

## Risorse genetiche e strumenti molecolari per la valorizzazione delle produzioni cinaricole

Gabriella Sonnante\*, Emanuela Blanco, Domenico De Paola e Angela Gatto

CNR Istituto di Genetica Vegetale, Bari

### Genetic resources and molecular instruments for valorization of artichoke production

**Abstract.** Genetic resources are at the basis of the development of new varieties and represent a sort of insurance for facing production and environmental challenges, for food security. A living collection of *Cynara cardunculus* L. accessions is held at the Institute of Plant Genetics of the National Research Council, Bari, Italy. Crossing an artichoke and a wild cardoon genotype, an F1 segregating population has been obtained and used to establish a consensus linkage map. The map includes EST-derived and genomic SSRs markers, AFLPs markers, genes, and one morphological trait. In particular, 124 EST-SSRs, and the genes PAL1 and PRX have been mapped here for the first time. A number of common bridge markers and genes have allowed the alignment of the present map to previously published maps for artichoke. MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that regulate gene expression in plants and animals. In order to detect artichoke miRNAs involved in the response to biotic and abiotic stresses, artichoke plantlets were treated with a saline solution or infected with a virus and *Verticillium dahliae* fungus. Artichoke small RNAs were isolated and sequenced by using an Illumina platform. Obtained sequences allowed the identification and characterization of numerous miRNAs and of their target genes. Relevant results obtained by the unit CNR-IGV within the project CAR-VARVI are presented. These findings are a step forward in the understanding of the artichoke genetics and gene regulation, especially in the response to environmental stresses.

**Key words:** Genetic resources, molecular markers, genetic map, microRNA, stress.

### Introduzione

#### Germoplasma e mappe genetiche

La conservazione e l'uso sostenibile delle risorse

genetiche in agricoltura sono necessari per lo sviluppo sostenibile delle produzioni agricole e delle aree rurali. La perdita di tali risorse potrebbe compromettere il futuro dell'agricoltura. Le risorse genetiche agrarie permettono di far fronte alle sfide rappresentate da nuove e mutate patologie e dai cambiamenti climatici. I ricercatori utilizzano caratteri specifici di piante coltivate e selvatiche per una serie di scopi, quali per esempio la tolleranza alla salinità, la resistenza alle malattie, l'adattamento alle mutanti condizioni climatiche. Inoltre, grazie alla conservazione delle risorse genetiche, i produttori possono attingere a tale diversità per rispondere alle esigenze di un mercato in evoluzione. La disponibilità delle risorse genetiche agrarie permette di garantire la sicurezza alimentare per le generazioni future; in quest'ottica, le risorse genetiche costituiscono un bene pubblico.

La possibilità di esplorare la variabilità genetica naturale presente all'interno di una specie coltivata è una fase importante per soddisfare le esigenze del mercato. Da una parte, infatti, essa è uno strumento fondamentale per migliorare i mezzi di produzione, dall'altra consente, invece, di utilizzare le varietà maggiormente indicate per un determinato ambiente di coltivazione nell'ottica di un obiettivo di qualità. Ciò è d'interesse generale per tutte le varietà coltivazione, ma lo è in modo particolare per le varietà autoctone, che rappresenteranno sempre di più un elemento di traino per la promozione di alcune colture.

Accanto alla conservazione *on farm* delle varietà locali, la conservazione *ex situ* garantisce il mantenimento di queste risorse genetiche nel tempo. Inoltre, le banche del DNA forniscono un metodo integrativo per preservare materiali genetici per successivi studi ed analisi. L'Istituto di Genetica Vegetale (IGV) del CNR di Bari possiede, oltre ad una banca di semi con più di 60.000 accessioni, anche una banca del DNA in cui sono conservati campioni di antiche varietà coltivate e progenitori selvatici.

Il carciofo rappresenta un'importante coltura ortiva per l'Italia occupando, come superficie coltivata, il secondo posto dopo il pomodoro. L'Italia è il maggiore produttore mondiale e la Puglia è la regione leader. Il nostro paese, però, è anche uno dei principali

\* gabriella.sonnante@igv.cnr.it

importatori di carciofo, soprattutto nel periodo invernale, quando le produzioni italiane subiscono un arresto a causa delle basse temperature. Tradizionalmente le varietà di carciofo utilizzate vengono propagate vegetativamente e questa pratica facilita la trasmissione di patogeni quali virus (Gallitelli *et al.*, 2004) e il fungo *Verticillium dahliae* (Cirulli *et al.*, 1994). Inoltre, i cambiamenti climatici ed il continuo abbassamento della falda acquifera presuppongono l'utilizzo di piante sempre più resistenti alle acque salmastre e, notoriamente, il carciofo è una pianta moderatamente tollerante alla salinità.

