

Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

---

Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de entradas de algodón (*Gossypium*  
*hirsutum* L.) e identificación de QTL de importancia agronómica

---

Ing. Agr. Pablo Nahuel Dileo

---

Doctorado en Recursos Naturales

Año 2025



Aprobado por Director y Co-Director de Tesis

---

Director

Dr. Gustavo Rubén Rodríguez

---

Co-Director

Dr. Marcelo Javier Paytas



# Agradecimientos

Agradecimientos aquí..

# Dedicatoria

Dedicatoria aquí..

# Publicaciones

Lista de publicaciones a congresos y revistas aquí..

# Índice General

<b>Introducción . . . . .</b>	<b>1</b>
 <b>Capítulo 1: Caracterización morfológica . . . . .</b>	 <b>2</b>
1.1. Introducción . . . . .	2
1.2. Objetivo . . . . .	2
1.3. Materiales y métodos . . . . .	2
1.4. Resultados . . . . .	5
1.5. Discusión . . . . .	5
1.6. Conclusión . . . . .	6
 <b>Capítulo 2: Caracterización fisiológica . . . . .</b>	 <b>7</b>
2.1. Introducción . . . . .	7
2.2. Objetivo . . . . .	7
2.3. Materiales y métodos . . . . .	7
2.4. Resultados . . . . .	8
2.5. Discusión . . . . .	8
2.6. Conclusión . . . . .	8



<b>Capítulo 3: Caracterización molecular</b>	<b>9</b>
3.1. Introducción	9
3.2. Objetivo	9
3.3. Materiales y métodos	9
3.4. Resultados	11
3.5. Discusión	11
3.6. Conclusión	11
<b>Conclusión</b>	<b>12</b>
<b>Apéndice A: Primer Apéndice</b>	<b>13</b>
<b>Apéndice B: Segundo Apéndice</b>	<b>14</b>
<b>Referencias</b>	<b>15</b>

## Lista de Abreviaturas

<b>IF</b>	Índice de fibra
<b>IS</b>	Índice de semillas
<b>NC</b>	Número de capullos
<b>PC</b>	Peso promedio de capullos
<b>zContinua...</b>	Otras abreviaturas

# Resumen

Primer párrafo del resumen en español.

Segundo párrafo del resumen aquí.

# Abstract

Primer párrafo del resumen en inglés.

Segundo párrafo del resumen aquí.

# Índice de Tablas

1.1. Entradas de <i>Gossypium hirsutum</i> L. y su procedencia . . . . .	3
--	---

# Índice de Figuras

# Introducción

Aquí una introducción general de la tesis..

# Capítulo 1

## Caracterización morfológica

### 1.1. Introducción

Aquí una breve introducción del capítulo

### 1.2. Objetivo

Caracterizar entradas de algodón del banco de germoplasma de INTA con diferente procedencia mediante caracteres morfológicos relacionados al rendimiento.

### 1.3. Materiales y métodos

Los ensayos se llevaron adelante en invernadero con condiciones semi-controladas de la Estación Experimental INTA Reconquista. Se utilizaron 26 entradas de *Gossypium hirsutum* L., coleccionados por el banco de germoplasma de INTA, procedentes de diversos sitios tanto nacionales como del extranjero (Tabla 1.1).

Variables medidas:

Las variables que se mencionan a continuación fueron registradas en todas las plantas (Kerby et al., 2010): i) Precocidad: se determinó tomando el porcentaje de cápsulas



Tabla 1.1: Entradas de *Gossypium hirsutum* L. y su procedencia

Entradas	Procedencia
BGSP-00177	Argentina
BGSP-00192	Argentina
BGSP-00193	Argentina
BGSP-00194	Argentina
BGSP-00166	Argentina
BGSP-00207	Argentina
BGSP-00269	Argentina
BGSP-00514	Australia
BGSP-00072	Camerún
BGSP-00088	Camerún
BGSP-00070	Chad
BGSP-00748	China
BGSP-00752	China
BGSP-00755	China
BGSP-00759	China
BGSP-00779	China
BGSP-00067	Costa de Marfil
BGSP-00028	EEUU
BGSP-00145	EEUU
BGSP-00428	EEUU
BGSP-00159	EEUU
BGSP-00425	EEUU
SP 41255	Línea avanzada- Argentina
SP 6565	Línea avanzada- Argentina
BGSP-00715	Pakistán
BGSP-00126	Senegal

