

Proyecto Fin de Carrera

INGENIERO AGRÓNOMO

“Validación de marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla (*Allium cepa* L.). Aplicación a la selección en poblaciones mejoradas de Cebolla Fuentes de Ebro.”

Autor:

José Ignacio López Villalba

Directores:

Ana Gárces-Claver
Cristina Mallor Giménez

Escuela Politécnica Superior de Huesca
2014

AGRADECIMIENTOS

Sin duda el presente trabajo fin de carrera lleva implícita la necesidad de manifestar mi más sincero y cordial agradecimiento a todas las personas que han hecho posible su desarrollo, en concreto:

Al laboratorio de Biología Molecular del Plantas, de la Unidad de Hortofruticultura del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) por haberme brindado la oportunidad de realizar un trabajo de tales características prestándome sus instalaciones y equipos, así como el ambiente de trabajo realmente acogedor en el que me he desenvuelto durante la realización del mismo.

Deseo agradecer por su dirección, instrucción y gran ayuda incondicional en todo momento a Ana Garcés, Cristina Mallor y Ester Sales.

A Mary (Rita Navarro) por toda la ayuda ofrecida, la técnica que me ha conseguido transmitir, así como por toda la paciencia que le ha tocado tener conmigo.

Al resto de personas: Teresa, Pilar, Ramón, Oreto, Arantxa, Bea, Pili... que han habitado el Laboratorio durante mi estancia, generando un clima de trabajo excepcional, ofreciéndome su grata ayuda en todo momento.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Lista de Abreviaturas.....	III
Resumen.....	V
Abstract.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El cultivo de la cebolla.....	1
1.1.1. Características botánicas de la cebolla	1
1.1.2. Importancia económica.....	2
1.1.3. La colección de cebolla del Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas del CITA.....	3
1.1.4. La cebolla de Fuentes de Ebro.....	4
1.2. Mejora genética de la cebolla.....	6
1.2.1. Genética y mejora de la cebolla.....	6
1.2.2. Androesterilidad en cebolla	7
1.2.3. Métodos de selección	9
1.2.4. Marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla..	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Material vegetal.....	17
3.2. Extracción y cuantificación de ADN a partir de hoja y bulbo de cebolla.....	18
3.3. Marcadores moleculares, amplificaciones y electroforesis.....	20
3.4. Análisis de los resultados.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Optimización de la extracción de ADN de hoja y bulbo de cebolla.	23

4.3. Identificación de líneas androestériles y mantenedoras en las poblaciones Fuentes 1 y Fuentes 2	27
4.4. Genotipado para androesterilidad de variedades de cebolla españolas conservadas en el BGHZ	29
5. CONCLUSIONES	33
6. REFERENCIAS	35
ANEXO I: Protocolo de extracción de ADN optimizado.....	41
ANEXO II: Condiciones y reacciones de PCR para los distintos marcadores utilizados	42
1.1. Condiciones y reacción para conjunto de cebadores MK.....	42
1.2. Condiciones y reacción para el par de cebadores OPT	42
1.3. Condiciones y reacción para par de cebadores jnurf05	43
1.4. Condiciones y reacción para el par de cebadores PSAO.....	43
1.5. Condiciones y reacción para el par de cebadores DNF-566	44
1.6. Condiciones y reacción para el par de cebadores RNS-357.....	44
ANEXO III: Comparación de medias obtenidas de valores de concentración de ADN y de los ratios 260/280 y 260/230 en los 4 ensayos realizados.....	45
ANEXO IV: Resultados MK, OPT y Jnurf05 para Familia Fuentes 2.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variedades locales de cebollas españolas (BGHZ).....	18
Tabla 2: Modificaciones del tratamiento del material vegetal y de los volúmenes de CTAB y de 2-mercaptoetanol para los cuatro métodos de extracción de ADN total ensayados.....	19
Tabla 3: Marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla analizados en este trabajo.....	21
Tabla 4: Concentraciones de ADN y ratios de absorbancia para los cuatro ensayos realizados.....	23
Tabla 5: Concentración y ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 (medias \pm SE, con n=3) ^a obtenidos para los cuatro métodos ensayados.....	24
Tabla 6: Análisis de 5 marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla utilizando cinco líneas fenotipadas de <i>A. cepa L</i>	26
Tabla 7: Resultados de la amplificación con los marcadores MK, OPT y jnur05 los individuos de las familias Fuentes 1 y Fuentes 2 (<i>A. cepa L.</i>). En las celdas se indica el nº de individuos que han presentado el mitotipo y el estado alélico genotipado por el marcador.....	29
Tabla 8: Mitotipo de 20 variedades de cebolla, analizado con el marcador MK, y genotipado del <i>locus MS</i> con los marcadores jnur05 y OPT.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución por continentes de la producción mundial en el año 2011 de cebollas secas, cebollas verdes y chalotes (FAOSTAT, 2013).....3

Figura 2: Electroforesis de los fragmentos amplificados con los marcadores PsaO, OPT, DNF-566 y jnur05 a partir de ADN de 6 plantas de la línea androestéril BGHZ-4552. También se observa la amplificación con jnur05 de las entradas PM (fértil) y PF (androestéril), procedentes de una parcela de un agricultor.....27

Figura 3: Ejemplo de los productos de amplificación obtenidos para algunos individuos de las familias Fuentes 1 y Fuentes 2 utilizando el marcador MK. a) Individuos de la familia Fuentes 1, los fragmentos amplificados de 833 y 628 pb, correspondieron a un genotipo CMS-T. b) Individuos de la familia Fuentes 2, el fragmento amplificado fue de 628 pb, lo que indicó citoplasma N.....28

Figura 4: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos para las variedades españolas de cebolla utilizando el marcador citoplasmático MK.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNasa: Endonucleasa digestiva.

ADNmt: ADN mitocondrial.

AFLPs: (Amplified Fragment Length Polimorphism PCR) Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados.

ANOVA: (Analysis of variance) Análisis de varianza.

BGHZ: Banco de Germoplasma de Hortícolas de Zaragoza.

CAPS: (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) Secuencias digeridas amplificadas polimórficas.

CITA: Centro de Investigación y Tecnológica Agroalimentaria de Aragón.

cM: Centimorgan

CMS: (Cytoplasmic Male sterility) Esterilidad citoplasmática masculina.

CMS-S: (Fertility restoration system type S) Sistema restauración fertilidad tipo S.

CMS-T: Fertility restoration system type S) Sistema restauración fertilidad tipo T.

CTAB: (Cetyl Trimethylammonium Bromide) Bromuro de cetiltrimetilamonio.

EDTA: (Ethylenediaminetetraacetic) etilendiaminotetraacético.

N₂: nitrógeno líquido.

OPT: (Putative oligopeptide transporter) Gen del transporte oligopeptido putativo.

ORF: (Open Reading Frame) Marco de lectura abierto.

Pb: pares de bases.

PCR: (Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa.

RAPD: (Random Amplified Polymorphic DNA) Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphisms) Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

SCAR: (Sequence Characterised Amplified Region) Secuencia caracterizada de región amplificada.

SNP: (Single-nucleotide polymorphism) Polimorfismo de um único nucleótido.

TAE: Tris-acetato-EDTA.

RESUMEN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, tanto en producción como en superficie cultivada. Actualmente, para el desarrollo de híbridos F1 en este cultivo es indispensable el uso de la androesterilidad citoplasmática. En relación a este carácter se han desarrollado diferentes marcadores moleculares para seleccionar las líneas adecuadas para la obtención del híbrido (androestéril y mantenedora). Sin embargo, estos marcadores no siempre predicen adecuadamente el genotipo.

En este Proyecto Final de Carrera se han validado diferentes marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla (*A. cepa* L.) para la selección de plantas androestériles y mantenedoras. Además, se ha optimizado un método de extracción del ADN a partir de cebolla, realizando modificaciones del volumen de las soluciones utilizadas en la extracción, así como, los procesos de tratamiento de las muestras de partida (fresco o congeladas con N₂).

A partir de diferentes entradas de cebolla de genotipo y/o mitotipo conocido se ha comprobado la viabilidad de varios marcadores moleculares asociados a la androesterilidad: por un lado, el marcador MK asociado al tipo de citoplasma (N, CMS-S y CMS-T) y, por otro, los marcadores OPT, PsaO, jnurf05, DNF-566 y el RNS-357 asociados al *locus Ms*. Concluyendo, que el uso en conjunto de los marcadores MK y Jnurf05 ha permitido identificar correctamente el mitotipo y genotipo, del material vegetal utilizado en este trabajo como control. Una vez seleccionados los marcadores adecuados, dos familias de la variedad local Fuentes de Ebro han sido utilizadas para la selección de plantas androestériles y mantenedoras. La familia Fuentes 1 ha sido caracterizada con un mitotipo CMS-T; no resultando de interés para la producción de híbridos dada la complejidad del control de este sistema de androesterilidad. En cuanto a la familia Fuentes 2, se han identificado posibles líneas mantenedoras las cuales podrían resultar útiles en programas de mejora futuros. Finalmente, la caracterización de los genotipos y mitotipos de veinte variedades de cebollas locales españolas ha mostrado variabilidad para el carácter de androesterilidad.

ABSTRACT

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most important horticultural crops in the World both in production and in cultivated surface. Currently, for the development of F1 hybrids of onion is essential the use of cytoplasmic male sterility. In relation to this trait, different molecular markers have been developed to select appropriate lines for obtaining hybrid (male sterile and maintainer). However, these markers not always predict adequately the genotype.

In this final project there have been validated different molecular markers associated with the male sterility in onion (*Allium cepa* L.) for selection of male sterile plants and maintainer. In addition, there has been optimized a method of extraction of the DNA from onion, performing changes in the volume of the solutions used in the extraction, as well, in the treatment processes of the starting samples (fresh or frozen with N₂).

From different lines of genotype and/or known mitotype has proven the viability of various molecular markers associated with male sterility: on the one hand, the marker MK associated with the type of cytoplasm (N, CMS-S and CMS-T) and for other one, the OPT, PsaO, jnur05, DNF-566, and the RNS-357 markers associated with *Ms locus*. The use of MK together with jnur05 has identified the mitotypes and genotypes of the plant material used in this study as a control. After selecting the suitable markers, two families of the local variety “Fuentes de Ebro” have been used for the selection of male-sterile plants and maintainer. The “Fuentes 1” has been characterized with CMS-T, resulting not interest for the production of hybrid seeds due to the complexity of the system for the restorer of fertility. As for “Fuentes 2” has identified potential maintainer lines which may be useful in future onion breeding programs. Finally, characterization of genotypes and mitotypes of twenty varieties of local Spanish onions showed variability in the male-sterile trait.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cultivo de la cebolla

1.1.1. Características botánicas de la cebolla

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una hortaliza que se encuentra entre las plantas más antiguas cultivadas por el hombre, se viene utilizando desde tiempos prehistóricos con diferentes usos alimenticios, en medicina e incluso con fines religiosos (Havey, 1993).

