

Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares SRAP para diferenciar variedades de *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae)

Use of morphological, biochemical and SRAP molecular markers to differentiate varieties of *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae)

María Andrea Espósito ¹

Vanina P. Cravero ²

Eugenia Martín ¹

Enrique L. Cointry ¹

Originales: Recepción: 22/02/2010 - Aceptación: 20/08/2011

RESUMEN

Dentro del complejo primario de *Cynara cardunculus* L. se encuentran diversas variedades botánicas: var. *scolymus* (alcaucil), var. *altilis* (cardo cultivado) y var. *sylvestris* (cardo silvestre). A lo largo de la historia del mejoramiento, la caracterización de los materiales ha evolucionado desde el uso de caracteres morfológicos hasta los modernos análisis moleculares, pasando por los marcadores bioquímicos. El objetivo del presente trabajo fue comparar la utilidad de los marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares para la caracterización de materiales pertenecientes a tres variedades botánicas de *Cynara cardunculus*. Tres cultivares de la var. *scolymus*, dos de la var. *altilis* y dos de la var. *sylvestris* fueron caracterizadas por variables morfovegetativas, proteínas de reserva y por marcadores moleculares a través de la técnica SRAP. Estas metodologías permitieron discriminar dos grupos: uno incluyendo las variedades de cardo cultivado y silvestre, y el otro, las variedades del alcaucil. Los datos moleculares y morfológicos permitieron además diferenciar los cultivares evaluados de la var. *scolymus*. Se concluye que los marcadores analizados son útiles para la caracterización intravarietal e intervarietal en programas de mejoramiento.

SUMMARY

In the *Cynara cardunculus* L. primary complex we can find a globe artichoke: *Cynara cardunculus* var. *scolymus* and other botanical varieties such as *C. cardunculus* var. *altilis* (cultivated cardoon) and *C. cardunculus* var. *sylvestris* (wild artichoke). Traditionally, they varieties were grouped according to morphological and biochemical traits and more recently, based on molecular markers. The aim of the present paper was to compare the use of morphological, biochemical and molecular markers to distinguish botanical varieties of *Cynara cardunculus*. Three accessions of var. *scolymus*, two accessions of var. *altilis* and two accessions of var. *sylvestris* were used. Different morphological variables, electrophoresis seed protein patterns by SDS-PAGE and SRAP markers were evaluated. The three kinds of markers grouped all materials in two clusters: one of them included the globe artichoke and the other the cardoons. SDS-PAGE is a valid technique for botanical varieties identification but the morphological and molecular data were more effective at discriminating botanical varieties and accessions within the *scolymus* group.

1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). C. C. 14. Zavalla. Santa Fe. Argentina. S2125ZAA. mesposi@unr.edu.ar

2 Genética y Mejoramiento Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. C. C. 14. Zavalla. Santa Fe. Argentina. S2125ZAA.

Palabras clave

Cynara cardunculus • variedades botánicas • marcadores morfológicos • proteínas de reserva • SRAP

Keywords

Cynara cardunculus • botanical varieties • morphological markers • seed protein • SRAP

INTRODUCCIÓN

El género *Cynara* (Asteraceae) es originario de Etiopía y Egipto, desde donde se habría difundido a Europa mediterránea y, de ahí, a América (15). Comprende aproximadamente ocho especies. *Cynara cardunculus* L. es un grupo taxonómico relativamente pequeño que incluye las variedades cultivadas *C. cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori y *C. cardunculus* var. *altilis* (cardo cultivado), como así también la maleza *C. cardunculus* var. *sylvestris* (17), las cuales son completamente interfértiles (14) constituyendo un complejo génico primario.

La mayor parte de los estudios comparativos y de variabilidad en esta especie ha sido realizada en base a caracteres morfológicos (5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16), los cuales sugieren una estrecha relación filogenética entre ellas (23), confirmada posteriormente por estudios citogenéticos (19) y datos moleculares (6).