L'IGV possiede risorse genetiche di *Cynara cardunculus* L. rappresentate da una collezione di germoplasma coltivato (carciofo e cardo) e selvatico, il progenitore del carciofo (Sonnante *et al.*, 2007). Alcune delle varietà della collezione sono state reperite, studiate ed in alcuni casi utilizzate per studi più approfonditi, nell'ambito del progetto CAR-VARVI. Il pool genico primario del carciofo è rappresentato da gruppi varietali che si differenziano sulla base di tratti morfologici, nonché dal cardo coltivato e dal cardo selvatico, tutti appartenenti alla stessa specie *C. cardunculus* ed interfertili tra di loro. L'uso dei marcatori molecolari costituisce un utile strumento per determinare la distribuzione della variabilità genetica e aiutare nella conservazione ed utilizzazione del germoplasma, come quello del carciofo (Sonnante *et al.*, 2003; 2008).

Notevoli progressi sono stati compiuti negli ultimi anni nel settore della genetica e genomica vegetale, soprattutto in seguito all'uso di marcatori molecolari e allo sviluppo di mappe genetiche di associazione. Una mappa genetica individua la posizione relativa di marcatori (misurata in centimorgan, cM) basata sulla frequenza con cui questi vengono ereditati insieme e rappresenta uno strumento per individuare geni o marcatori associati a specifici caratteri agronomici o di qualità, per il clonaggio posizionale di geni d'interesse, per l'ottenimento di mappe fisiche, ed è di ausilio per il sequenziamento completo del genoma.

In carciofo sono state sviluppate tre mappe di associazione. La prima è stata ottenuta da una popolazione ibrida F1 derivante dall'incrocio tra il carciofo Romanesco C3 e lo Spinoso Sardo (Lanteri *et al.*, 2006; Acquadro *et al.*, 2009). La seconda mappa deriva da una popolazione F1 derivante dall'incrocio tra il carciofo ed il cardo coltivato (Portis *et al.*, 2009), e la terza è stata ottenuta nell'ambito del progetto CAR-VARVI utilizzando una popolazione segregante F1 basata sull'incrocio tra un carciofo ed un cardo selvatico (Sonnante *et al.*, 2011).

#### *MicroRNA: caratteristiche, biogenesi e meccanismo d'azione*

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA (sRNA) in grado di regolare l'espressione genica agendo da modulatori negativi a livello post-trascrizionale. La lunghezza dei miRNA maturi delle piante varia da 18 a 25 nucleotidi con una netta prevalenza di sequenze di 21 nucleotidi. Numerosi studi hanno dimostrato che i miRNA svolgono un ruolo importante nella regolazione di diversi processi biologici, tra i quali la risposta adattativa delle piante agli stress biotici e abiotici.

Nelle piante i miRNA derivano da trascritti non codificanti prodotti da loci situati prevalentemente in regioni intergeniche (geni MIR). I miRNA vengono trascritti dai geni MIR (Lee *et al.*, 2004) e i trascritti primari di tali geni (pri-miRNA) possiedono delle regioni interne di struttura secondaria a forcina, e formano pertanto tratti di RNA a doppio filamento (dsRNA) con il miRNA contenuto in uno dei due bracci della forcina (Kim, 2005). L'enzima DCL1 opera un taglio sul pri-miRNA generando una molecola di RNA di lunghezza compresa tra 100 e 300 nucleotidi che si ripiega assumendo una struttura secondaria a forcina molto compatta: il pre-miRNA, che viene esportato nel citoplasma (Eamens *et al.*, 2008). Il taglio di DCL1 stacca dal pre-miRNA un piccolo RNA a doppio filamento costituito dal miRNA maturo e dalla sequenza complementare (miRNA\*). La coppia miRNA/miRNA\* presenta estremità protrudenti con due nucleotidi spaiati al 3' che vengono metilate (Voinnet, 2009). I miRNA interagiscono con l'RNA messaggero (mRNA) bersaglio attraverso un meccanismo di riconoscimento sequenza specifico basato sulla complementarità delle basi azotate. Il silenziamento mediato dai miRNA porta alla degradazione dell'mRNA bersaglio, oppure al blocco della traduzione dello stesso.