Aunque no se ha encontrado en su estado silvestre se piensa que la especie se domesticó por primera vez en Asia Central (Vavilov, 1926).

La clasificación botánica del género *Allium* usando técnicas moleculares, fue expuesta por Friesen et al. (2006). El contexto taxonómico en el que se engloba el género es el siguiente (A.P.G, 2003):

Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Monocotiledóneas
Orden:	Asparagales
Familia:	Alliaceae
Género:	<i>Allium</i>
Especie:	<i>Allium cepa</i> L.

Se trata de una planta de ciclo bienal, que en respuesta a unas determinadas condiciones de fotoperiodo forma en el primer año los bulbos, resultado de la acumulación de carbohidratos y otros compuestos de reserva en la base de las hojas. El género *Allium* y en especial *A. cepa* son muy dependientes del fotoperiodo y del termoperiodo.

En el segundo año las plantas emiten un escapo floral, después de un periodo de latencia del bulbo en respuesta a condiciones de juvenilidad y del medio ambiente. La umbela está compuesta por un número variable de flores (de 50 a 2000), las cuales se mantienen en antesis durante unas dos semanas. El polen se libera de 24 a 36 horas antes de la receptividad del estigma, fenómeno que se conoce como proterandria o protandria y que favorece la polinización cruzada. No obstante, también se da la autopolinización puesto que no todas las flores de la umbela se abren a la vez y por tanto, puede

efectuarse la polinización entre las diferentes flores de la misma umbela o las otras umbelas del mismo bulbo. Se pueden producir hasta seis semillas por flor.

El sistema radicular está formado por numerosas raíces fasciculadas blancas. El tallo está representado por una masa caulinar aplastada con los entrenudos cortos y situada en la base del bulbo llamada disco, que emite un escapo floral hueco de sección cilíndrica de entre uno y dos metros de largo que da origen a la inflorescencia.

Las hojas insertadas sobre el disco están constituidas de dos partes fundamentales, una inferior o vaina envolvente y una superior o filodio, hueca redondeada y con los bordes unidos. Las vainas pertenecientes a las hojas exteriores adquieren una consistencia membranosa y actúan como túnicas protectoras, mientras que las vainas de las hojas interiores engruesan al acumular sustancias de reserva formando la parte comestible del bulbo (Maroto, 1995).

1.1.2. Importancia económica

En la actualidad la cebolla se cultiva en todo el mundo, ya que existe un gran número de cultivares con distinta adaptación a las diferencias de la climatología y del fotoperiodo que influyen en su desarrollo. Su cultivo es el más importante dentro de su género y en cuanto a cultivos de hortalizas mundiales, se encuentra en segundo lugar después del tomate (FAOSTAT, 2013).

La producción mundial de cebollas en el año 2011 alcanzó un valor para cebollas secas de 86 millones de toneladas y de 4 millones de toneladas para cebollas verdes y chalotes (FAOSTAT, 2013). Los porcentajes de producción por continentes se pueden observar en la figura 1.

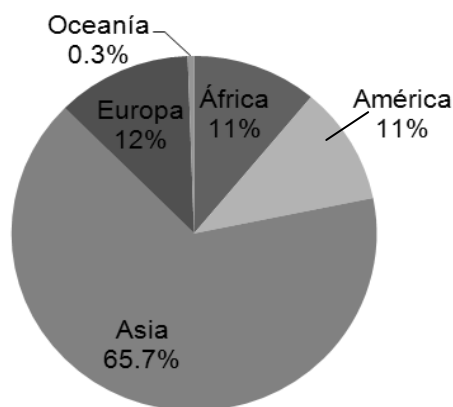


Figura 1: Distribución por continentes de la producción mundial en el año 2011 de cebollas secas, cebollas verdes y chalotes (FAOSTAT, 2013)

En relación con el comercio exterior, España es un país exportador de cebolla generalmente a países europeos como Alemania, Inglaterra, Portugal, Francia, Holanda y Bélgica, con un 90% de la exportación total (MAGRAMA, 2014). La producción española para cebollas secas fue de 1,3 millones de toneladas y para cebollas verdes y chalotes de 43.000 toneladas, situándose así en el puesto décimo segundo de productores mundiales.

Se cultiva en todas las comunidades de España teniendo gran importancia en comunidades mediterráneas como Valencia, Cataluña o Andalucía, así como zonas de interior como Aragón o Castilla-La Mancha, siendo el 85% de la superficie en regadío y al aire libre (Soria, 1997).

Aragón ocupa el quinto puesto tanto en producción como en superficie cultivada, cultivando mayoritariamente cebolla grano y babosa (Carravedo y Mallor, 2007).

1.1.3. La colección de cebolla del Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas del CITA

El Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas (BGHZ) se creó en el año 1981 con un objetivo prioritario: la conservación de los recursos genéticos hortícolas de España para evitar la pérdida de variabilidad intraespecífica que se estaba produciendo debido a la sustitución de muchas de las antiguas variedades locales por variedades mejoradas, más uniformes pero con una

base genética más restringida (Álvarez y Marín, 1983). Después de más de 30 años del inicio de sus actividades, el BGHZ se ha convertido en un importante banco de germoplasma de hortícolas tanto a nivel nacional como internacional. Actualmente, el banco conserva 17.780 entradas pertenecientes a 357 especies, que incluyen, además de cultivares locales de las hortícolas más importantes, especies de cultivo minoritario y otras silvestres relacionadas, todas ellas de gran utilidad para la mejora genética y la conservación de la biodiversidad.

Las diferentes entradas se mantienen en el banco en forma de semillas en condiciones de larga duración, esto es a baja temperatura y humedad relativa, lo que les permite conservarse durante décadas sin perder el poder germinativo (Mallor et al., 2012).

En el BGHZ, destacan importantes colecciones específicas, entre las que se incluye la de cebolla, que ha sido objeto de la publicación “Variedades autóctonas de cebollas españolas” (Carravedo y Mallor, 2007), en las que se describen las características de las entradas que conforman esta colección. Actualmente la colección de cebolla está formada por 686 entradas.

Parte de este material vegetal ha sido caracterizado morfológica y molecularmente (Mallor et al., 2011; Mallor et al., 2013) y en la actualidad se está utilizando para el estudio de caracteres relacionados con la calidad (Garcés-Claver et al., 2013; Andrés-García et al., 2013). Adicionalmente, se están desarrollando metodologías para la identificación/desarrollo de genotipos de interés (líneas doblehaploides y líneas androestériles), necesarios para llevar a cabo programas de mejora en esta especie (Castillo et al., 2013).

1.1.4. La cebolla de Fuentes de Ebro

La cebolla Fuentes de Ebro es una variedad autóctona aragonesa caracterizada principalmente por su escaso picor, lo que la hace un producto valorado muy positivamente por los consumidores, además de su terneza y jugosidad; popularmente se dice de ella que “no pica y tiene un sabor dulzón”.

Esto viene motivado por las características del suelo de la zona de producción, las prácticas del cultivo y el material vegetal utilizado (Mallor et al., 2007).

También se caracteriza por su cuello grueso, su forma globosa redondeada por la raíz y ligeramente alargada hacia el tallo y su coloración externa blanco-paja. Sus túnicas interiores son blancas, carnosas y crocantes.

En Aragón se cultivan en torno a unas 150 ha de esta variedad (Mallor et al., 2010). Desde 1997 cuenta con la marca C'alia que otorga el Gobierno de Aragón a los productos agroalimentarios con reconocida calidad y reputación.

Desde el 26 de octubre de 2010 cuenta con la Denominación de Origen (DO) Protegida y el pasado 25 de noviembre de 2013 se publicó en el DOUE la inscripción de la Cebolla Fuentes de Ebro DOP en el Registro de Denominaciones de Origen de la Unión Europea. Su integración en este registro de denominaciones de origen limita la zona de cultivo en la confluencia del valle del Ginel con el valle del Ebro, englobando las localidades de Fuentes de Ebro, Mediana de Aragón, Osera de Ebro, Pina de Ebro, Quinto de Ebro y Villafranca de Ebro. Actualmente, cuenta con tres empresas inscritas, 19 agricultores y 55 hectáreas cultivadas. (<http://www.aragon.es>, Denominaciones de origen protegidas).

En el presente proyecto se ha trabajado con material vegetal de esta variedad que proviene de un programa de selección que se está llevando a cabo con esta variedad (Mallor y Sales, 2012). Dicho programa nace del interés de homogeneizar los bulbos de esta variedad principalmente en cuanto a su nivel de pungencia, ya que se había puesto de manifiesto grandes diferencias entre los diversos individuos (Mallor et al., 2010).

El programa de selección se inició con la obtención de semillas de esta variedad a través de agricultores de Fuentes de Ebro, las muestras recolectadas fueron 15 y se sembraron para su estudio en 2006. El estudio de este material vegetal puso de manifiesto la heterogeneidad de los bulbos, particularmente en cuanto a su nivel de pungencia, justificando así la necesidad de iniciar un programa de mejora con esta variedad (Mallor et al., 2010). Con este objetivo, en 2008 se realizó una selección masal de los bulbos cuya expresión genotípica resultó más interesante, considerando como criterio

principal la pungencia pero también otras características relevantes en la calidad de la cebolla como el tamaño, la firmeza y el contenido en sólidos solubles. Se cultivaron conjuntamente en una jaula de aislamiento y se obtuvo la semilla de cada planta individualmente. De esta manera, se formaron doce familias de medios hermanos (misma madre y diferentes padres). Estas doce familias seleccionadas se sembraron en dos parcelas, una situada en Montañana en el CITA (Zaragoza) y la otra en Fuentes de Ebro (Zaragoza). Se utilizó un ensayo estadístico de bloques al azar con cuatro repeticiones y parcelas elementales de 80 plantas. Se analizaron 20 bulbos por repetición, parcela y familia. De las 12 familias, las que mejor resultado proporcionaron en cuanto a los parámetros deseados, fueron la Familia 1 (F1) y la Familia 2 (F2). Con objeto de incrementar la cantidad de semilla, se cultivaron los bulbos en dos jaulas de aislamiento en el CITA, y se recogieron las semillas de cada familia por separado. Estas dos familias F1 y F2 han sido objeto de estudio en este proyecto, para identificar genotipos de interés en estas líneas que ya han sido sometidas a un proceso de selección.