La caracterización y evaluación no debe realizarse sólo a través de variables morfológicas que pueden depender de las condiciones ambientales; además, la mayoría de los caracteres de importancia económica sólo puede identificarse una vez que la planta haya comenzado su producción (aproximadamente un año después de la siembra). Esto genera grandes costos y la necesidad de mucha mano de obra (5), lo que impulsa la búsqueda de alternativas como el uso de marcadores proteicos y/o moleculares para acortar los plazos de caracterización.

El aquenio de alcaucil tiene un alto nivel de proteínas de reserva (16). Éstas son sintetizadas durante el crecimiento, almacenadas y finalmente hidrolizadas para el desarrollo del embrión durante la germinación. Su uso como herramienta para diferenciar cultivares se basa en que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes (5). En el género *Cynara* se ha realizado un estudio sobre variabilidad de las proteínas de reserva dentro y entre cultivares (19).

Por otro lado, la caracterización molecular, a través de marcadores de ADN (RAPD's, AFLP, SSR) resulta de suma utilidad al revelar el genotipo, independientemente del ambiente de cultivo (10, 11, 20, 21), teniendo cada uno de ellos diferentes grados de complejidad, costo, repetibilidad y capacidad para generar información (4).

La técnica denominada SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) ha sido reconocida como una herramienta útil, tanto para caracterización como para mapeo genético, siendo factible su aplicación para selección asistida por marcadores (MAS) (12). Esta técnica combina simplicidad, repetibilidad y está orientada a la amplificación de fragmentos de marco de lectura abiertos (ORFs). Se basa en la amplificación por dos cebadores: uno *forward* (F) con 17 pares de bases (pb) y otro

reverse (R) con 18 pb. El F consiste en una secuencia núcleo de 14 bases; las primeras 10, comenzando desde el extremo 5' son no específicas, seguidas por la secuencia CCGG para que hibride con exones (que normalmente son ricas en GC) y luego 3 nucleótidos selectivos en el extremo 3'. El R consiste en los mismos componentes que el F, sólo que la secuencia CCGG es reemplazada por AATT (a fin de que "reconozca" regiones ricas en AT, que normalmente se encuentran en promotores e intrones).

Las regiones exónicas están normalmente muy conservadas entre individuos, para incrementar el nivel de polimorfismo entre accesiones, por ende, se incluye *el primer reverse*. Como intrones, promotores y espaciadores son secuencias que generalmente se presentan menos conservadas entre individuos, es posible generar bandas polimórficas basadas en intrones y exones (10).

Objetivo

Comparar la utilización de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares en la caracterización de variedades de *Cynara cardunculus* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tres genotipos de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* multiplicables por semillas que se encuentran en el mercado nacional: Violeta Invernale (VI), Imperial Star (IS) y Estrella del Sur FCA (ES); dos genotipos de *C. cardunculus* var. *altilis*: Cardo Blanco (CB) y Cardo Semense (CS) y dos genotipos de *C. cardunculus* var. *sylvestris*: Maleza 9 (R9) y Maleza 2 (R2) fueron sembradas en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) (33° 01' S, 60° 53' O).

Caracterización morfológica

Al momento de cosecha y sobre 10 plantas de cada cultivar se evaluaron las variables altura y diámetro de la planta (cm), número de capítulos por planta, peso (g), diámetro y longitud del capítulo primario (cm), peso (g), diámetro y longitud promedio (cm) de capítulos de orden superior, color de los capítulos y presencia/ausencia de espinas. El color fue medido en una escala de 1-3 correspondiendo el valor 1 a la coloración verde, 2 a variegado y 3 a violeta (1). Para la presencia o ausencia de espinas se establecieron dos categorías: 1 presencia y 2 ausencia.

Caracterización por proteínas de reserva

El extracto proteico de 30 aquenios de cada cultivar se obtuvo mediante el uso de un buffer de extracción conteniendo: Tris-clorhídrico 0,125 M y SDS-Mg al 1%. Luego fue sometido a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) e incubado con Coomassie Blue para su tinción. La "ausencia" o "presencia" de banda se codificó como 0 y 1, respectivamente.

Caracterización molecular mediante SRAP

A partir de un pool de hojas jóvenes de distintas plantas de cada variedad elegidas al azar, se extrajo el ADN genómico utilizándose el kit "PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen)".

Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los fragmentos SRAP fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% (peso/volumen) y visualizados luego del revelado con nitrato de plata al 1% y evaluados como presentes (1) o ausentes (0).

Se analizaron siete combinaciones de cebadores, las cuales en estudios previos permitieron detectar altos niveles de polimorfismo entre variedades (6) (tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de cebadores (primers) usadas para generar datos moleculares.

Table 1. Primer sequences used to generate molecular data.

Primers F		Primers R	
Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'

Análisis de los datos

Para las variables morfológicas en estudio se calcularon, previa estandarización de los datos por no ser conmensurables, las distancias Euclídeas entre los genotipos. A partir de la matriz de distancia se realizó un análisis de conglomerados siguiendo un criterio de agrupamiento jerárquico a través del método de Ward, utilizando el software Info-Gen (2).

Para los datos moleculares y proteicos se utilizó la distancia de Dice y con ellas se construyeron sus dendrogramas respectivos a través del método de "mínima variancia de Ward" (22).

Para combinar en un mismo espacio la información brindada por marcadores morfológicos, moleculares y/o proteicos se realizó un análisis de Procrustes Generalizado (9), que permitió cuantificar el consenso entre las ordenaciones obtenidas por ambos grupos de variables.

Para ello se obtuvieron las componentes principales de los datos morfológicos estandarizados y las coordenadas principales para los datos moleculares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

Los valores medios de los datos morfológicos se muestran en la tabla 2 (pág. 39).

Tabla 2. Valores promedio para altura de planta (APL), diámetro de planta (DPL), número de capítulos por planta (N CAP), ancho (ACAP) y diámetro del capítulo primario (DCAP), peso del capítulo primario (PCAP), longitud (ASEC), diámetro (DSEC) y peso promedio (PSEC) de capítulos de orden superior, color del capítulo (COLOR) y presencia/ausencia de espinas (ESP) en cada cultivar de cada variedad.

Table 2. Means for plant height (PH) and diameter (PD) (cm), head number per plant (HN), length (LH) and diameter (DH) of the first head (cm), weight (WH) (g), length (LSEC) and diameter (DSEC) (cm) of superior order heads, weight (WSEC) of superior heads, head color (HC) and spines presence (S) in each cultivar.

Variedades	APL (cm)	DPL (cm)	N CAP	ACAP (cm)	DCAP (cm)	PCAP (g)	ASEC (cm)	DSEC (cm)	PSEC (g)	COLOR*	ESP**
ES	45,00	116,25	5,00	8,90	8,28	226,63	8,40	7,34	145,63	3,00	2,00
IS	55,56	120,44	4,78	8,24	9,07	255,78	7,34	7,63	150,00	1,00	2,00
VI	66,83	124,17	4,17	11,33	10,33	267,00	9,03	8,80	140,50	1,50	1,00
CB	128,83	194,50	9,67	4,42	4,75	47,00	4,15	4,57	42,17	1,50	2,00
CS	108,83	160,00	8,00	4,08	4,42	44,00	3,58	4,05	33,50	1,50	2,00
R9	80,17	161,83	9,83	5,75	4,95	45,67	4,55	4,05	30,83	1,00	1,00
R2	90,33	162,83	13,00	4,58	4,67	47,00	4,02	4,17	33,33	1,00	1,00

* El color fue medido en una escala de 1-3 correspondiendo el valor 1 a la coloración verde, 2 a variegado y 3, a violeta.

** La presencia o ausencia de espinas se estableció en dos categorías: 1 presencia y 2 ausencia.

* Color was measured in a qualitative scale: 1 = green, 2 = purple-green and 3 = purple.

** For spines presence two categories were established; 1 = spiny heads and 2 = spineless heads.

Tanto el cardo silvestre como el cultivado, como así también los materiales de alcaucil, mostraron diferencias significativas en los caracteres productivos. Los materiales de cardo presentaron los mayores valores para el número de capítulo por planta, pero menor tamaño de los mismos y menor tamaño de la planta.

El análisis de componentes principales (ACP) mostró que la presencia de dos componentes principales explicó el 90% de la variación total. La primera componente está determinada por el tamaño del capítulo (tanto primario como de orden superior) y por el número de los mismos junto con el diámetro de planta. La segunda componente estuvo constituida por las variables color y espinosidad del capítulo.