Numerosi miRNA sono stati inizialmente isolati in organismi modello come *Arabidopsis thaliana* e successivamente sono stati ritrovati in numerose altre specie, dimostrando un alto livello di conservazione evolutiva (Zhao *et al.*, 2010). Oltre i miRNA conservati in maniera trasversale anche tra specie molto diverse, ogni specie ha evoluto un insieme di miRNA non conservati e per questo definiti specie-specifici (Xu *et al.*, 2010). Il database di sequenze di miRNA dell'istituto Sanger (miRBase release 19; <http://microrna.sanger.ac.uk>) contiene 5.940 sequenze di miRNA maturi appartenenti a 67 diverse specie di piante, tra le quali il carciofo, per il quale sono state annotate 57 sequenze di miRNA maturi (De Paola *et al.*, 2012a).

È possibile identificare nuovi miRNA attraverso metodi computazionali o con approcci sperimentali. I primi sono basati su ricerche di omologia seguite da modelli di predizione di struttura secondaria e/o della loro stabilità termodinamica che permettono di identificare le sequenze di miRNA conservati partendo da database di EST (Zhang *et al.*, 2005) o di sequenze genomiche. L'approccio sperimentale è basato sull'identificazione *de novo* di miRNA in librerie di cDNA. Lo sviluppo di tecniche di sequenziamento ad alta processività rende oggi possibile una strategia alternativa che prevede l'identificazione di numerosi miRNA, sia conservati che specie-specifici, fornendo allo stesso tempo informazioni sui livelli di espressione dei diversi miRNA.

Dato il crescente numero di lavori riguardanti la caratterizzazione di miRNA nelle piante, nonché la necessità di distinguere queste molecole dalla moltitudine di altri sRNA presenti, sono state individuate delle linee guida che definissero i criteri necessari per l'annotazione di miRNA nelle piante (Meyers *et al.*, 2008). Condizione necessaria e sufficiente per l'annotazione di un miRNA è l'identificazione di una sequenza di sRNA in un campione biologico e l'individuazione della sequenza corrispondente al pre-miRNA. Questo criterio può essere soddisfatto mediante sequenziamento della frazione di sRNA purificato dall'RNA totale e dall'analisi dei putativi precursori mediante programmi bioinformatici.

## Materiali e metodi

### *Risorse genetiche e mappa genetica*

Sono state raccolte risorse genetiche e mantenute presso la collezione del CNR-IGV seguendo le pratiche agricole tradizionali. Un genotipo di carciofo Mola è stato utilizzato come parentale femminile ed un genotipo della popolazione selvatica Tolfa come parentale maschile per l'incrocio al fine di ottenere una popolazione segregante F1. Sui 2 parentali sono stati saggiati inizialmente 301 marcatori microsatelliti (SSR), 34 combinazioni di primer AFLP *EcoRI/MseI* ed i polimorfismi contenuti in 10 geni, seguendo i protocolli riportati in Sonnante *et al.* (2011). Le analisi di associazione e di ricombinazione sono state eseguite con il software Join MAP 4.0 (Van Ooijen, 2006) applicando la funzione di Kosambi per stimare le distanze genetiche di mappa (Kosambi, 1944).

### *microRNA*

Una serie di piante di carciofo sono state sottoposte a stress salino mediante immersione delle radici in una soluzione 250 mM di NaCl, mentre altre due serie

di piante sono state sottoposte a stress biotico: in un caso mediante infezione con *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), nell'altro caso per infezione con un isolato di *Verticillium dahliae* (De Paola *et al.*, 2012b). Dai diversi campioni rappresentati da foglie e radici per stress salino, piante infettate con *V. dahliae* e piante controllo; foglie per le piante infettate con virus, sono state generate 7 librerie di sRNA, successivamente sottoposte a sequenziamento mediante tecnologia Illumina (De Paola *et al.*, 2012a). I dati derivanti sono stati analizzati mediante programmi bioinformatici; per l'identificazione delle putative sequenze bersaglio è stato realizzato un opportuno script seguendo i criteri qui descritti: non più di 4 punti di disallineamento tra il miRNA maturo e il suo potenziale sito bersaglio, non più di 1 disallineamento nella regione nucleotidica 1-9, non più di due disallineamenti consecutivi e nessun disallineamento in posizione 10 e 11 (De Paola *et al.*, 2012a).