*Nota si precisa footnote*

abiertas a 100 días después de la emergencia (DDE); ii) Altura: se midieron las plantas desde la base del tallo hasta la punta del ápice; iii) N° de nudos: se contó el número de nudos presentes en el tallo de cada planta muestreada; iv) N° de ramas vegetativas: se contaron las ramas vegetativas presentes en cada momento de muestreo; v) N° de ramas reproductivas: se contaron el número de ramas reproductivas presentes en todas

las plantas de cada momento de muestreo; vi) Nudo de inserción de la primera rama reproductiva: se registró el nudo donde se inserta la 1ª rama reproductiva en cada planta muestreada; vii) Distancia de la primera posición al tallo principal: se midió la distancia que existe entre el tallo principal y la primera posición de la primera rama reproductiva de cada una de las plantas; viii) Área foliar: para el cálculo de esta variable, se midieron todas las hojas de las plantas a través de los equipos LICOR 3000 y LICOR 3050; ix) Dinámica de la floración: junto con las mediciones de las características morfológicas mencionadas en los puntos anteriores, se realizaron mapeos de dinámica de floración en todas las plantas seleccionadas para la partición de asimilados. Este procedimiento se realiza registrando en cada una de las posiciones reproductivas que genera la planta, la presencia de un pimpollo, una flor, una bocha verde, una cápsula abierta o un aborto (Kerby & Hake, 1996). Con estos datos se realizó la dinámica de floración de las diferentes variedades y porcentaje de retención final a la que llegan cada una de las plantas seleccionadas para el mapeo; x) Rendimiento: Para calcular el rendimiento de las diferentes entradas y sus componentes se efectuaron las siguientes mediciones: a) Rendimiento bruto de algodón: se recolectó la fibra-semilla de algodón de todas las cápsulas presentes en las plantas. Las muestras obtenidas fueron pesadas en balanzas de precisión y se realizó medición de la humedad de cada una de ellas; b) % de desmote: se tomó cada muestra de algodón proveniente de las mediciones de rendimiento bruto, se realizó el desmote en una mini-desmotadora experimental y se pesó en una balanza de precisión la fibra y semillas por separado. El porcentaje de desmote fue la relación entre el peso de la fibra sobre el peso de la fibra más la semilla; c) Rendimiento de fibra: se multiplicó el rendimiento bruto de algodón por el % de desmote obtenido; d) N° de cápsulas por planta: se determinará dividiendo el peso total de la muestra recolectada en cada parcela con el peso por cápsula (Wells & Meredith, 1984); e) N° semillas / cápsula: se contó el número de semillas presentes en la muestra (Worley et al., 1974); f) Fibra/semilla: este valor surge al dividir el peso de la fibra de algodón que resulta luego de desmotar los capullos

por el número de semillas que tiene la muestra; g) Índice de semillas: se obtuvo al pesar 100 semillas de cada una de las muestras de las variedades de algodón (Pettigrew et al., 2013); x) Parámetros de calidad tecnológica de fibra de algodón. Para obtener estos parámetros se enviaron las muestras de fibra de algodón obtenidas al laboratorio de HVI (Uster 1000) en Reconquista, Santa Fe. Los parámetros de calidad tecnológica de fibra a evaluar fueron: Índice de Hilabilidad (SCI, por sus siglas en inglés), Micronaire (MIC), Índice de madurez (MAC), longitud promedio de la mitad superior (UHML, por sus siglas en inglés), longitud media (ML, por sus siglas en inglés), % de uniformidad, índice de fibras cortas (SFI, por sus siglas en inglés), resistencia de fibra (Str), elongación (Elg), contenido de humedad de la muestra, color (Rd y +b), grado de color (C.G) y contenido de basura; xi) Fenología. Se registró el tiempo en días necesario para que las plantas alcancen los estados de: emergencia, 1º pimpollo, 1º flor abierta, cut out y 1º bocha abierta. El estado de cut out se determinará cuando el número de nudos por encima de la última flor blanca en el tallo sea menor que 4 (Bourland et al., 1992).