El análisis de agrupamiento permitió la conformación de dos grupos incluyendo el primero las variedades de cardo cultivado y las de cardo silvestre, mientras que el segundo sólo incluyó los tres cultivares de alcaucil (figura 1, pág. 40). A su vez, del primer grupo pueden diferenciarse las variedades botánicas *altilis* y *sylvestris*. Dentro del segundo grupo pueden separarse los tres materiales de *Cynara cardunculus* var. *scolymus*.

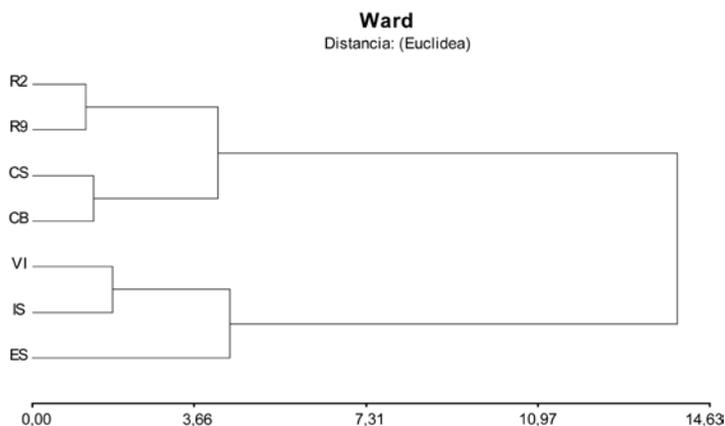


Figura 1. Dendrograma realizado a partir de la matriz de distancias Euclídeas para los datos morfológicos.

Figure 1. Dendrogram based on morphological data using Euclidean distance matrix.

Caracterización proteica

Mediante la técnica de SDS-PAGE pudieron visualizarse 16 bandas, de las cuales solamente 5 fueron monomórficas, encontrándose un 69% de polimorfismo entre las variedades.

El análisis de coordenadas principales para los fragmentos proteicos demostró que la presencia de dos coordenadas principales es suficiente para explicar el 70% de la variación total. El análisis de agrupamiento permitió la diferenciación entre las tres variedades de *Cynara cardunculus* pero no fue posible distinguir entre sí, ni los cultivares de alcaucil ni los de cardo comestible (figura 2).

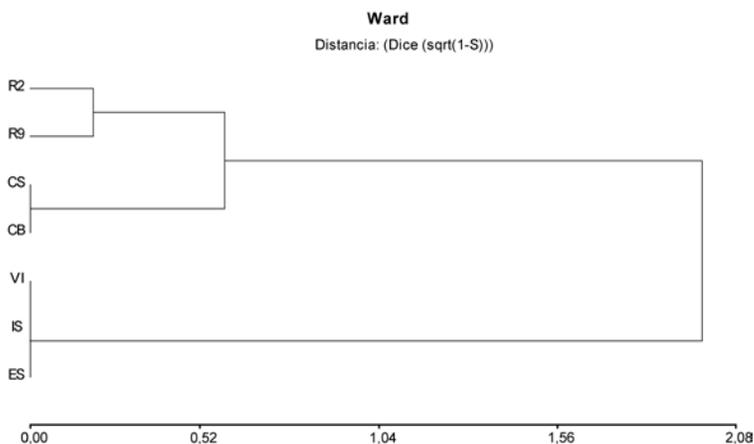


Figura 2. Dendrograma conformado a partir de la matriz de distancias de Dice con datos proteicos.

Figure 2. Dendrogram using Dice's genetic distance matrix on protein data.

Caracterización molecular

Se visualizó un total de 216 bandas con las 7 combinaciones de cebadores, resultando 30 bandas por combinación en promedio. El tamaño de las mismas varió de 80 a 1200 pb.

Cincuenta y tres bandas resultaron monomórficas entre las variedades, obteniéndose un 75% de polimorfismo entre todas las cultivares.

El análisis de coordenadas principales permitió inferir que con cuatro coordenadas principales puede explicarse el 70% de la variación observada.