## Risultati del progetto

### *Risorse genetiche e mappa genetica*

Nell'ambito del progetto CAR-VARVI è stata arricchita e mantenuta la collezione di germoplasma di carciofo della U.O. CNR-IGV, incluse le varietà locali pugliesi Locale di Mola, Brindisino, Catanese, Violetto di Provenza, Catalogna, Romano, Centofoglie, Francesina, Bianco di Ostuni, Bianco di Martano, Locale Calimera, Locale di Cutrofiano, Locale di Parabita, Locale di Surbo, Locale San Donato, Locale San Foca, Nero di Ostuni, Nero di Castrignano, i tipi campani (Tondo di Paestum, Bianco di Pertosa, Pietralcina, Aquara, Capuanella), e le altre varietà, quali Romanesco, Thema, Violetto di Toscana, Violetto di Maremma, Spinoso Sardo, Spinoso di Palermo, Spinoso Violetto di Liguria, Gagliardo Sgrò, Niscemese, S.Erasmo, Blanca de Tudela, Carciofo di Scapoli. Da queste varietà è stato estratto il DNA genomico che è stato conservato nella banca del DNA vegetale del CNR-IGV.

Un genotipo di carciofo presente in collezione (Mola) è stato incrociato con un genotipo selvatico (Tolfa). Tale incrocio ha prodotto oltre 200 semi ibridi, dei quali 192 sono stati utilizzati per la costruzione di una mappa genetica, al fine di permettere l'identificazione e localizzazione di geni che controllano importanti caratteri come la qualità/produzione di sostanze nutritive, la resa o la resistenza a patogeni. La mappa descritta in questo lavoro si basa su marcatori EST-SSR CyEM, SSR genomici, AFLP, geni ed un carattere morfologico (Sonnante *et al.*, 2011). Le due linee parentali Mola e Tolfa differiscono per una

serie di caratteri, quali la presenza di spine, forma e colore del capolino, tempo di fioritura, altezza e forma della pianta, colore del fiore, contenuto di polifenoli. Poichè il carciofo è un specie altamente eterozigote, è stata scelta una strategia basata sul test cross/reincrocio a due vie. Dalle mappe del parentale femminile (Mola) e di quello maschile (Tolfa), è stata ottenuta una mappa integrata contenente 17 gruppi di associazione (LG). La mappa del parentale maschile è risultata più piccola di quella del parentale femminile e della stessa mappa integrata, in quanto il livello di eterozigotità del selvatico è molto ridotto rispetto a quello del carciofo.

La mappa integrata copre una lunghezza di 1.488,8 cM ed include 337 marcatori molecolari localizzati nei 17 LG, con una distanza media tra marcatori di 4,4 cM. Tali marcatori sono SSR, AFLP, dieci geni ed il carattere morfologico spinosità delle brattee. La maggior parte dei geni indagati sono implicati nella sintesi dell'acido clorogenico. Pur mostrando un livello inferiore di polimorfismo, i marcatori EST-SSR sono molto utili nella generazione di mappe funzionali, poichè sono direttamente legati a geni espressi e permettono la diretta individuazione/posizionamento su mappa di loci agronomicamente importanti (Nicot *et al.*, 2004). Dei marcatori CyEM saggiati, 124 sono stati mappati per la prima volta e sono localizzati su quasi tutti i 17 LG della mappa integrata e su un LG del parentale femminile che non è stato possibile collegare alla mappa di Tolfa. Inoltre, sono state saggiate anche 34 coppie di primer AFLP, di cui 15 hanno permesso la determinazione di 235 loci polimorfici tra Mola e Tolfa.