1.2. Mejora genética de la cebolla

1.2.1. Genética y mejora de la cebolla

La cebolla es una especie diploide cuyo genoma consta de 15.300 Mpb/1C, y se organiza en ocho pares de cromosomas ($2n=16$) (Fristch et al., 2002), siendo éstos de gran tamaño y con una morfología bien definida de sus cromátidas y de la posición de su centrómero. Las poblaciones son altamente heterocigotas y muestran una variación fenotípica importante (Mc Callum et al., 2007).

Generalmente la mejora genética en cebolla persigue obtener individuos con:

- Uniformidad del tamaño, forma, color y fecha de madurez del bulbo.
- Altos rendimientos.

- Buena adaptación a las condiciones de cultivo de una determinada zona.
- Resistencias a plagas y enfermedades.
- Resistencia a la floración prematura.
- Piel intacta y atractiva.
- Cuello fino.
- Bulbo único y centrado (sin bulbos dobles ni divididos).
- Carne firme.

Además según sea su categoría, se buscan diferentes mejoras:

- Bulbos destinados a almacenamiento: se busca que posean una dormancia larga innata, carne dura y pieles resistentes.
- Bulbos destinados al consumo en fresco: deben tener sabor suave, ser dulces y de un único anillo concéntrico grande.
- Bulbos destinados a deshidratación: deben tener un elevado contenido en materia seca, piel y carne blancas y un contenido bajo en azúcares reductores. Para este tipo son así mismo deseables los bulbos esféricos y aplanados, porque facilitan el corte mecánico de cuello y raíces con una pérdida reducida de carne del bulbo.

1.2.2. Androesterilidad en cebolla

La esterilidad citoplasmática masculina o CMS (*Cytoplasmic Male Sterility*) se puede encontrar en más de 140 especies de plantas, incluyendo la cebolla (Laser y Lersten, 1972). Los factores inductores se encuentran en el genoma mitocondrial (Hanson, 1991) por lo que se trata de un carácter que se transmite sólo de las madres a la descendencia. La CMS puede ser restaurada por acción de genes nucleares 'restauradores de la fertilidad' (*Rf*). Estos genes han sido aislados en petunia (Bentolila et al., 2002), rábano (Brown et al., 2003), arroz (Komori et al., 2004) y sorgo (Klein et al., 2005).

En las plantas superiores como la cebolla, la esterilidad masculina puede deberse bien a un fallo en la formación de polen, a la producción de polen no funcional, o a la incapacidad de producir la dehiscencia de las anteras en la floración. Es por ello que los individuos androestériles, al no desarrollar el polen, son incapaces de autopolinizarse, por lo que cualquier semilla que produzcan deberá ser el resultado de una polinización cruzada. Esta característica es utilizada por tanto en la obtención de híbridos. En ausencia de androesterilidad el cruzamiento controlado sólo se podría conseguir eliminando manualmente en las plantas de la línea femenina las anteras de todas las flores que forman la umbela y a continuación fecundar también manualmente los estigmas con el polen del progenitor deseado en el momento adecuado, lo cual resulta extremadamente trabajoso.

En cebolla existen dos tipos androesterilidad: la CMS-S (Jones y Emsweller, 1936) y CMS-T (Berninger, 1965), en función del control genético de la restauración de la fertilidad. Mientras que para CMS-S la restauración de la fertilidad es controlada por un único *locus*, denominado *Ms*, para CMS-T pueden estar interviniendo tres *loci* independientes (Jones y Clarke, 1943; Scheisguth, 1973).

Como se ha mencionado, la CMS es inducida por factores que se encuentran en el genoma mitocondrial y que en consecuencia se heredan vía materna (Brewster, 1994). Por tanto la identificación del tipo de citoplasma (mitotipo) es esencial para conocer el carácter androestéril. Podemos encontrar tres tipos de individuos: i) el mitotipo normal (N), siempre dará lugar a individuos con polen fértil; ii) el mitotipo de citoplasma S (sistema CMS-S), producirá junto con genotipos recesivos homocigóticos *msms* individuos androestériles; iii) y el mitotipo de citoplasma T (sistema CMS-T), producirá individuos fértiles o androestériles según el estado alélico de los *loci* que controlen la androesterilidad de este sistema.

Por tanto, en la cebolla, como resultado de la interacción entre el factor citoplasmático y el gen nuclear *Ms* podemos encontrar:

a) líneas androestériles (CMS): en las que el mitotipo podrá ser CMS-T o CMS-S. En el caso del sistema CMS-S, la forma del gen nuclear *Ms* determinará la producción de polen fértil. Cuando el gen sea dominante

homocigoto ($MsMs$) o heterocigoto ($Msms$) se producirá polen fértil y cuando la forma alélica sea homocigota recesiva ($msms$) el polen no será fértil.

b) líneas restauradoras de la fertilidad o mantenedoras ($Nmsms$): son fértiles con mitotipo N y gen nuclear recesivo homocigótico ($msms$). Estas líneas son las encargadas de perpetuar las líneas androestériles porque su hibridación con ésta producirán descendencias cuyo genotipo será $Smsms$. Las plantas con esta constitución, se dan con una frecuencia del 5% en la mayoría de las poblaciones (Pike, 1986).

El sistema genético CMS-S fue descubierto en el cultivar "*Italian Red*" y fue utilizado por primera vez por Jones y Clarke (1943) el cual describió la genética de la androesterilidad así como la forma de utilizarlo para producir cultivares híbridos. El sistema CMS-T, fue identificado por Berninger (1965) en el cultivar francés "*Jaunepaille des Vertus*". Está controlado por tres *loci* independientes (Schweisguth, 1973) motivo por el cual el sistema CMS-S es el preferido por los mejoradores y empresas de semillas ya que la herencia de un único *locus* es más sencilla y estable en diferentes condiciones climáticas (Havey, 2000). En el sistema CMS-T, las plantas son fértiles si tienen el alelo dominante restaurador de la fertilidad A o dos de los alelos dominantes C y D para dos genes complementarios (Havey, 2002).

Así, la identificación de los tipos de citoplasma (N, S o T) resulta esencial como primer paso para la obtención de híbridos F1, ya que este tipo de programas de mejora puede llevar de 4 a 8 años con análisis genéticos convencionales, periodo que se incrementa en cebolla dada la característica bienal de este cultivo. Por ello la identificación de marcadores moleculares asociados a estos mitotipos y genes nucleares resulta crucial para una eficiente selección de genotipos útiles en la obtención de híbridos (Havey, 1995).

1.2.3. Métodos de selección

En cuanto a los métodos de selección utilizados en cebolla, se incluyen la selección masal, la selección genealógica y el desarrollo de híbridos F1.

En la selección masal se eligen las mejores plantas de una población según los objetivos buscados. Es más efectiva cuando los caracteres esperados son fácilmente evaluables y de alta heredabilidad, siendo además deseable que estos caracteres estén determinados por pocos genes. Si trabajamos con caracteres cuantitativos o de baja heredabilidad que están más condicionados por la interacción ambiente-genotipo resulta menos recomendable utilizar este método. Resulta muy práctico por ejemplo cuando se requiere un cambio importante para adaptar una población mejorada a una nueva localidad, debido a que los bulbos no deseados son cuantiosos y fácilmente notorios.

Otro método de selección es el genealógico, procedimiento que es factible utilizar tanto para analizar caracteres cuantitativos como cualitativos, dado que se puede distinguir la interacción ambiente-genotipo. Recolectando la semilla individualmente de cada planta se obtienen familias de medios hermanos (misma madre y diferentes padres). Se seleccionan entonces bulbos en base a la media de la familia de medios hermanos y de sus desviaciones respecto a la media de la población.

En cuanto a la producción de híbridos, al tratarse de una especie alógama este sistema permite la explotación de la heterosis, evitando así la depresión por consanguinidad. Debido a este vigor híbrido, el cruzamiento de variedades de cebolla muy distintas da lugar a híbridos que exceden en vigor a los parentales. En los híbridos la influencia de alelos recesivos desfavorables presentes en homocigosis en una de las líneas parentales, se oculta por la presencia de alelos deseables dominantes del otro progenitor. Por ejemplo, se cruzó una cebolla fina con una variedad noruega de bulbo grande y se obtuvieron híbridos con un vigor superior a cualquiera de los parentales (Synnevag, 1988).

La semilla que procede de los cultivares híbridos tiene más supervivencia y rendimiento que la semilla de un cultivar con polinización abierta, que siempre tendrá semillas procedentes de autofecundación. Otro punto positivo sobre la utilización de híbridos lo tienen las empresas de semillas ya que los híbridos no se pueden reproducir de la semilla guardada,

sino que deben ser producidos de nuevo a partir de las líneas parentales apropiadas (Brewster, 1994).

Para la producción de híbridos se tienen que desarrollar, por un lado, líneas androestériles y mantenedoras que estén bien adaptadas a la localidad donde se cultivará el híbrido, y por el otro una línea polinizadora con una buena aptitud combinatoria específica. Para que el híbrido se desarrolle adecuadamente, utilizando el sistema CMS-S, la línea madre deberá tener la constitución genética '*Smsms*', con esto, se asegura que no se produzca la autofecundación. Estas líneas madres se mantienen al cruzarlas con líneas mantenedoras como se refleja en el apartado 1.2.2. En cuanto a la línea paterna puede tener una constitución de citoplasma normal (N) con cualquier combinación (*MsMs*, *Msms* o *msms*) o con un citoplasma S una combinación *Msms* o *MsMs*.

Las líneas maternas y paternas se siembran juntas para que se crucen y con ello se obtiene la semilla híbrida en la F1, la cual se recoge en las líneas maternas. Hay que tener en cuenta en la producción de híbridos que los individuos pueden sufrir polinización cruzada de manera entomófila es por ello que estas líneas androestériles deberían estar separadas 1.5 km de otros cultivos de cebolla para evitar contaminaciones polínicas. Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de producir semilla híbrida es conseguir que las líneas maternas y paternas florezcan a la vez, lo cual se puede optimizar escalonando las fechas de plantación de las dos líneas.

Cabe destacar que la utilización de híbridos F1 de cebolla está implantada actualmente en España. El desarrollo de nuevos híbridos es de interés creciente para las casas comerciales de semillas, que buscan nuevos híbridos con aspectos destacables como: la homogeneidad de cultivo, tanto en su forma como desarrollo de cultivo; la precocidad; el mayor periodo de conservación y, por lo tanto, de comercialización; y la presencia de un único anillo de formación interior, idóneo para el "slicing" o cortado para aros de cebolla y aprovechamiento en la industria de la IV gama. Para el desarrollo de estos híbridos en cebolla a escala comercial es indispensable el uso de la androesterilidad citoplasmática. Esta herramienta trae aparejado la necesidad de obtener una variedad que actúe como madre y que sea androestéril, otra

variedad que sea fértil y mantenedora de la androestéril, y una tercera variedad que actúe como padre y que esté perfectamente adaptada al lugar de cultivo, además de tener una buena capacidad combinatoria y otras características de interés.