El ensayo se realizó en un diseño en bloque completamente aleatorizado, utilizando macetas de 5 litros (con una mezcla de suelo y sustrato comercial) en el cual se colocó 1 planta por maceta. Se utilizaron las entradas detalladas en las tablas N° 1.1. **Detallar el número de repeticiones**

## **1.4. Resultados**

Aquí los resultados del capítulo 1

## **1.5. Discusión**

Aquí la discusión del capítulo 1

## **1.6. Conclusión**

Aquí la conclusión del capítulo 1

## Capítulo 2

### Caracterización fisiológica

#### 2.1. Introducción

Aquí una breve introducción del capítulo

#### 2.2. Objetivo

Evaluar procesos fisiológicos que intervienen en la determinación del rendimiento de fibra de entradas de algodón del banco de germoplasma de INTA.

#### 2.3. Materiales y métodos

Variables medidas:

La medición de las variables fisiológicas se llevaron a cabo en un ensayo en invernadero. Las mediciones se realizaron en seis momentos durante el ciclo de la planta siguiendo lo propuesto por (Luo et al., 2017). Los equipos utilizados para las mediciones propuestas fueron a) Fotosíntesis: LICOR 6400; b) Contenido de clorofila: Minolta SPAD 502; c) Apertura y cierre estomático: LICOR 6400. Para las mediciones de estas variables, se utilizaron las entradas ~~detallar~~ entradas del diseño planteado en “Caracterización morfológica”.

Por otra parte, se realizaron muestreos destructivos de plantas para la determinación de materia seca y partición de los asimilados. Los cortes se realizaron a los 30, 60, 90 y 120 días (correspondientes a los estados fenológicos 1er pimpollo, 1era flor, 1era bocha abierta y fin de ciclo). En cada uno de estos momentos se seccionaron las plantas en tallo, ramas reproductivas, ramas vegetativas, pimpollos y flores, bochas cerradas, capsulas abiertas, fibra y rebrote de tallo según el momento de muestreo. Todas las muestras de las partes de la planta fueron llevadas a estufa a 65 °C hasta peso constante (96 horas). El ensayo se realizó en un diseño en bloques al azar con arreglo en parcelas divididas, con los 4 momentos de corte y las entradas incluidas en cada parcela, con cuatro repeticiones. Se utilizaron macetas de 5 litros (con una mezcla de suelo y sustrato comercial), en el cual se colocó 1 planta por maceta.

## **2.4. Resultados**

Aquí los resultados del capítulo 2

## **2.5. Discusión**

Aquí la discusión del capítulo 2

## **2.6. Conclusión**

Aquí la conclusión del capítulo 2

# Capítulo 3

## Caracterización molecular

### 3.1. Introducción

Aquí una breve introducción del capítulo

### 3.2. Objetivo

Mapear QTL (Quantitative Trait Loci) asociados a caracteres de rendimiento de fibra mediante el análisis de una población segregante  $F_2$  obtenida del cruzamiento de progenitores contrastantes.