Una serie di geni implicati nella sintesi dell'acido clorogenico sono stati mappati tramite l'utilizzo di diversi marcatori SNP, analizzati successivamente tramite la tecnica di high resolution melting-PCR (HRM) (fig. 1). I geni mappati tramite SNP/HRM sono HQT (hydroxycinnamoyl-CoA:quinic acid hydroxycinnamoyltransferase) C3'H (p-coumaroyl ester 3O-hydroxylase), PAL1 (phenylalanine ammonia-lyase), 4CL (4-coumarate:CoA ligase), e C4H (cinnamate-4-hydroxylase). In breve, le sequenze per HQT, C3'H, 4CL e C4H sono state amplificate nei due genotipi parentali ed i frammenti ottenuti direttamente sequenziati per la ricerca di SNP. Tali SNP sono stati poi genotipizzati nella progenie F1 tramite HRM. Tra questi, è stato dimostrato che dei tre geni della famiglia HQT, due, HQT1 e HQT2, recentemente isolati e caratterizzati funzionalmente (Sonnante *et al.*, 2010), sono coinvolti nelle ultime reazioni di sintesi dell'acido clorogenico in carciofo, mentre i geni della famiglia PAL catalizzano il primo passaggio della sintesi

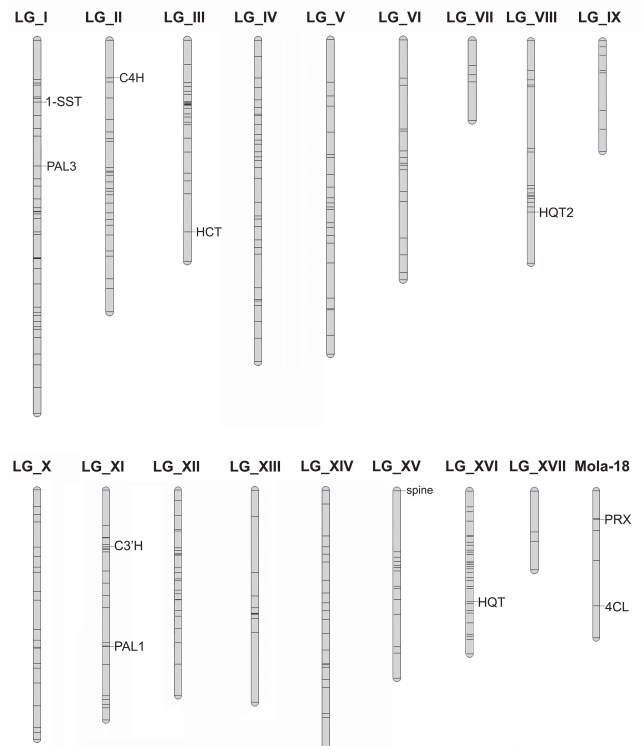


Fig. 1 - Mappa genetica di associazione semplificata del carciofo. Ogni linea individua un marcatore mappato. Le abbreviazioni indicano i singoli geni mappati; LG: gruppo di associazione (adattato da Sonnante *et al.*, 2011).

Fig. 1 - Simplified linkage map of the globe artichoke. Each line corresponds to a mapped marker. The abbreviations are related to the mapped genes. LG: linkage group (adapted from Sonnante *et al.*, 2011).

dei fenilpropanoidi (De Paolis *et al.*, 2008). È stato possibile mappare HQT2, ma non HQT1, poichè per quest'ultima isoforma i parentali sono risultati omozigoti. Per PAL1 è stato amplificato e sequenziato l'introne specifico di tale famiglia, mentre per HQT2 una ripetizione di un solo nucleotide nell'introne è risultata polimorfica tra Mola e Tolfa e quindi è stata usata per l'analisi della popolazione di mappa. La presenza di una delezione di 9 paia di basi nella regione 5'-UTR è risultata utile per ottenere un marcatore per HCT (hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase), mentre PAL3, 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase) e PRX (perossidasi) sono stati mappati grazie a SSR nelle regioni UTR. Tra i geni analizzati, PAL1 e PRX sono stati mappati per la prima volta in questa mappa.

Sono stati poi presi in considerazione due caratteri morfologici: la presenza/assenza di spine e il colore dei fiori. Mola non presenta spine sulle brattee e ha fiori viola, mentre Tolfa ha brattee spinose e fiori bianchi. Il carattere spinosità è stato localizzato solo sulla mappa del parentale femminile Mola, mentre non è stato possibile mappare il colore su alcun gruppo di associazione.