A pesar del conocimiento que hasta la fecha hay sobre el control genético de la androesterilidad, todavía queda mucho trabajo por hacer para identificar con exactitud los genotipos androestériles y las líneas mantenedoras. Los trabajos futuros deberían orientarse hacia la caracterización del gen *Ms* y la identificación de marcadores funcionales en el sistema CMS-S, así como, en la identificación de todos los factores citoplasmáticos que intervienen en la androesterilidad para el cultivo de la cebolla.

1.2.4. Marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que revelan variación (cambios en el ADN) genética e indican puntos de referencia en el genoma que pueden estar asociados a variación fenotípica. Cuando cosegregan con caracteres de interés para el mejorador, se utilizan para la selección indirecta de rasgos fenotípicos con herencia simple y con cierto valor económico en varios cultivos. Los marcadores moleculares integran dos tipos: los marcadores bioquímicos (ej.: isoenzimas) y los basados en el ADN. Estos últimos a su vez se dividen entre los marcadores de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción ("*Restriction Fragment Length Polymorphisms*"; RFLP) y los basados en la PCR. Dentro de los marcadores basados en la PCR, podemos encontrar los desarrollados a partir de ADN de secuencia conocida, como los "*Sequence Characterised Amplified Region*" (SCAR) y "*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*" (CAPS), que son específicos de alelo. Otros marcadores utilizan secuencias de ADN no conocidas, como los "*Random Amplified Polymorphic DNA*" (RAPD) y los "*Amplified Fragment Length Polymorphism*" (AFLPs). Entre otros, las ventajas de los marcadores de ADN radican en su naturaleza altamente polimórfica, su comportamiento neutro frente a la selección, ser independientes de los cambios ambientales, la

detección precoz de los genotipos de interés, así como su ensayo de alta reproducibilidad, sencillo, rápido y de fácil intercambio de datos entre diferentes laboratorios (Joshi et al., 1999).

En relación a *A. cepa* L., la disponibilidad de información relativa a marcadores, secuencias y otros recursos genéticos es bastante limitada en comparación con otros cultivos hortícolas como las solanáceas o las crucíferas. Por otro lado, además del genoma nuclear, en cebolla el genoma mitocondrial también cobra gran importancia, ya que en él se encuentra la capacidad de inducir CMS (Engelke et al., 2004).

En este sentido, se han desarrollado marcadores moleculares para distinguir entre los mitotipos N y CMS-S, basándose en la variación del número relativo de copias de moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt) (Sato, 1998) y en secuencias polimórficas de genomas de los cloroplastos (Havey, 1995; von Kohn et al., 2013). Para la identificación del mitotipo CMS-T se cuenta sólo con dos marcadores: Engelke et al. (2003) desarrollaron un marcador a partir de una secuencia de ADNmt perteneciente al cebollino (*Allium schoenoprasum*) y que diferenciaba el mitotipo CMS-T. Posteriormente, Kim et al. (2009), a partir de este trabajo, diseñaron un marcador en la secuencia *orf725* (*open reading frame; orf*) específica del genoma mitocondrial de la cebolla, que permitió diferenciar entre los tres tipos de citoplasmas en *A. cepa*. El fragmento *orf725* existe en niveles casi indetectables en los sistemas de citoplasmas normales, mientras que se encuentra en cantidad detectable en los sistemas CMS-S y CMS-T. Por otro lado, la secuencia perteneciente al gen *coxI* está presente en los sistemas normales y en los CMS-T, mientras que en los CMS-S es indetectable debido al bajo número de copias. Esta diferenciación entre el número de copias de *orf725* y *CoxI* en los sistemas N, CMS-T y CMS-S, permitió diseñar un único marcador, cuya amplificación precisa un sistema de tres cebadores: un primer cebador común (MK-F) que se anillaba a la secuencia de *coxI* y otros dos cebadores más, que se unían respectivamente a regiones específicas de *orf725* (MK-R1) o *coxI* (MK-R2). Este marcador permite diferenciar los tres sistemas en una sola reacción de amplificación, resultando económico y eficiente.

En relación al sistema CMS-S, se han desarrollado por otra parte marcadores moleculares ligados al *locus Ms* de restauración de la fertilidad. Los primeros marcadores moleculares desarrollados para este carácter fueron dos RFLP ligados al *locus Ms* a unas distancias de 0.9 y 8.6 cM (Gökçe et al., 2002). Posteriormente, a partir de dichos marcadores RFLP, Bang et al. (2011) desarrollaron dos marcadores basados en la PCR, codominantes y específicos de alelo, los *loci* OPT y PSAO. Estos marcadores SCAR están ligados al *locus Ms* a una distancia de 1.5 cM y 6.4 cM respectivamente, no obstante, muestran pequeños desequilibrios de ligamiento entre el marcador y el *locus* lo que puede producir errores en el genotipado de las poblaciones debido a posibles recombinaciones. Recientemente, dos nuevos SCAR, el DNF-566 y el RNS-357 (Yang et al., 2013) ligados al *locus Ms* han sido desarrollados a partir de marcadores aleatorios AFLP. La combinación de estos dos marcadores ofrece información de los tres estados alélicos del *locus Ms/ms*. Paralelamente a este trabajo, se han desarrollado otros dos marcadores, el CAPS jnurf05 (Park et al., 2013), estrechamente ligado al *locus Ms* (distancia menor a 0.1cM) y un marcador tipo SNP (Havey, 2013). Para la aplicación de este último marcador SNP sólo se han descrito y optimizado protocolos que requieren el uso de plataformas de genotipado de alto rendimiento.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Carrera es validar diferentes marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla (*Allium cepa* L.) para la selección de plantas androestériles y mantenedoras en dos poblaciones seleccionadas de la variedad Cebolla Fuentes de Ebro.

Adicionalmente, se validarán los marcadores en otras 20 variedades de cebollas españolas conservadas en el Banco de Germoplasma de Hortícolas de Zaragoza.

Los objetivos parciales son:

1. La optimización de la extracción de ADN a partir de hoja y bulbo de cebolla (*A. cepa* L.).
2. Validación de los marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla.
3. Identificación de líneas androestériles y mantenedoras en dos poblaciones de cebolla de la variedad Cebolla Fuentes de Ebro.
4. Genotipado para el *locus Ms* y sistema CMS-T/CMS-S de 20 variedades de cebollas españolas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para la validación de los marcadores asociados a la androesterilidad y la selección de los más adecuados se utilizó como material vegetal varias entradas de cebolla del Banco de Germoplasma de Hortícolas de Zaragoza (BGHZ) de las que se conocía su fenotipo (androestéril o fértil) y/o su mitotipo (N, CMS-S o CMS-T) y genotipo para el *locus Ms*:

i) Una línea de cebolla con fenotipo androestéril (BGHZ-4552) y otra línea con fenotipo fértil (BGHZ-4553) que actúa como mantenedora de la androestéril, que pertenecen a la variedad 'Rijnsburger'. En estas dos entradas los genotipos son *Smsms* y *Nmsms*, respectivamente. Se utilizaron seis plantas de cada una de ellas.

ii) Una línea de cebolla con fenotipo androestéril (PF, progenitor femenino) y otra con fenotipo fértil (PM, progenitor masculino), ambas obtenidas de la parcela de un agricultor que produce semilla híbrida a escala comercial. Los genotipos de estas dos entradas son *Smsms*, para la androestéril, y N-- para la polinizadora.

iii) Una entrada de cebolla Fuentes de Ebro con fenotipo androestéril (FEE) identificada en campo y verificada mediante tinción vital del polen con FDA (Fluoresceína di acetato). Los genotipos posibles son *Smsms* o T--.

Para la identificación de líneas androestériles y mantenedoras se utilizaron 161 plantas para la familia Fuentes 1 y 81 plantas para familia Fuentes 2 procedentes del programa de selección (Mallor y Sales, 2012), que fueron cultivadas en el CITA.

Además de estas dos familias, el genotipado para los marcadores validados también se realizó para 20 variedades de cebolla españolas conservadas en el BGHZ, cuyas características se detallan en la **Tabla 1**. Estas 20 variedades se han seleccionado de la colección del BGHZ por su pungencia, representando la variabilidad que existe en la colección para este carácter. Este material está siendo también utilizado en el marco de otro proyecto de investigación en el cual se obtuvieron las muestras de bulbo liofilizado que se han utilizado para este trabajo.

Tabla 1: Variedades locales de cebollas españolas (BGHZ)

Nº	Código	Procedencia	Nombre local	Pungencia ^a	Color piel	Fotoperiodo ^b
1	BGHZ-3745	Zaragoza	Zaragozana	Baja	Marrón	Día largo
2	BGHZ-4222	Zaragoza	Cebolla de Fuentes	Baja	Marrón	Día largo
3	BGHZ-0227	Barcelona	Cebolla Vigatana	Baja	Morada	Día largo
4	BGHZ-0534	Córdoba	Cebolla del Pilon	Media	Marrón	Día medio
5	BGHZ-0323	Valencia	Cebolla de Liria	Media	Marrón	Día medio
6	BGHZ-0903	Palencia	Cebolla de Horcal de matanza	Media	Blanca	Día largo
7	BGHZ-1129	Cantabria	Bedoya morada sangre de buey	Media	Morada	Día largo
8	BGHZ-2707	Huesca	Cebolla de Torres morada	Media	Morada	Día largo
9	BGHZ-3331	Baleares	Ceba mallorquina	Media	Blanca	Día medio
10	BGHZ-0347	Cádiz	Cebolla colora	Alta	Morada	Día medio
11	BGHZ-0182	Granada	Cebolla Recas	Alta	Marrón	Día medio
12	BGHZ-0805	Jaén	Cebolla temprana	Alta	Morada	Día medio
13	BGHZ-2399	La Coruña	Cebolla de Betanzos	Alta	Amarilla	Día largo
14	BGHZ-0359	Asturias	Cebolla morada de Amposta	Alta	Morada	Día largo
15	BGHZ-1355	Cuenca	Cebolleta blanca	Alta	Blanca	Día medio
16	BGHZ-0600	Ávila	Cebolla mondonguera	Alta	Marrón	Día largo
17	BGHZ-3096	Teruel	Cebolla pequeña	Alta	Marrón	Día largo
18	BGHZ-4177	Huelva	Cebolla temprana	Alta	Violeta	Día medio
19	BGHZ-1728	La Rioja	Cebolla Recas	Alta	Marrón	Día largo
20	BGHZ-0535	Albacete	Cebolla colorada	Alta	Morada	Día medio

^a Pungencia de los bulbos evaluada mediante cuantificación del ácido pirúvico ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) producido tras la lisis celular usando el método propuesto por Schwimmer y Weston (1961) y modificado por Boyhan et al. (1999): Baja= entre 0 y 3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW, media= entre 3 y 7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW, alta= más de 7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW

^b Descrito en concordancia con la latitud en la que se recolectaron: día corto (0-32º latitud N), día medio (33-39º latitud N) y día largo (>40º latitud N)

3.2. Extracción y cuantificación de ADN a partir de hoja y bulbo de cebolla.

El ADN total fue aislado a partir de 50 mg de hoja joven de plantas de las familias Fuentes 1 y Fuentes 2 y de 75 mg de bulbo liofilizado y molido en el caso de las variedades españolas.