### 3.3. Materiales y métodos

Se caracterizaron marcadores moleculares del tipo SSR (Single Sequence Repeats o microsatélites) asociados a QTLs de importancia agronómica. Se utilizaron 55 SSR ~~chequear n° de marcadores~~ que fueron seleccionados acorde tanto a trabajos científicos (Ademe et al., 2017; An et al., 2010; Baytar et al., 2018; Iqbal & Rahman, 2017; Li et al., 2017; R. Liu et al., 2012; R. Liu et al., 2018; X. Liu et al., 2017; Qin et al., 2015; Shen et al., 2007; Shi et al., 2015; Su et al., 2016; B. Wang et al., 2007; H. Wang et al., 2015; M. Wang et al., 2014; Xia et al., 2014; S. Zhang et al., 2016; Z.-S. Zhang

et al., 2005) como la base de datos de CottonGen (<http://www.cottongen.org>). Dicha actividad se realizó en el laboratorio de biotecnología de INTA Reconquista. A partir de las entradas contrastantes para las características de interés, se realizaron cruzamientos y por autofecundación de las  $F_1$  se obtuvo la población  $F_2$ . A continuación, se detallan las etapas:

- I. Obtención de la población segregante para los loci de los marcadores (M) y los QTLs. Luego de la caracterización morfológica y fisiológica, las entradas fueron seleccionadas para ser utilizadas como parentales contrastantes en los respectivos cruzamientos de este estudio. Para los mismos se utilizaron las entradas de alto porcentaje de desmote como parentales masculinos. Considerando que por cada bocha se obtiene, en promedio, 20 semillas (Naeem et al., 2017) se tomó una flor de cada parental para dicho cruzamiento, para la generación de la población  $F_1$  (20 plantas). La población segregante ( $F_2$ ) resultó de la autofecundación de las  $F_1$ , para llegar a una población  $F_2$  aproximada de 200 plantas (Bardak et al., 2018; T. Zhang et al., 2003).
- II. Medición de la característica fenotípica controlada por los QTL. Se realizarán las mediciones de rendimiento y calidad de fibra detalladas en el apartado "Caracterización morfológica".
- III. Caracterización molecular por SSR de los de los parentales y cada planta de la población  $F_2$ . El ADN genómico se aisló utilizando hojas jóvenes procedentes de los progenitores y la población segregante, mediante método CTAB modificado (Patterson et al., 1993; J. Zhang & Stewart, 2000). Se evaluó la cantidad y calidad del ADN mediante espectrofotometría para comparación. La amplificación por PCR y la tinción con plata se realizó según Lin et al. (2005). Los productos de PCR de los SSR se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6 % y revelados con carbonato de sodio (Lin et al., 2005).



### **3.4. Resultados**

Aquí los resultados del capítulo 3

### **3.5. Discusión**

Aquí la discusión del capítulo 3

### **3.6. Conclusión**

Aquí la conclusión del capítulo 3

# Conclusión

Las conclusiones de la tesis aquí..

# Apéndice A

## Primer Apéndice

Sí es necesario incluir un apéndice, iría aquí..

**En capítulo 1:**

Descripción aquí..

## **Apéndice B**

### **Segundo Apéndice**

Este sería el segundo apéndice..

## Referencias

- Ademe, M. S., He, S., Pan, Z., Sun, J., Wang, Q., Qin, H., Liu, J., Liu, H., Yang, J., Xu, D., Yang, J., Ma, Z., Zhang, J., Li, Z., Cai, Z., Zhang, X., Zhang, X., Huang, A., Yi, X., ... Du, X. (2017). Association mapping analysis of fiber yield and quality traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Molecular Genetics and Genomics*, 292(6), 1267-1280. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1346-9>
- An, C., Jenkins, J. N., Wu, J., Guo, Y., & McCarty, J. C. (2010). Use of fiber and fuzz mutants to detect qtl for yield components, seed, and fiber traits of upland cotton. *Euphytica*, 172(1), 21-34. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0009-2>
- Bardak, A., Hayat, K., Erdogan, O., Mahmood, Z., Khan, N.-I., Iqbal, M. A., Tekerek, H., & Mehboob-ur-Rahman. (2018). Genetic mapping in cotton [DOI: 10.5772/intechopen.74513]. En Mehboob-Ur-Rahman & Y. Zafar (Eds.). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74513>
- Baytar, A. A., Peynircioğlu, C., Sezener, V., Basal, H., Frary, A., Frary, A., & Doğanlar, S. (2018). Genome-wide association mapping of yield components and drought tolerance-related traits in cotton. *Molecular Breeding*, 38(6), 74. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0831-0>
- Bourland, F. M., Oosterhuis, D. M., & Tugwell, N. P. (1992). Concept for monitoring the growth and development of cotton plants using main-stem node counts. *Journal of Production Agriculture*, 5(4), 532-538. <https://doi.org/10.2134/jpa1992.0532>

