGGAG
OP G-01	CTACGGAGGA	OPAC-05	GTTAGTGCGG	OPAX-05	AGTGCACACC
OP G-02	GGCACTGAGG	OPAE-01	TGAGGGCCGT	OPAX-07	ACGCGACAGA
OP G-03	GAGCCCTCCA	OPAE-02	TCGTTACCCC	OPAX-08	AGTATGGCGG
OP G-04	AGCGTGCTG	OPAE-04	CCAGCACTTC	OPAX-09	GGAAGTCCTG
OP G-05	CTGAGACGGA	OPAE-05	CCTGTCAGTG	OPAX-10	CCAGGCTGAC
OP G-06	GTGCCTAACC			OPAX-11	TGATTGCGGG
OP G-07	GAACCTGCGG			OPAX-12	GGTCGGGTCA

* UBC corresponde a University British Columbia y OP a Operon

III.8. Protocolo para la utilización de marcadores AFLP

- Digestión del ADN

1. Preparación mezcla de reacción:

Componente	Cantidad para $\frac{1}{4}$ de reacción
Buffer de Reacción 5×	1,25 μ l
<i>Eco</i> R I + <i>Mse</i> I (1,25 u cada una/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	0,33 μ l
Volumen total	2,08 μ l

2. Mezclar 4,167 μ l de ADN (15 μ g/ μ l) y 2,08 μ l de reacción = 6,25 μ l.

3. Incubar 2 horas a 37°C, y luego inactivar las enzimas a 70°C durante 15 minutos.

- Elaboración del Buffer de Reacción 5× (10 ml):

Componente	Cantidad
Tris·Cl 1 M pH 7.5	500 µl
Acetato de magnesio 1 M	500 µl
Acetato de potasio 5 M	500 µl
Agua	8500 µl
Volumen Final	10000 µl

- Elaboración de la mezcla “*EcoR* I + *Mse* I” (80 µl):

Componente	Cantidad
Promega <i>EcoR</i> I, 80 u/µl	1,25 µl
NEB <i>Mse</i> I, 10 u/µl	10 µl
Buffer S	68,75 µl
Volumen Final	80 µl

- Elaboración del “Buffer S” (10 ml):

Componente	Cantidad
1 M Tris·Cl pH 7.4	100 µl
1 M NaCl	500 µl
0.5 M EDTA	2 µl
1 M DTT	10 µl
10 mg/ml BSA	100 µl
100% Glicerol	5000 µl
10% Triton X-100	100 µl
Agua	4188 µl
Volumen Final	10000 µl

- Ligación de adaptadores.

1. Preparación mezcla de reacción:

Componente	Cantidad para $\frac{1}{4}$ de reacción
Solución de Adaptadores	6 µl
T4 DNA Ligasa	0,25 µl
Volumen Total	6,25 µl

2. Agregar al producto digerido anteriormente (6,25 µl) 6,25 µl de la mezcla de reacción. Incubar a 20°C ± 2° durante 2 hours.
3. Diluir la reacción 10×: tomar 2,5 µl de la reacción y agregarle 22,5 µl de TE. Guardar todo a -20°C.

- Preparación de la Solución de Adaptadores:

Componente	Cantidad
Adaptador EA+ & EA- 100 μ M	5,208 μ l
Adaptador MA+ & MA- 100 μ M	5,208 μ l
ATP 100 mM	4 μ l
Tris·Cl pH 7.5 1 M	10 μ l
Acetato de Magnesio 1 M	10 μ l
Acetato de Potasio 5 M	10 μ l
Agua	955,583 μ l
Volumen Final	1000 μ l

- **Preamplificación.**

1. Preparación de la mezcla de reacción:

Componente	Cantidad para $\frac{1}{4}$ reacción
Mezcla de cebadores	10 μ l
Buffer PCR 10 \times AmpliTaq	1,25 μ l
AmpliTaQ polimerasa (5 u/ μ l)	0,055 μ l
Agua	0,195 μ l
Volumen Total	11,5 μ l

2. Colocar 1,25 μ l de la ligación diluida con 11,5 μ l de la mezcla de reacción en un tubo para PCR. Programa de PCR: 2 minutos a 94°C, 20 ciclos de [30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C].

3. Diluir la reacción resultante en 50 \times : tomar 1 μ l de la reacción y agregarle 49 μ l de TE. Guardar a -20°C.

- Preparación de la Mezcla de cebadores (1 ml):

Componente	Cantidad
Cebador P1 (500 ng/ μ l)	1,88 μ l
Cebador P2 (500 ng/ μ l)	1,88 μ l
dNTP (2,5 mM cada uno)	50 μ l
Agua	946,24 μ l
Volumen Final	1000 μ l

Cebador P1 = 5' - gac tgc gta cca att ca - 3'

Cebador P2 = 5' - gat gag tcc tga gta ac - 3'

- **Amplificación selectiva.**

1. Preparación mezcla de reacción:

Componente	Per $\frac{1}{2}$ reaction
Agua	3,983 μ l
Buffer PCR Amplitaq	1 μ l
AmpliTaQ polimerasa (5 u/ μ l)	0,018 μ l
Cebador <i>EcoR</i> I marcado	0,25 μ l
Cebador <i>Mse</i> I	2,25 μ l
Volumen Total	7,5 μ l

2. Colocar 2,5 μ l del ADN preamplificado diluido con 7,5 μ l de la mezcla de reacción en un tubo de PCR. Programa de PCR: 13 ciclos de [94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 60s] disminuyendo 0,7°C la temperatura de templado del cebador en cada ciclo, luego 23 ciclos de [94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 60s].

- Marcado radioactivo del cebador *EcoR* I.