El método seguido inicialmente fue el descrito por Doyle y Doyle (1987) con modificaciones menores (Garcés-Claver et al., 2007). En los primeros pasos de este protocolo se utiliza el CTAB como detergente catiónico que solubiliza las membranas y desplaza cationes unidos al ADN, evitando que actúen las ADNasas. También se

añade 2-mercaptoetanol, para inhibir la oxidación de polifenoles que se liberan en el proceso de homogenización del material.

Dado que los resultados iniciales obtenidos en cuanto a la calidad y cantidad de ADN no fueron los esperados, fue necesario optimizar la extracción para los parámetros que intervenían en estos procesos (el CTAB y el 2-mercaptoetanol), partiendo siempre de los mismos mg de material vegetal. En el proceso de extracción se ensayaron diferentes volúmenes de detergente y antioxidante: i) dos volúmenes de buffer CTAB (400-800 μ l); ii) dos volúmenes de 2-mercaptoetanol (0.4-0.8 μ l); y iii) dos procesos de tratamiento de la muestra vegetal de partida (fresco o congelado con N₂) (**Tabla 2**). Para todos los métodos ensayados, el triturado del tejido se hizo en un molino (TissueLyser II, Qiagen, Valencia, CA, EEUU).

Tabla 2. Modificaciones del tratamiento del material vegetal y de los volúmenes de CTAB y de 2-mercaptoetanol para los cuatro métodos de extracción de ADN total ensayados

	muestra vegetal de partida	Volumen buffer CTAB (μ l)	Volumen 2-mercaptoetanol (μ l)
Método 1	Congelada con N ₂	400	0.4
Método 2	Congelada con N ₂	800	0.8
Método 3	Fresco	400	0.4
Método 4	Fresco	800	0.8

En el método 1, se trituró el material de partida congelado previamente en nitrógeno líquido y posteriormente, se adicionaron 400 μ l de CTAB y 0.4 μ l de 2-mercaptoetanol. En el método 2 se siguió el mismo procedimiento que en el método 1 pero duplicando los volúmenes de CTAB y de 2-mercaptoetanol. Respecto al método 3, el material de partida no se congeló previamente con nitrógeno líquido, sino que se le añadió al material fresco 200 μ l de CTAB y se trituró para después añadirle otros 200 μ l más de CTAB y 0.4 μ l de 2-mercaptoetanol. Por último, en el método 4 se realizó el mismo procedimiento que en el método 3 pero duplicando los volúmenes de CTAB y de 2-mercaptoetanol.

En cuanto a la cuantificación de ADN se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-vis (NanoDrop technologies, Wilmington, DE, EEUU), utilizando el software ND-1000 3.3.0. La calidad del ADN viene determinada por la relación entre las medidas de la absorbancia a diferentes longitudes de onda (260, 280 y 230 nm), siendo los valores de ratio adecuados los

comprendidos entre 1,7 y 1,9 para el ratio 260/280 y entre 2,0 y 2,2 para el ratio 260/230.

Obtenida la concentración de cada muestra en ng/μl, se diluyeron en agua MilliQ estéril para trabajar con una concentración de 10 ng/μl. Todo el proceso se realizó en la cabina de flujo laminar y utilizando en todo momento material esterilizado. Las diluciones se almacenaron a -20 °C para su conservación.

3.3. Marcadores moleculares, amplificaciones y electroforesis.

Para la identificación del tipo de citoplasma se utilizó el marcador MK descrito por Kim et al. (2009), que distingue los tres mitotipos en una única PCR. Por otro lado, se utilizaron un total de 5 marcadores asociados al *locus Ms*: dos marcadores co-dominantes alelo-específicos, el OPT y el PsaO (Bang et al., 2011); dos marcadores SCAR, el dominante DNF-566 y el recesivo RNS-357 (Yang et al., 2013); y el marcador jnurf05, de tipo CAPS (Park et al., 2013) (**Tabla 3**).

Las condiciones de PCR que se utilizaron para cada marcador fueron las descritas por los diferentes autores y se describen en el **Anexo II**.

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E. Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa Ultrapure™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) al 1.8% en tampón 1x TAE (0.04 M Tris-Acetato, 1 mM EDTA. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 50 ng/μl y se visualizaron mediante luz ultravioleta en un equipo GelDoc2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

Tabla 3: Marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla analizados en este trabajo

Nombre marcador	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Fragmentos esperados en función del genotipo (pb)
MK	F	CATAGGCGGGCTCACAGGAATA	833, 628
	R1	AATCCTAGTGTCCGGGGTTTCT	
	R2	CAGCGAACTTTTCATTCTTTTCGC	
OPT	F	CCTTGGAAGGCGCAACTAAAGATTTGA	659, 526
	R	TGTGGCCCAATAATACAAACAAGCAGGA	
DNF-566	FN1	TACAGATTTGTTTATCTTCTTCTTCT	566
	RN1	TTCATTTGTTAGGATGTACTCTTACC	
RNS-357	F3S2	TCAGTATCAATAGAAGGAATCAC	357
	R3S2	GTATACCATTGGTACTTGATGCA	
PSAO	F	CCTCATGCTTGCTTGGTCTT	490, 437
	R	AAGCGTGATCGATTGTAGGTCCTTT	
jnurf05	F	AACAAATCAATCGCCTGAAAA	888, 519, 378
	R	ATTATGGCCGATTTCTCAGC	

3.4. Análisis de los resultados

Para distinguir entre los cuatro métodos ensayados de extracción de ADN, se realizó un análisis de normalidad de los datos y de la varianza (ANOVA) para los datos de concentración de ADN y de ratios de absorbancia 260/280 y 260/230. La normalidad de los datos fue estudiada aplicando el Test de Shapiro-Wilk. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa informático SPSS ver.15.0 (2006).

Para el análisis de validación de los marcadores moleculares, se realizó un estudio de comparación entre los fragmentos obtenidos en cada gel y los correspondientes a los esperados para cada conjunto de marcadores de acuerdo a los fenotipos de las plantas estudiadas en cada caso. El genotipado de los individuos se realizó por el criterio de tamaño de fragmentos obtenidos y esperados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de la extracción de ADN de hoja y bulbo de cebolla.

A continuación se muestran los resultados de concentración y calidad de ADN para cada uno de los ensayos que se realizaron (**Tabla 4**).

Tabla 4: Concentraciones de ADN y ratios de absorbancia para los cuatro ensayos realizados.

Método	Repetición	Concentración (ng/ μ l)	Ratios absorbancia	
			260/280	260/230
1	1	245.52	2.36	1.79
	2	324.36	1.88	1.24
	3	458.27	2.47	1.94
2	1	183.29	2.52	1.41
	2	141.51	2.36	1.6
	3	136.09	2.18	1.47
3	1	124.31	2.14	1.84
	2	178.73	2.26	1.87
	3	150.57	1.52	1.78
4	1	256.12	1.97	2.15
	2	240.97	2.05	2.04
	3	351.69	1.95	2.24

Se realizó la prueba estadística de normalidad, aplicando el Test de Shapiro-Wilk ya que la muestra era pequeña, al conjunto de datos para cada uno de los tres factores (concentración, ratio 260/280 y ratio 260/230), verificándose la hipótesis de normalidad de la muestra. Posteriormente se realizó el ANOVA y se observaron diferencias significativas para la concentración y para los ratios 260/280 y 260/230 (**Tabla 5**; ver también **Anexo III**).

Tabla 5. Concentración y ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 (medias \pm SE, con $n=3$)^a obtenidos para los cuatro métodos ensayados.

	Concentración (ng/ μ l)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
Método 1	342.72 \pm 107.56 a	2.24 \pm 0.31 ab	1.65 \pm 0.36 bc
Método 2	153.63 \pm 25.83 b	2.35 \pm 0.17a	1.49 \pm 0.09 c
Método 3	151.20 \pm 27.21 b	1.97 \pm 0.39ab	1.83 \pm 0.05 b
Método 4	282.93 \pm 60.03 a	1.99 \pm 0.05 b	2.14 \pm 0.10 a

^a Valores seguidos por la misma letra en la misma columna no fueron significativamente diferentes ($P<0.05$).

En relación a la concentración del ADN, los valores de mayor concentración fueron los obtenidos para los métodos 1 y 4, significativamente distintos de los métodos 2 y 3. En base a estos resultados, para un aislamiento de ADN eficiente a partir de material fresco de cebolla se procedería a realizar la extracción en un volumen de 400 μ l de tampón CTAB, mientras que para tejido congelado sería preciso duplicar el volumen de tampón en el que se homogeniza el material vegetal.

Respecto a la calidad del ADN, mientras que los resultados del análisis muestran que para el ratio 260/280 sólo hay diferencias significativas entre el método 2 y el 4, para el ratio 260/230, el mejor valor fue el obtenido para el método 4, siendo, además, significativamente diferente del resto.

Por tanto se seleccionó, por concentración y calidad del ADN obtenido el método 4 para la extracción de las muestras a analizar en el presente trabajo.

El método optimizado y que finalmente se utilizó se encuentra descrito en el **Anexo I**.

4.2. Validación de marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla.

La validación de los marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla se realizó para seis marcadores, uno asociado al tipo de citoplasma (MK) y cinco (PsaO, DNF-566, RNS-357, OPT y jnurf05) al gen nuclear *Ms* responsable de la androesterilidad para el sistema CMS-S.