Al fine di stabilire una mappa consenso per il carciofo, tutti i marcatori SSR ed i geni precedentemente mappati sulle altre mappe esistenti (Acquadro *et al.*, 2009; Portis *et al.*, 2009) sono stati cercati nei genotipi parentali di Mola e Tolfà. I marcatori-ponte posizionati sulla mappa integrata in comune con almeno una delle mappe note sono risultati 31 (24 SSR e 7 geni). La mappa genetica così creata costituisce la premessa per la mappatura di caratteri agronomici importanti e per la selezione assistita nel miglioramento genetico; essa rappresenta la base per studi di genomica comparativa e per analisi derivanti dal sequenziamento del genoma.

#### *Identificazione dei miRNA e dei putativi geni bersaglio in carciofo*

Al fine di valutare i miRNA responsabili della risposta a stress in carciofo, sono state generate sette librerie di sRNA da foglie e radici di piante di carciofo sottoposte o meno a stress abiotici e biotici. Tutte le librerie di sRNA ottenute sono state sequenziate utilizzando la piattaforma Illumina, che ha generato nel complesso quasi 40 milioni di sequenze. I dati di sequenziamento sono stati filtrati mediante appositi strumenti bioinformatici eliminando ambiguità e ridondanze. In totale, per le librerie di carciofo, sono stati ottenuti più di 14 milioni di sequenze uniche. L'analisi delle sequenze nelle diverse librerie di sRNA ha messo in evidenza una diversa distribuzione delle classi di lunghezza. In ogni libreria una percentuale superiore al 70% degli sRNA rientrava in una classe di lunghezza compresa tra 21 e 24 nucleotidi, inoltre, per tutte le librerie, la classe di 24 nucleotidi risulta la più rappresentata. Mediante il confronto con database di sequenze specializzati quali Rfam (<http://rfam.sanger.ac.uk/>), è stato possibile classificare gli sRNA di carciofo in diverse categorie di RNA non codificante tra cui il ribosomiale (rRNA), i transfer (tRNA), i piccoli RNA nucleari (snRNA) e nucleolari (snoRNA). Tutte queste classi di RNA sono state eliminate prima di procedere alla fase successiva di identificazione dei miRNA.

Per l'identificazione di miRNA conservati in carciofo è stata effettuata una ricerca per omologia tra le sequenze di ogni libreria di sRNA e le sequenze di miRNA di piante presenti in miRbase. In totale sono stati identificati più di 100 diversi miRNA appartenenti a diverse famiglie (De Paola *et al.*, 2012a). Ognuna delle sequenze di miRNA di carciofo identificata è stata ricontata all'interno di ogni libreria per stimarne la numerosità assoluta che è stata poi normalizzata esprimendola come trascritti per milione (TPM). Questo permette di confrontare la numerosità norma-

lizzata di ogni miRNA in campioni diversi, paragonando i tessuti non stressati con quelli sottoposti a stress. È stato usato un test statistico ( $\chi^2$ -test) per valutare se l'imposizione dei diversi tipi di stress incide o meno sull'abbondanza di ogni miRNA di carciofo. Per la validazione dei dati di espressione ricavati mediante analisi dei dati di sequenziamento, è stato utilizzato un approccio basato su *stem-loop* RT-PCR (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) seguito da esperimenti di quantificazione relativa mediante *real-time* qPCR.

Per individuare le sequenze dei precursori putativi di ognuno dei miRNA di carciofo, sono state condotte ricerche di similarità su EST disponibili nelle banche dati pubbliche e sequenze genomiche di carciofo ottenute mediante sequenziamento Illumina (rappresentanti 2.3X del genoma di carciofo). Le sequenze così identificate sono state sottoposte a programmi di RNA folding e ad ognuna è stato assegnato un indice (MFEI) che valuta la stabilità termodinamica della struttura secondaria. L'analisi per omologia ha identificato più di mille sequenze corrispondenti a putativi precursori dei miRNA conservati di carciofo; in seguito all'eliminazione delle sequenze ridondanti e alla scrematura di quelle che non rispettavano tutti gli altri parametri, sono state identificate numerose sequenze corrispondenti ad strutture secondarie stabili contenenti la sequenza di un miRNA di carciofo in un regione di RNA a doppio filamento.