El análisis de agrupamiento generado por los fragmentos SRAP permitió discriminar dentro de la var. *scolymus* los diferentes cultivares evaluados, presentando un 81% de bandas polimórficas.

Las var. *atilis* y *sylvestris* se presentaron en el mismo conjunto con un 41% de bandas polimórficas (figura 3).

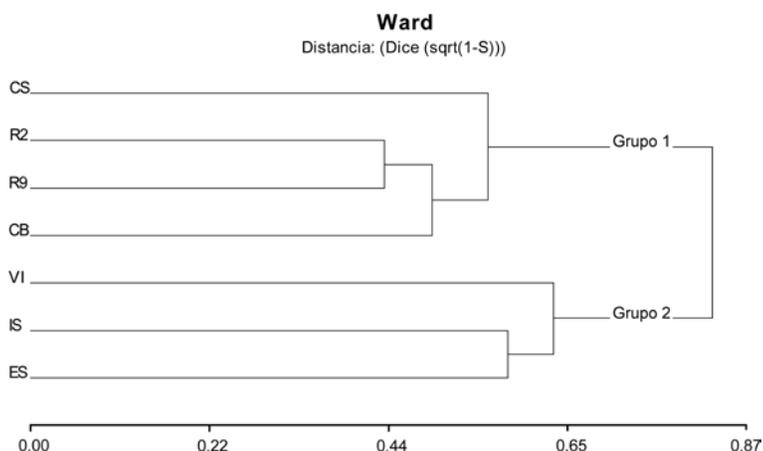


Figura 3. Dendrograma conformado a partir de la matriz de distancias de Dice con datos moleculares.

Figure 3. Dendrogram based on SRAP data using Dice's genetic distance matrix.

Análisis de consenso

El análisis de consenso entre los datos morfológicos y los proteicos permitió la conformación de dos grupos (figura 4, pág. 42).

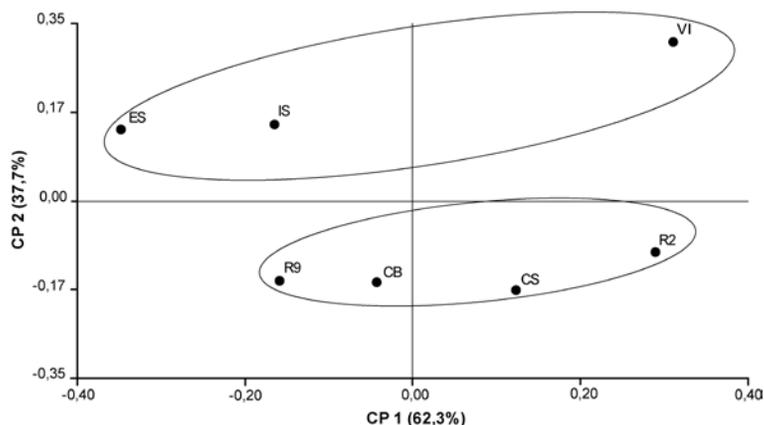


Figura 4. Diagrama de las dos componentes principales (CP1 y CP2) del análisis de procrustes generalizado entre datos morfológicos y proteínas de reserva.
Figure 4. Scatter diagram of the first two principal components (PC1 and PC2) from Procrustes Generalized based on protein data and morphological characters.

El primer grupo incluyó todas las variedades de alcaucil caracterizadas por un mayor tamaño y peso de los capítulos, un menor número de ellos y con plantas de menor porte tanto en altura como en el diámetro.

La variedad Violeta Invernale presentó los valores mayores y menores para las variables mencionadas mientras que Estrella del Sur se caracterizó por un menor diámetro de planta. El segundo grupo quedó conformado por las variedades tanto de cardo cultivado como por las de cardo silvestre, sobresaliendo la variedad R2 por la mayor cantidad de capítulos por planta.

El nivel de asociación entre los marcadores morfológicos y proteicos fue de $r = 0,60$ indicando una buena correspondencia entre ambos sistemas.

El análisis combinando los datos morfológicos y moleculares arrojó un valor de correlación de $r = 0,75$ lo que indica una mayor correspondencia que la obtenida entre los datos morfológicos y proteicos.