En la **Tabla 6** se pueden ver los resultados para todos los marcadores en el material vegetal utilizado como testigo. Para el marcador MK asociado al mitotipo, los resultados obtenidos fueron los esperados según el fenotipo de la línea en todas las muestras analizadas. Las entradas fenotipadas como androestériles (CMS), las líneas BGHZ-4552 y PF presentaron el fragmento asociado al sistema CMS-S, mientras que la línea FEE fue genotipada como correspondiente al sistema CMS-T. En esta última no se continuó el estudio de los marcadores asociados al *locus Ms* ya que éste no participa en la androesterilidad de este sistema. Las entradas BGHZ-4553 y PM, fenotipadas como mantenedora y fértil, respectivamente, presentaron ambas el mitotipo N, según lo esperado.

Respecto a los marcadores asociados al *locus Ms*, el único que identificó correctamente el genotipo de todas las líneas de acuerdo al fenotipo esperado fue el marcador CAPS jnurf05, identificando como homocigotas recesivas (*msms*) las líneas BGHZ-4452, BGHZ-4553 y PF y como homocigota dominante (*MsMs*) la línea PM (**Figura 2**). Este marcador se haya a un distancia aproximada de 0.05 cM del *locus Ms* (Park et al., 2013) y ha sido posicionado en el cromosoma 2 del mapa consenso de cebolla (McCallum et al., 2012). El marcador jnurf05 ha sido localizado en un mapa genético junto con los marcadores OPT y PsaO, y mientras que jnurf05 co-localiza con *Ms*, OPT y PsaO aparecen como marcadores flanqueantes y en sentidos opuestos, posicionándose más cerca OPT que PsaO (Park et al., 2013).

Tabla 6. Análisis de 5 marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla utilizando cinco líneas fenotipadas de *A. cepa* L.

Fenotipo	Nombre entrada	Procedencia	Marcador				
			MK	PsaO	DNF-566 / RNS-357	OPT	Jnur05
androestéril	4552	BGHZ	CMS-S	Msms (fértil)	No amplifica	MsMs (fértil)	msms (estéril)
androestéril	FEE	CITA	CMS-T	-	-	-	-
androestéril	PF	agricultor	CMS-S	msms (estéril)	MsMs(fértil)	msms (estéril)	msms (estéril)
mantenedora	4553	BGHZ	N	Msms (fértil)	No amplifica	MsMs (fértil)	msms (manten)
fértil	PM	agricultor	N	Msms (fértil)	MsMs(fértil)	msms (fértil)	MsMs (fértil)

Respecto al resto de marcadores utilizados, OPT identificó incorrectamente la línea BGHZ-4452, el estado alélico obtenido fue *MsMs* siendo el esperado *msms*, mientras que el marcador PsaO identificó incorrectamente dos (las líneas BGHZ-4452 y BGHZ-4453) de las tres líneas (**Figura 2**). La distancia mapeada para estos dos marcadores, 1.5 cM para OPT y 6.4 cM para PsaO, respecto al *locus Ms* implica la posibilidad de sobrecruzamiento (intercambio de segmentos entre los cromosomas homólogos durante la meiosis) o recombinación y como consecuencia de los mismos una incorrecta identificación del genotipo. Trabajos previos ya han indicado la dificultad de predecir el genotipo correcto para *Ms* utilizando marcadores estrechamente ligados al *locus Ms*, tanto en germoplasma de cebolla como en líneas de mejora en EEUU (Gökçe y Havey, 2002). También Bang et al. (2011) señalaron que OPT y PsaO fallan a la hora de predecir el genotipo de *Ms* en plantas procedentes de poblaciones de polinización libre.

Los marcadores DNF-566 y RNS-357, por su parte, no sólo identificaron incorrectamente la línea PF, sino que no amplificaron ningún fragmento para las líneas BGHZ-4452 y BGHZ-4453. La ausencia de amplificación puede ser debida a diferencias en la secuencia genómica de anillamiento de los cebadores. Estos marcadores fueron presentados como universales y adecuados para su uso tanto en híbridos F1 como en poblaciones de polinización libre, de diferentes orígenes y con diferentes fotoperíodos (día largo / día corto) (Yang et al., 2013). Sin embargo, los resultados que se han obtenido en este trabajo no coinciden con estos resultados.

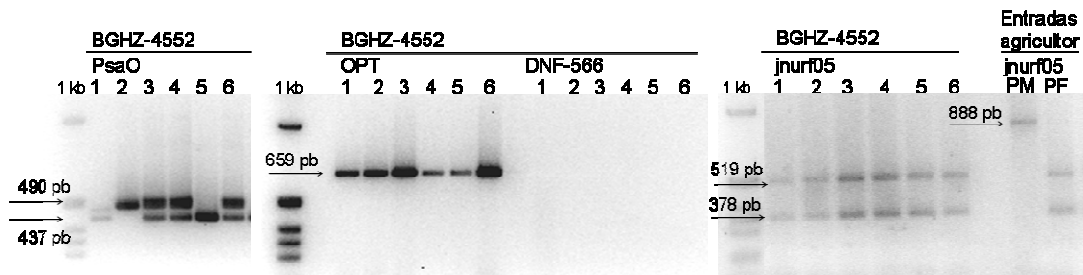


Figura 2. Electroforesis de los fragmentos amplificados con los marcadores PsaO, OPT, DNF-566 y jnurf05 a partir de ADN de 6 plantas de la línea androestéril BGHZ-4552. También se observa la amplificación con jnurf05 de las entradas PM (fértil) y PF (androestéril).

A la vista de estos resultados, se escogieron, para el genotipado de las poblaciones y variedades de cebolla en estudio, los marcadores jnurf05 y OPT. El marcador jnurf05 se eligió por su correcta predicción de los genotipos utilizados como control en este trabajo y porque hasta el momento es el marcador que más cerca ha sido localizado del *locus Ms* en el mapa genético. El marcador OPT, se ha seguido utilizando en los análisis posteriores porque resultó uno de los más adecuados junto a jnurf05, presentando la ventaja de que no requiere una digestión posterior a la PCR, resultando más rápido y económico. Por ello, se quiso estudiar la viabilidad y comportamiento de ambos marcadores en las dos familias y en las variedades locales utilizadas en este trabajo.

4.3. Identificación de líneas androestériles y mantenedoras en las poblaciones Fuentes 1 y Fuentes 2

Para la identificación de líneas androestériles y mantenedoras en estas dos poblaciones se utilizaron el marcador MK, para identificar el mitotipo y los marcadores, OPT y jnurf05, para determinar los alelos del gen nuclear *Ms*.

Los resultados obtenidos con el marcador MK, mostraron que todos los individuos de la familia Fuentes 1 poseen un mitotipo CMS-T, lo que indica que estos individuos pueden ser fértiles o androestériles en función de su dotación nuclear, pero el sistema de androesterilidad que presentarían no resulta de interés a la hora de producir híbridos F1, dada su complejidad. Por tanto, en

esta familia, no se continuó el genotipado del *locus Ms*, ya que este *locus* no interviene ni en la restauración ni en el sistema de androesterilidad.

En cuanto a la familia Fuentes 2, las amplificaciones con MK resolvieron citoplasma N para los 81 individuos, por lo que todo el polen que se produzcan estos individuos será viable. Resulta de interés conocer sus genotipos respecto al *locus Ms* ya que podemos encontrar líneas mantenedoras, *Nmsms*. Estas líneas junto con las androestériles, son esenciales en un programa de mejora de obtención de híbridos F1 utilizando el sistema CMS-S (Havey, 2000).

En la **Figura 3** se presenta un ejemplo de los fragmentos amplificados con el marcador MK, para 6 individuos de la familia Fuentes 1 y otros 6 de la familia Fuentes 2. Se puede observar como en los individuos Fuentes 1 (**Figura 3a**) se han amplificado dos fragmentos de 833 y 628 pb desde el gen *coxI* y la secuencia *orf725*, respectivamente. Por el contrario, en los individuos Fuentes 2 (**Figura 3b**) sólo el fragmento de *coxI* es amplificado (Kim et al., 2009).

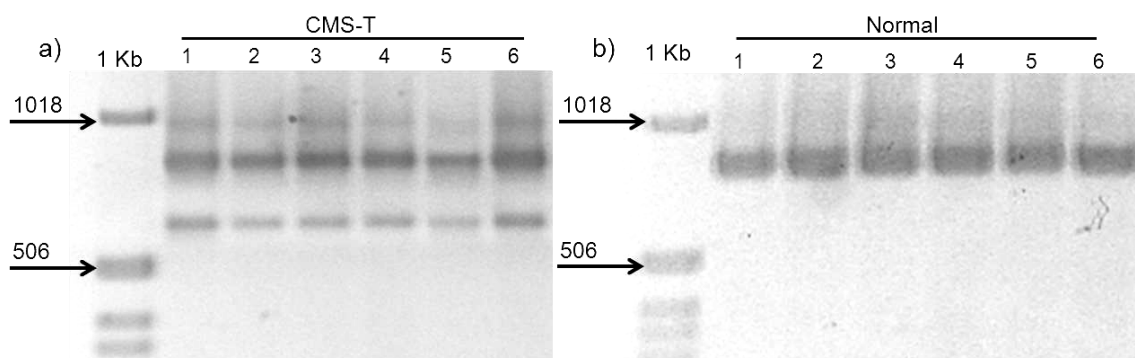


Figura 3: Ejemplo de los productos de amplificación obtenidos para algunos individuos de las familias Fuentes 1 y Fuentes 2 utilizando el marcador MK. a) Individuos de la familia Fuentes 1, los fragmentos amplificados de 833 y 628 pb, correspondieron a un genotipo CMS-T. b) Individuos de la familia Fuentes 2, el fragmento amplificado fue de 628 pb, lo que indicó citoplasma N.

En relación a los marcadores *jnurf05* y *OPT*, los resultados para Fuentes 2 muestran que con el marcador *jnurf05* el 6,2% de los individuos fueron *MsMs*, el 8,6% fueron *Msms* y el 85,2% fueron *msms* (**Tabla 5**). Estos resultados distan mucho de los obtenidos con el marcador *OPT*, ya que para el homocigoto dominante *MsMs* se ha obtenido un 70,4%, para el heterocigoto *Msms* un 19,7% y por último, para el homocigoto recesivo *msms*, un 9,9% (**Anexo IV**). Estos resultados re-confirman que el marcador *OPT* falla al

predecir el genotipo de *Ms* y que sólo resulta útil en determinadas poblaciones segregantes en las que son conocidas el estado alélico de la líneas parentales y la relación de los padres con el marcador OPT (Bang et al., 2009).

Así pues, y sólo teniendo en cuenta conjuntamente los resultados de los marcadores jnurf05 y MK, el porcentaje de líneas mantenedoras (*Nmsms*) sería del 85.2% en la familia Fuentes 2. Este valor es elevado, pero hay que tener en cuenta que no se trata de una población de polinización libre, sino de una población seleccionada (familia de medios hermanos) y que ha sido sometida a condiciones controladas de aislamiento, donde el grado de polinización cruzada puede disminuir hasta sólo el 23-56% (Brewster, 1994).