- Iqbal, M. A., & Rahman, M.-u. (2017). Identification of marker-trait associations for lint traits in cotton. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00086>
- Kerby, T. A., Bourland, F. M., & Hake, K. D. (2010). Physiological rationales in plant monitoring and mapping [DOI: 10.1007/978-90-481-3195-2\_27]. En J. M. Stewart, D. M. Oosterhuis, J. J. Heitholt & J. R. Mauney (Eds.). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3195-2\\_27](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3195-2_27)
- Kerby, T. A., & Hake, K. D. (1996). Monitoring cotton's growth. *Cotton production manual*, 335-355.
- Li, C. Q., Dong, N., Fu, Y. Z., Sun, R. R., & Wang, Q. L. (2017). Marker detection and elite allele mining for yield traits in upland cotton ( *Gossypium hirsutum* L.) by association mapping. *The Journal of Agricultural Science*, 155(4), 613-628. <https://doi.org/10.1017/S0021859616000745>
- Lin, Z., He, D., Zhang, X., Nie, Y., Guo, X., Feng, C., & Stewart, J. M. (2005). Linkage map construction and mapping qtl for cotton fibre quality using srnp, ssr and rapd. *Plant Breeding*, 124(2), 180-187. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.01039.x>
- Liu, R., Wang, B., Guo, W., Qin, Y., Wang, L., Zhang, Y., & Zhang, T. (2012). Quantitative trait loci mapping for yield and its components by using two immortalized populations of a heterotic hybrid in *Gossypium hirsutum* L. *Molecular Breeding*, 29(2), 297-311. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9547-0>
- Liu, R., Gong, J., Xiao, X., Zhang, Z., Li, J., Liu, A., Lu, Q., Shang, H., Shi, Y., Ge, Q., Iqbal, M. S., Deng, X., Li, S., Pan, J., Duan, L., Zhang, Q., Jiang, X., Zou, X., Hafeez, A., ... Yuan, Y. (2018). Gwas analysis and qtl identification of fiber quality traits and yield components in upland cotton using enriched high-density snp markers. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1067. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01067>

- Liu, X., Teng, Z., Wang, J., Wu, T., Zhang, Z., Deng, X., Fang, X., Tan, Z., Ali, I., Liu, D., Zhang, J., Liu, D., Liu, F., & Zhang, Z. (2017). Enriching an intraspecific genetic map and identifying qtl for fiber quality and yield component traits across multiple environments in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Molecular Genetics and Genomics*, 292(6), 1281-1306. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1347-8>
- Luo, H. H., Zhang, H. L., Zhang, Y. L., & Zhang, W. F. (2017). Evolution characteristics related to photosynthesis, growth and yield in some old and new cotton cultivars. *Photosynthetica*, 55(2), 301-307. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0223-9>
- Naeem, M., Iqbal, M., Sami-UI-Allah, W. N., & Zahid, W. (2017). QTL Identification for Within-Boll Yield Components of *Gossypium hirsutum* L. *Philippine Agricultural Scientist*, 100(3).
- Paterson, A. H., Brubaker, C. L., & Wendel, J. F. (1993). A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic dna suitable for rflp or pcr analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 122-127. <https://doi.org/10.1007/BF02670470>
- Pettigrew, W. T., Meredith Jr, W., & Zeng, L. (2013). Response of obsolete and modern cotton genotypes to varying plant densities. [Publisher: Cotton Foundation]. *Journal of Cotton Science*, 17(4), 253-262.
- Qin, H., Chen, M., Yi, X., Bie, S., Zhang, C., Zhang, Y., Lan, J., Meng, Y., Yuan, Y., & Jiao, C. (2015). Identification of associated ssr markers for yield component and fiber quality traits based on frame map and upland cotton collections (D. D. Fang, Ed.). *PLOS ONE*, 10(1), e0118073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118073>
- Shen, X., Guo, W., Lu, Q., Zhu, X., Yuan, Y., & Zhang, T. (2007). Genetic mapping of quantitative trait loci for fiber quality and yield trait by ril approach in upland cotton. *Euphytica*, 155(3), 371-380. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9338-6>
- Shi, Y., Li, W., Li, A., Ge, R., Zhang, B., Li, J., Liu, G., Li, J., Liu, A., & Shang, H. (2015). Constructing a high-density linkage map for *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barba-*