Preparación de la mezcla de reacción:

Componente	Cantidad para $\frac{1}{2}$ reacción
Cebador <i>EcoR</i> I (27,8 ng/ μ l)	0,09 μ l
Agua	0,043 μ l
Buffer de KinasaPNT4	0,05 μ l
p33	0,05 μ l
Kinasa Polinucleótido T4	0,018 μ l
Volumen total	0,25 μ l

Incubar a 37°C durante 1 hora, luego inactivar la enzima a 70°C durante 10 minutos.

- Preparación del cebador *Mse* I

Componente	Cantidad
Cebador <i>Mse</i> I (500 ng/ μ l)	12,06 μ l
dATP 100 mM	8 μ l
dCTP 100 mM	8 μ l
dGTP 100 mM	8 μ l
dTTP 100 mM	8 μ l
Agua	856 μ l
Volumen Final	900 μ l

- **Elaboración de geles de poliacrilamida para separar las bandas de ADN amplificadas:**

1. Preparación de los vidrios que contendrán el gel: los vidrios nuevos son tratados con Hidróxido de Sodio 2M, inmersión durante al menos 1 hora. Luego de un lado de unos de los vidrios (el de menor longitud) se le aplica Rain-X (que es un repelente de humedad). Este proceso debe ser repetido cada 10 corridas electroforéticas.
2. Lavado de los vidrios con agua destilada y detergente, secado con papel tissue estéril, aplicación de alcohol 95 % en la superficie de los vidrios que estarán en contacto con el gel y posterior secado con papel tissue estéril. La aplicación de alcohol debe ser realizada 3 veces. El proceso completo se realiza antes de cada corrida.
3. Colocación de separadores entre los vidrios, a los costados y abajo. Sujeción de los vidrios con ganchos.
4. Preparación gel: colocar 12 ml de TBE 5× (Tris + Acido Bórico + EDTA), 13 ml de dH₂O y 27 g de urea en un erlenmeyer. Disolver en agitador magnético con calor. Luego agregar agua destilada hasta llegar a 51 ml. Filtrar. Agregar 9 ml de acrilamida al 40 %, 30 µl de TEMED y 320 µl de APS 10%. Mezclar suavemente e inmediatamente volcar el contenido dentro de los vidrios, evitando la formación de burbujas. Colocar el peine en la parte superior del gel y dejar secar durante 2 horas aproximadamente.

- **Electroforesis vertical para separación de bandas:**

1. Preparación de muestras: agregar 10 µl de buffer de formamida (10 ml de formamida desionizada, 10 mg de Cianol xileno FF, 10 mg Azul de bromofenol, 200 µl de EDTA 0,5 M pH 8) a la reacción amplificada. Desnaturalizar la muestra durante 3 minutos a 90°C y colocar inmediatamente en hielo hasta la siembra en el gel.
2. Luego de sembrar las muestras en el gel, realizar una corrida, en cuba vertical, a 60 watts durante 2 horas.

3. Sacar los vidrios con el gel de la cuba vertical, separar ambos vidrios con cuidado.

El gel quedará pegado en el vidrio más largo (sin Rain-X). Colocar un papel Whatman 3MM sobre el gel, presionar suavemente, el gel quedará pegado en el papel.

4. Colocar el papel con el gel a secar al vacío durante por lo menos 1 hora a 80°C.

- **Documentación:**

Colocar el papel con el gel en contacto con una radiografía dentro de un casete, durante 36 a 72 horas. Luego se revela la radiografía. Todo este proceso es realizado en un cuarto oscuro

III.9. Cebadores específicos utilizados en la técnica de AFLP

Nº	Cebador 1	Cebador 2
1	EAAC 5'-gac tgc gta cca att caa c -3'	MCTA 5'-gat gag tcc tga gta act a -3'
2	EAAC 5'-gac tgc gta cca att caa c -3'	MCAT 5'-gat gag tcc tga gta aca t -3'
3	EAAC 5'-gac tgc gta cca att caa c -3'	MCAA 5'-gat gag tcc tga gta aca a -3'
4	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCAG 5'-gat gag tcc tga gta aca g -3'
5	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCAA 5'-gat gag tcc tga gta aca a -3'
6	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCTA 5'-gat gag tcc tga gta act a -3'
7	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCTT 5'-gat gag tcc tga gta act t -3'
8	EACA 5'-gac tgc gta cca att cac a -3'	MCAA 5'-gat gag tcc tga gta aca a -3'
9	EACC 5'-gac tgc gta cca att cac c -3'	MCTA 5'-gat gag tcc tga gta act a -3'
10	EACC 5'-gac tgc gta cca att cac c -3'	MCAG 5'-gat gag tcc tga gta aca g -3'
11	EACA 5'-gac tgc gta cca att cac a -3'	MCAT 5'-gat gag tcc tga gta aca t -3'
12	EACA 5'-gac tgc gta cca att cac a -3'	MCAG 5'-gat gag tcc tga gta aca g -3'
13	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCAT 5'-gat gag tcc tga gta aca t -3'
14	EAAC 5'-gac tgc gta cca att caa c -3'	MCTT 5'-gat gag tcc tga gta act t -3'
15	EAAC 5'-gac tgc gta cca att caa c -3'	MCAG 5'-gat gag tcc tga gta aca g -3'
16	EAGG 5'-gac tgc gta cca att cag g -3'	MCTT 5'-gat gag tcc tga gta act t -3'
17	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCAC 5'-gat gag tcc tga gta aca c -3'
18	EAAG 5'-gac tgc gta cca att caa g -3'	MCTC 5'-gat gag tcc tga gta act c -3'
19	EAAC 5'-gac tgc gta cca att caa c -3'	MCAC 5'-gat gag tcc tga gta aca c -3'