Para confirmar estos resultados, en trabajos futuros se realizará el fenotipado de este material, llevando a campo estas plantas y comprobando la viabilidad del polen, así como realizando los correspondientes estudios de progenie.

Tabla 7: Resultados de la amplificación con los marcadores MK, OPT y jnurf05 los individuos de las familias Fuentes 1 y Fuentes 2 (*A. cepa L.*). En las celdas se indica el nº de individuos que han presentado el mitotipo y el estado alélico genotipado por el marcador.

	Fuentes 1				Fuentes 2			
	Ligados al citoplasma							
	N	CMS-S	CMS-T	Total individuos	N	CMS-S	CMS-T	Total individuos
MK	nd ^a	nd	161	161	81	Nd	nd	81
	Ligados al <i>locus Ms</i>							
	<i>MsMs</i>	<i>Msms</i>	<i>msms</i>	Total individuos	<i>MsMs</i>	<i>Msms</i>	<i>msms</i>	Total individuos
OPT	-	-	-	-	57	16	8	81
Jnurf05	-	-	-	-	5	7	69	81

^and: no detectado

4.4. Genotipado para androesterilidad de variedades de cebolla españolas conservadas en el BGHZ

Se ha analizado el mitotipo y estado alélico del *locus Ms* en 20 variedades de cebolla españolas. Respecto al mitotipo, la amplificación con el

marcador MK a partir de los ADNs totales extraídos de los bulbos liofilizados ha mostrado que 8 de las 20 entradas (nº 1, 5, 6, 10, 14, 18, 19 y 20) presentaron el citoplasma de tipo N, 7 entradas (nº 2, 3, 8, 12, 13, 15 y 17) presentaron el sistema CMS-T y 5 (nº 4, 7, 9, 11 y 16) presentaron el mitotipo con el sistema CMS-S (**Figura 4 y Tabla 8**).

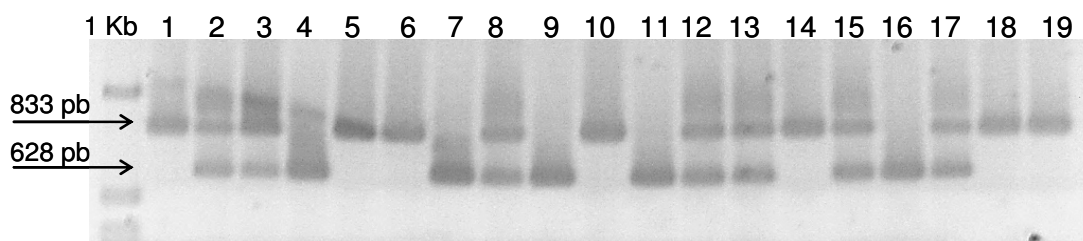


Figura 4: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos para las variedades españolas de cebolla utilizando el marcador citoplasmático MK.

Las entradas que presentaron citoplasmas N o CMS-S fueron analizadas con los marcadores OPT y jnurf05.

Al igual que sucedió con la familia Fuentes 2, los resultados obtenidos con los dos marcadores fueron diferentes. Mientras jnurf05 identificó 10 entradas como homocigotas recesivas (nº 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 18 y 20), una como heterocigota (nº 9) y 2 entradas como homocigotos dominantes (nº 16 y 19), OPT presentó 4 entradas homocigotas recesivas (nº 5, 10, 18 y 20), dos como heterocigotas (nº 7 y 14) y 7 entradas como homocigotas dominantes (nº 1, 4, 6, 9, 11, 16 y 19) (**Tabla 8**). De estos resultados se pueden concluir que el marcador OPT difiere en la predicción de los genotipos y no es adecuado para posteriores análisis de este tipo de material.

Teniendo en cuenta conjuntamente los resultados de los marcadores jnurf05 y MK, el 15% de las variedades estudiadas fueron identificadas como androestériles (*Smsms*), 35% como mantenedoras (*Nsmsms*) y el 15% como fértiles. El porcentaje restante (35%), se corresponden con las plantas que han mostrado el sistema CMS-T. Estos resultados muestran la existencia de variabilidad para el carácter androesterilidad en las variedades locales de cebolla conservadas en el BGHZ lo que aporta un mayor interés al potencial

aprovechamiento de este material vegetal para la mejora genética de este cultivo.

Este es el primer trabajo que ha genotipado y estudiado el mitotipo para el carácter 'androesterilidad' en variedades locales pertenecientes a una colección de germoplasma.

Para clarificar la divergencia entre los resultados obtenidos con los dos marcadores utilizados, se debería de confirmar cada uno de los genotipos obtenidos con su fenotipo, comprobándose mediante tinción con FDA la viabilidad del polen, y realizando los correspondientes estudios de progenie.

Tabla 8. Mitotipo de 20 variedades de cebolla, analizado con el marcador MK, y genotipado del *locus MS* con los marcadores jnur05 y OPT.

Variedad	MK	jnurf05	OPT
1	Normal	msms	MsMs
2	CMS-T	-	-
3	CMS-T	-	-
4	CMS-S	msms	MsMs
5	Normal	msms	msms
6	Normal	msms	MsMs
7	CMS-S	msms	Msms
8	CMS-T	-	-
9	CMS-S	Msms	MsMs
10	Normal	msms	msms
11	CMS-S	msms	MsMs
12	CMS-T	-	-
13	CMS-T	-	-
14	Normal	msms	Msms
15	CMS-T	-	-
16	CMS-S	MsMs	MsMs
17	CMS-T	-	-
18	Normal	msms	msms
19	Normal	MsMs	MsMs
20	Normal	msms	msms

5. CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un método de extracción de ADN total de cebolla a partir de hoja o bulbo liofilizado molido.
2. Se ha analizado la aplicabilidad de seis marcadores moleculares (MK, PsaO, DNF-566, RNF-357, OPT y jnurf05) para identificar líneas androestériles y mantenedoras en material vegetal de origen español de cebolla, concluyéndose que el uso conjunto de los marcadores MK y jnurf05 permite identificar correctamente las entradas utilizadas como controles en este trabajo.
3. La familia Fuentes 1 de la variedad Fuentes de Ebro seleccionada en el CITA fue caracterizada como tipo de citoplasma CMS-T, y por tanto las líneas androestériles que puedan aparecer en esta familia no resultan de interés para la obtención de híbridos, dada la complejidad del control genético de este carácter.
4. En la familia Fuentes 2, no se encontraron líneas androestériles, ya que todas las plantas mostraron mitotipo N. Sin embargo, se identificaron 65 posibles líneas mantenedoras, utilizando conjuntamente los marcadores MK y jnurf05.
5. Se ha detectado variabilidad genética para el carácter androesterilidad, tanto para el mitotipo (N, CMS-T y CMS-S) como para el *locus Ms* en las 20 variedades de cebollas españolas utilizadas en este trabajo.
6. Los resultados del genotipado para el gen *Ms* variaron según el marcador empleado, tanto en las familias de cebolla Fuentes de Ebro como en las veinte variedades del BGHZ. Para dilucidar estas discrepancias entre el marcador OPT y el jnurf05, es necesario continuar el estudio de este carácter mediante fenotipado.

6. REFERENCIAS

- A.P.G. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141: 399-436.
- ÁLVAREZ, JM, MARÍN, ML. 1983. Un banco de germoplasma para especies hortícolas. En: Los recursos fitogenéticos y las nuevas variedades vegetales: su impacto en el sector agrario. ITEA, volumen Extra, número 2: 25-37.
- ANDRÉS-GARCÍA B, GARCÉS-CLAVER A, COLLADO-FERNÁNDEZ M, MALLOR C. 2013. 'Variabilidad de compuestos relacionados con el sabor y aroma en cebollas autóctonas españolas' VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos "CYTA 2013". Córdoba.
- BANG H., CHO D.Y., YOO K., YOON M., PATIL B.S., KIM S. 2011. Development of simple PCR-based markers linked to the *Ms locus*, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica 179: 439-449.
- BENTOLILA S., ALFONSO A.A., HANSON M.R. 2002. A pentatricopeptide repeat containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 10887-10892.
- BERNINGER E. 1965. Contribution à l'étude de la sterilité mâle de l'oignon (*Allium cepa* L.). Ann. Amélior. Plant. 15: 183-199.
- BREWSTER J.L. 1994. Onions and other vegetable *Alliums*. CAB International, Wallingford, UK. 236 pp.
- BROWN G.G., FORMANOVA N., JIN H., WARGACHUK R., DENDY C., PATIL P., LAFOREST M., ZHANG J., CHEUNG W.Y., LANDRY B.S. 2003. The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. Plant J. 35: 262-272.
- CARRAVEDO M., MALLOR C. 2007. Variedades autóctonas de cebollas españolas conservadas en el Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas de Zaragoza. Gobierno de Aragón, Zaragoza, España, 382 pp.
- CASTILLO AM, FAYOS O, VALLÉS MP, GARCÉS A, MALLOR C. 2013. 'Obtención de doblehaploides de variedades de cebolla españolas mediante cultivo de ovarios' X Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales (SECIVTV). Zaragoza.

- DOYLE J.J., DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- ENGELKE T., AGBICODO E., TATLIOGLU T. 2004. Mitochondrial genome variation in *Allium ampeloprasum* and its wild relatives. *Euphytica* .137: 181-191.
- ENGELKE T., TEREFE D., TATLIOGLU T. 2003. A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 162–167.
- FAOSTAT. 2013. Anuario estadístico de la FAO 2013 [En línea] <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>> [Consulta: 15 de Noviembre de 2013].
- FRIESEN N., FRITSCH R., BLATTNER F.R., 2006. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* L. (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* 22: 372-395.
- FRITSCH R.M., FRIESEN N. 2002. Evolution, Domestication and Taxonomy. *Allium Crop Science: Recent Advances*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 5-30.
- GARCÉS-CLAVER A, FAYOS O, MALLOR C, SAVIRÓN M, ORDUNA J. 2013. ‘Capsinoides y Sulfóxidos de cisteína: compuestos nutraceuticos’ I Feria de la Seguridad Alimentaria. Zaragoza.
- GARCÉS-CLAVER A., MOORE FELLMAN S., GIL ORTEGA R., JAHN M., ARNEDO-ANDRES M.S. 2007. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theor. Appl. Genet.* 115: 907–916.
- GOBIERNO DE ARAGÓN. 2013. [En línea] <http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/AreasTematicas/CalidadAgroalimentaria/ci.01_Denominaciones_origen.detalleDepartamento?channelSelected=03bbc8548b73a210VgnVCM100000450a15acRCRD> [Consulta: 20 de Diciembre de 2013].
- GÖKÇE A.F., HAVEY M.J. 2002. Linkage equilibrium among tightly linked RFLPs and the *Ms locus* in open-pollinated onion populations. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127: 944–946.
- HANSON M.R. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Ann. Rev. of Genet.* 25: 461-486.