- dense and identifying QTLs for lint percentage [Publisher: Wiley Online Library]. *Journal of integrative plant biology*, 57(5), 450-467.
- Su, J., Fan, S., Li, L., Wei, H., Wang, C., Wang, H., Song, M., Zhang, C., Gu, L., Zhao, S., Mao, G., Wang, C., Pang, C., & Yu, S. (2016). Detection of favorable qtl alleles and candidate genes for lint percentage by gwas in chinese upland cotton. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01576>
- Wang, B., Guo, W., Zhu, X., Wu, Y., Huang, N., & Zhang, T. (2007). Qtl mapping of yield and yield components for elite hybrid derived-rils in upland cotton. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60005-8](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60005-8)
- Wang, H., Huang, C., Guo, H., Li, X., Zhao, W., Dai, B., Yan, Z., & Lin, Z. (2015). Qtl mapping for fiber and yield traits in upland cotton under multiple environments (K. Wang, Ed.). *PLOS ONE*, 10(6), e0130742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130742>
- Wang, M., Li, C., & Wang, Q. (2014). Quantitative trait loci mapping and genetic dissection for lint percentage in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Genetics*, 93(2), 371-378. <https://doi.org/10.1007/s12041-014-0385-9>
- Wells, R., & Meredith, W. (1984). Comparative Growth of Obsolete and Modern Cotton Cultivars. III. Relationship of Yield to Observed Growth Characteristics1. *Crop Science - CROP SCI*, 24. <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400050010x>
- Worley, S., Culp, T., & Harrell, D. (1974). The relative contributions of yield components to lint yield of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. [Publisher: Springer]. *Euphytica*, 23(2), 399-403.
- Xia, Z., Zhang, X., Liu, Y.-y., Jia, Z.-f., Zhao, H.-h., Li, C.-q., & Wang, Q.-l. (2014). Major gene identification and quantitative trait locus mapping for yield-related traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Journal of Integrative Agriculture*, 13(2), 299-309. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60508-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60508-0)



- Zhang, J., & Stewart, J. M. (2000). Economical and rapid method for extracting cotton genomic dna. *J Cotton Sci*, 4(3).
- Zhang, S., Feng, L., Xing, L., Yang, B., Gao, X., Zhu, X., Zhang, T., & Zhou, B. (2016). New QTLs for lint percentage and boll weight mined in introgression lines from two feral landraces into *Gossypium hirsutum* acc TM-1 [Publisher: Wiley Online Library]. *Plant Breeding*, 135(1), 90-101.
- Zhang, T., Yuan, Y., Yu, J., Guo, W., & Kohel, R. J. (2003). Molecular tagging of a major qtl for fiber strength in upland cotton and its marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 262-268. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1101-3>
- Zhang, Z.-S., Xiao, Y.-H., Luo, M., Li, X.-B., Luo, X.-Y., Hou, L., Li, D.-M., & Pei, Y. (2005). Construction of a genetic linkage map and qtl analysis of fiber-related traits in upland cotton (*gossypium hirsutum* l.) *Euphytica*, 144(1-2), 91-99. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-4629-x>