En la figura 5 (pág. 43) se muestra la conformación de dos grupos: uno con los cultivares de alcaucil y el otro con los de cardo cultivado y silvestre. El primero presentó valores superiores para tamaño y peso de los capítulos.

Dentro de este grupo, la variedad Estrella del Sur se destacó por valores superiores para la variable días a cosecha y por poseer un menor tamaño de planta. El segundo grupo presentó un mayor número de capítulos pero más pequeños, destacándose la variedad R2 por elevado número de los mismos o de capítulos.

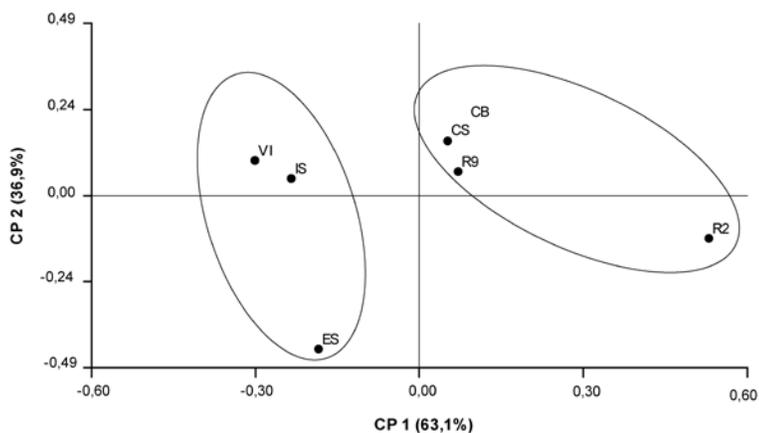


Figura 5. Diagrama de las dos componentes principales (CP1 y CP2) de un análisis de procrustes generalizado con datos morfológicos y moleculares.

Figure 5. Scatter diagram of the first two principal components (PC1 and PC2) from Procrustes Generalized based on molecular data and morphological characters.

Si bien a lo largo del proceso evolutivo la selección natural ha estado presente, fue la selección artificial la que produjo un fuerte impacto sobre las poblaciones originales ya que se persiguieron diferentes objetivos. Cuando el hombre aplicó la selección en función de la presencia de hojas suculentas se originaron los cardos comestibles (6), mientras que cuando el hombre priorizó la presencia de capítulos de buena calidad se obtuvieron los diferentes tipos de alcauciles. Esto implicó un proceso de selección divergente sobre las poblaciones originales.

Estos diferentes criterios selectivos se ponen de manifiesto en los análisis de agrupamiento, tanto de los caracteres morfológicos como de los caracteres proteicos y moleculares.

La mayoría de los métodos de análisis de proteínas de reserva produce una pobre resolución y consecuentemente no discrimina entre algunas familias proteicas (3). La presencia de bandas comunes en todos los materiales revela el origen común de las diferentes variedades. Sergio *et al.* (18) concluyen que la composición polipeptídica de aquenios de diferentes cultivares de alcaucil es suficiente para detectar variabilidad intraespecífica. Sin embargo, la existencia de distintos patrones electroforéticos podría deberse al material utilizado ya que se trata de aquenios provenientes de clones altamente heterocigóticos (figura 2, pág. 40).

Por su parte, los marcadores moleculares SRAP fueron más eficientes para poner de manifiesto la variabilidad intravarietal en *Cynara cardunculus* var. *scolymus* proveyendo información útil en la caracterización de los cultivares estudiados. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por Cravero *et al.* (5) que concluyen que los SRAP son una poderosa herramienta para detectar diversidad genética en

Cynara cardunculus. La alta correlación entre los marcadores morfológicos y los moleculares permite acelerar la identificación temprana de los materiales, evitando el desarrollo completo de la planta, para la toma de decisiones en cuanto al valor potencial de los cultivares a emplearse.

CONCLUSIONES

Los tres tipos de análisis llevados a cabo permitieron discriminar las variedades botánicas de *C. cardunculus*.

Los datos obtenidos por medio de marcadores proteicos no permitieron la diferenciación intravarietal.