Con lo stesso principio sono stati identificati i miRNA non conservati di carciofo. Le analisi computazionali sono state molto più impegnative: le sequenze non ridondanti delle 7 librerie sono state accorpate in un unico set di dati e poi eliminate tutte le sequenze di miRNA conservati e tutte le sequenze di altri sRNA contenuti nel database Rfam. In questo modo circa 2 milioni di sequenze sono state avviate ad un'analisi di similarità su EST e sequenze genomiche di carciofo. Le sequenze isolate sono state analizzate seguendo le stesse strategie messe a punto per i miRNA conservati. Sono state identificate centinaia di sequenze corrispondenti ad altrettante strutture secondarie stabili contenenti le sequenze di nuovi putativi miRNA di carciofo in una regione di RNA a doppio filamento. Sono stati considerati come nuovi miRNA di carciofo le sequenze per le quali è stato possibile identificare nello stesso precursore la coppia miRNA/miRNA\* rilevata mediante sequenziamento. Quest'ultima evidenza è condizione sufficiente per l'annotazione di un nuovo miRNA. Un esempio di struttura secondaria contenente la coppia miRNA/miRNA\* è riportato in figura 2 (De Paola *et al.*, 2012a).

Per la ricerca delle sequenze bersaglio dei miRNA di carciofo identificati in questo studio, è stato seguito



- (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 112: 532-1542.
- LEE Y., KIM M., HAN J., YEOM K.H., LEE S., BAEK S.H., KIM V.N., 2004. *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J.*, 23: 4051-4060.
- MEYERS B.C., AXTELL M.J., BARTEL B., BARTEL D.P., BAULCOMBE D., BOWMAN J.L., CAO X., CARRINGTON J.C., CHEN X., GREEN P.J., GRIFFITHS-JONES S., JACOBSEN S.E., MALLORY A.C., MARTIENSSEN R.A., POETHIG R.S., QI Y., VAUCHERET H., VOINNET O., WATANABE Y., WEIGEL D., ZHU J.K., 2008. *Criteria for annotation of plant MicroRNAs*. *Plant Cell.*, 20: 3186-3190.
- NICOT N., CHIQUET V., GANDON B., AMILHAT L., LEGER F., LEROY P., BERNARD M., SOURDILLE P., 2004. *Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs)*. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 800-805.
- PORTIS E., MAUROMICALE G., MAURO R., ACQUADRO A., SCAGLIONE D., LANTERI S., 2009. *Construction of a reference molecular linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*)*. *Theor. Appl. Genet.*, 120: 59-70.
- SONNANTE G., CARLUCCIO A.V., DE PAOLIS A., PIGNONE D., 2008. *Identification of artichoke SSR markers: molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies*. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 55: 1029-1046.
- SONNANTE G., D'AMORE R., BLANCO E., PIERRI C.L., DE PALMA M., LUO J., TUCCI M., MARTIN C., 2010. *Novel hydroxycinnamoyl-coenzyme A quinate transferase genes from artichoke are involved in the synthesis of chlorogenic acid*. *Plant Physiol.*, 153: 1-15.
- SONNANTE G., DE PAOLIS A., PIGNONE D., 2003. *Relationships among artichoke cultivars and some related wild taxa based on AFLP markers*. *Plant Genet. Resour.*, 1: 125-133.
- SONNANTE G., GATTO A., MORGESE A., MONTEMURRO F., SARLI G., BLANCO E., PIGNONE D., 2011. *Genetic map of artichoke × wild cardoon: toward a consensus map for *Cynara cardunculus**. *Theor. Appl. Genet.*, 123: 1215-1229.
- SONNANTE G., PIGNONE D., HAMMER K., 2007. *The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age*. *Annals Bot.*, 100: 1095-1100.
- VAN OOIEN J.W., 2006. *JoinMap\_4: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Kyazma BV, Wageningen
- VARKONYI-GASIC E., WU R., WOOD M., WALTON E.F., HELLENS R.P., 2007. *Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs*. *Plant Methods*, 3: 7.
- VOINNET O., 2009. *Origin, Biogenesis, and Activity of Plants MicroRNA*. *Cell*, 136: 669-687.
- XU Q., LIU Y., ZHU A., WU X., YE J., YU K., GUO W., DENG X., 2010. *Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type*. *BMC Genomics*, 11: 246.
- ZHANG B.H., PAN X.P., WANG Q.L., COBB G.P., ANDERSON T.A., 2005. *Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis*. *Cell Res.*, 15: 336-360.
- ZHAO C.Z., XIA H., FRAZIER T.P., YAO Y.Y., BI Y.P., LI A.Q., LI M.J., LI C.S., ZHANG B.H., WANG X.J., 2010. *Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.)*. *BMC Plant Biol.*, 10: 3.