Los marcadores tipo SRAP fueron eficientes tanto para la diferenciación varietal como intravarietal y permitirán la identificación precoz de materiales útiles en programas de mejora de alcaucil y cardos cultivados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asprelli, P.; Cravero, V.; Cointry, E. 2001. Evaluación de la variabilidad presente en una población de clones de alcaucil (*Cynara scolymus* L.). Revista de Investigaciones. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. 1(1): 27-38.
2. Balzarini, M.; Di Renzo, J. 2003. InfoGen. Software para análisis estadísticos de marcadores genéticos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
3. Baniel, A.; Bertrand, D.; Lelion, A.; Gueguen, J. 1998. Variability in protein composition of pea seed studied by FPLC and multidimensional analysis. Crop Science 38: 1568-1575.
4. Becerra, V.; Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica. 60(3): 270-281.
5. Cravero, V.; Martín, E.; Cointry, E. 2007. Genetic Diversity in *Cynara cardunculus* determined by SRAP markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 132(2): 208-212.
6. Dellacecca, V.; Magnifico, V.; Marzi, V.; Porceddu, E.; Mugnozza, G. T. 1976. Contributo alla conoscenza delle varietà di carciofo coltivate nel mondo. In: Atti 2° Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo. Edizioni Minerva Medica, Turin, Italy. p. 199-315.
7. Gower, J. C. 1975. Generalized Procrustes Analysis. Psychometrika. 40: 33-51.
8. Hammouda, R. M.; Scifel-Nasr, M. M.; Ismail, S. I.; Shahat, A. A. 1993. Quantitative determination of the active constituents in Egyptian cultivated *Cynara scolymus*. International Journal of Pharmacology. 31: 299-304.
9. Lanteri, S.; Di Leo, I.; Ledda, L.; Mammeli, M. G.; Portis, E. 2001. RAPD variation within and among populations of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. "Spinoso sardo". Plant Breeding. 120: 243-247.
10. Li, G.; Quiros, C. F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theoretical and Applied Genetics. 103: 455-461.
11. López Anido, F.; Firpo, I.; García, S.; Cointry, E. 1998. Estimation of genetic parameters for yield traits in globe artichoke. Euphytica. 103: 61-66.

12. López Anido, F.; Cravero, V.; Martín, E.; Crippa, I.; Cointry, E. 2010. Differential expression of the genetic variance in F2 populations of reciprocal crosses of artichoke. Spanish Journal of Agricultural Research. 8(3): 679-685.
13. Miccolis, V.; Bianco, V. V.; Elia, A.; Perrino, P.; Volpe, N. 1989. Valutazione della collezione mediterranea di carciofo allevata nella valle dell'Ofanto. L'Informatore Agrario. 45: 35-41.
14. Oliaro, T. 1967. Lineamenti di una storia del carciofo. In: Atti 1^a Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo. Ed. Minerva Medica, Torino. p. 1-7.
15. Porceddu, E.; Dellacecca, V.; Bianco, V. V. 1976. Classificazione numerica di cultivar di carciofo. Proceeding II International Congress on Artichoke. Bari, Minerva Medica, Torino.
16. Rottemberg, A.; Zohary, D.; Nevo, E. 1996. Isozyme relationships. Genetic Resources and Crop Evolution. 43: 59-62.
17. Rottemberg, A.; Zohary, D. 1996. The wild ancestry of the cultivated artichoke. Genetic Resources and Crop Evolution. 43: 53-58.
18. Sergio, L.; Di Venere, D.; Cardinali, A.; Bianco, V. V. 2005. Characterization of artichoke open pollinated and hybrid cultivars by protein electrophoresis. Acta Horticulturae. 681: 381-388.
19. Sonante, G.; De Paolis, A.; Lattanzio, V.; Perrino, P. 2002. Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 247-255.
20. Sonante, G.; Carluccio, A. V.; Vilatersana, R.; Pignone, D. 2007. On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. Genetic Resources and Crop Evolution. 54: 483-495.
21. Tivang, J.; Skroch, P. W.; Nienhuis, J.; De Vos, N. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations. Journal American Society Horticultural Science. 121: 783-788.
22. Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of American Statistics Association. 58: 236.
23. Wiklund, A. 1992. The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). Botanical Journal Linnean Society. 109: 75-123.