- HAVEY M.J. 1993. A putative donor of S-cytoplasm and its distribution among open-pollinated populations of onion. *Theor. Appl. Genet.* 86: 128-134.
- HAVEY M.J. 1995. Identification of cytoplasms using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theor. Appl. Genet.* 90: 263-268.
- HAVEY M.J. 2000. Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasms of onion. *Theor. Appl. Genet.* 101: 778-782.
- HAVEY M.J. 2013. Single nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with the male-fertility restoration (*Ms*) locus of onion. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 138: 306–309.
- JONES H.A., CLARKE A. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 43: 189-194.
- JONES H.A., EMSWELLER S.L. 1936. A male-sterile onion. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 34: 582-585.
- JOSHI S.P., RANJEKAR P.K., VIDYA S.G. 1999. Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science* 77: 230–240.
- KIK C. 2002. Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. *Allium crop science: Recent advances* 81-100.
- KIM S., LEE E., CHO D.Y., HAN T., BANG H., PATIL B.S., AHN Y.K., YOON M. 2009. Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). *Theor Appl Genet* 118: 433-441.
- KLEIN R.R., KLEIN P.E., MULLET J.E., MINX P., ROONEY W.L., SCHERTZ K.F. 2005. Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Shorgum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12. *Theor Appl Genet* 111: 994-1012.
- KOMORI T., OHTA S., MURAI N., TAKAKURA Y., KURAYA Y., SUZUKI S., HIEI Y., IMASEKI H., NITTA N. 2004. Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J.* 37: 315-325.
- LASER K.D., LERSTEN N.R. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.* 38: 425-454.
- MAGRAMA. 2013. Madrid. Observatorio de tecnologías probadas. Material vegetal.

- MALLOR C, ARNEDO-ANDRÉS MS, GARCÉS-CLAVER A. 2014. Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, 170: 24–31.
- MALLOR C, CARRAVEDO M, ESTOPAÑÁN G, MALLOR F. 2011. Characterization of genetic resources of onion (*Allium cepa* L.) from the Spanish secondary centre of diversity. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9 (1): 144-155.
- MALLOR C., BALCELLS M., MALLOR F., SALES E. 2010. Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. *Plant Breed.* 130: 55-59.
- MALLOR C., LLAMAZARES A., GUTIERREZ M., BRUNA P., MALLOR F., ARNEDO-ANDRES M.S., ALVAREZ J.M. 2007. Evaluación morfológica, de pungencia y contenido en sólidos solubles de la cebolla 'Fuentes de Ebro'. *ITEA* 103: 212-223.
- MALLOR C., SALES E. 2012. Yield and traits of bulb quality in the Spanish sweet onion cultivar 'Fuentes de Ebro' after selection for low pungency. *Sci. Hort.* 140: 60-65
- MAROTO J.V. 1995. *Horticultura herbácea especial*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 702pp.
- McCALLUM J., BALDWIN S., SHIGYO M., DENG Y., VAN HEUSDEN S., PITHER-JOYCE M., KENEL F. 2012. Allium Map—a comparative genomics resource for cultivated *Allium* vegetables. *BMC Genomics* 13: 168.
- McCALLUM J., PITHER-JOYCE M., SHAW M., KENEL F., DAVIS S., BUTLER R., SCHEFFER J., JAKSE J., HAVEY M.J. 2007. Genetic mapping of sulfur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency. *Theor. Appl. Genet.* 114: 815-822.
- PARK J., BANG H., CHO D.Y., YOON M.K., PATIL B.S., KIM S. 2013. Construction of high-resolution linkage map of the *Ms locus*, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 192: 267-278.
- PIKE L.M. 1986. Onion breeding. In: *Breeding Vegetable Crops*. (Bassett, M.J., Ed.). AVI Publishing Co., Westport, CT, USA: 161-176.
- SATO Y. 1998. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96: 367–370.

- SCHWEISGUTH B. 1973. Étude d'un nouveau type de stérilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L. Ann. Amélior. Plant 23: 221–233.
- SORIA H. 1997. Cebollas: bajo el signo de la estabilidad. Vida rural nº 49: 60-61.
- SYNNEVAG G. 1988. Genetic contributions from the multiplier onion to the breeding of the common onion. Proceedings of the 4th Eucarpia Allium Symposium. Institute of Horticultural Research, Wellesbourne, UK.133-138.
- VAVILOV N.I. 1926. Center of origins of cultivated plants. Trudy Prikl. Bot Gen 16: 139-248.
- VON KOHN C., KIELKOWSKA A., HAVEY M.J. 2013. Sequencing and annotation of the chloroplast DNAs and identification of polymorphisms distinguishing normal male-fertile and male-sterile cytoplasms of onion. Genome 56: 737-742.

ANEXO I: Protocolo de extracción de ADN optimizado.

- Pesar aproximadamente 50 mg de hojas e introducirlo en un tubo eppendorf de 2 ml junto con dos bolitas de tungsteno.
- Añadir 400 µl de CTAB y triturar mediante un molino (*TissueLyser*).
- Una vez triturado el material vegetal, añadir 400 µl de CTAB y 0.8 µl de 2-mercaptoetanol. Mezclar suavemente por inversión.
- Incubar en baño a 65°C durante 25 min, mezclando habitualmente por inversión.
- Añadir 450 µl de Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), mezclando por inversión hasta conseguir una mezcla homogénea.
- Centrifugar a 10000 g durante 15 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir lentamente 300 µl de isopropanol mezclando suavemente hasta la precipitación del ADN. Mantener, al menos, 30 min en el congelador.
- Centrifugar a 13000 g durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y añadir 800 µl de tampón de lavado. Lavar durante 20 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13000 g durante 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y dejar el precipitado secar durante varias horas a temperatura ambiente.
- Resuspender el precipitado en 200 µl de MTE durante varias horas en el frigorífico.

Soluciones empleadas:

Tampón de extracción (CTAB): 100 mM Tris HCl a pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP, 0.1% bisulfito sódico.

Tampón de lavado: 10 mM acetato de amonio en etanol al 76%.

Tampón de disolución (MTE): 10 mM Tris HCl a pH 8.0, 0.1 mM EDTA.

ANEXO II: Condiciones y reacciones de PCR para los distintos marcadores utilizados

1.1. Condiciones y reacción para conjunto de cebadores MK

°C	Tiempo	Ciclos	Reactivos	Volumen (μl)
94	5 min	1	H ₂ O MilliQ	5.4
94	30 s	40	Buffer 10x	1
60	30 s		MgCl ₂ (50 mM)	0.3
72	90 s		dNTPs (2.5 mM)	0.8
72	10 min	1	Cebador MK-F (10 μM)	0.2
10	∞		Cebador MK-R1 (10 μM)	0.2
			Cebador MK-R2 (10 μM)	0.2
			Taq. Polimerasa (5 u)	0.1
			ADN (10 μM)	2.5
				Volumen final = 10 μl

1.2. Condiciones y reacción para el par de cebadores OPT

°C	Tiempo	Ciclos	Reactivos	Volumen (μl)
95	5 min	1	H ₂ O MilliQ	5.5
94	30 s	40	Buffer 10x	1
68	60 s		MgCl ₂ (50 mM)	0.3
72	60 s		dNTPs (2.5 mM)	0.8
72	10 min	1	Cebador OPT-F (10 μM)	0.2
10	∞		Cebador OPT-R (10 μM)	0.2
			Taq. Polimerasa (5 u)	0.1
			ADN (10 μM)	2.5
				Volumen final = 10 μl

1.3. Condiciones y reacción para par de cebadores jnurf05

°C	Tiempo	Ciclos	Reactivos	Volumen (µl)
95	5 min	1	H ₂ O MilliQ	5.5
95	30 s	10	Buffer 10x	1
65*	30 s		MgCl ₂ (50 mM)	0.3
72	2 min		dNTPs (2.5 mM)	0.8
95	30 s	30	Cebador Jnurf05-F (10 µM)	0.2
57	30 s		Cebador Jnurf05-R (10 µM)	0.2
72	2 min		Taq. Polimerasa (5 u)	0.1
72	7 min	1	ADN (10 µM)	2.5
10	∞		Volumen final = 10 µl	

*Cada ciclo -0.8°C

1.4. Condiciones y reacción para el par de cebadores PSAO

°C	Tiempo	Ciclos	Reactivos	Volumen (µl)
95	5 min	1	H ₂ O MilliQ	5.5
95	30 s	10	Buffer 10x	1
65*	30 s		MgCl ₂ (50 mM)	0.3
72	2 min		dNTPs (2,5 mM)	0.8
95	30 s	30	Cebador PSAO-F (10 µM)	0.2
57	30 s		Cebador PSAO-R (10 µM)	0.2
72	2 min		Taq. Polimerasa (5 u)	0.1
72	10 min		ADN (10 µM)	2.5
10	∞		Volumen final = 10 µl	

*Cada ciclo -0.8°C

1.5. Condiciones y reacción para el par de cebadores DNF-566

°C	Tiempo	Ciclos	Reactivos	Volumen (μl)
95	6 min	1	H ₂ O MilliQ	12.4
95	30 s	35	Buffer 10x	2.5
58	45 s		MgCl ₂ (50 mM)	0.8
72	45 s		dNTPs (2,5 mM)	2
72	7 min	1	Cebador FN1 (10 μM)	1
10	∞		Cebador RN1 (10 μM)	1
			Taq. Polimerasa (5 u)	0.3
			ADN (10 μM)	5

Volumen final = 25 μl

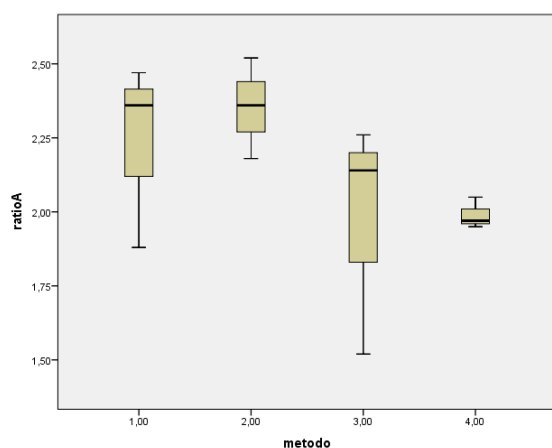
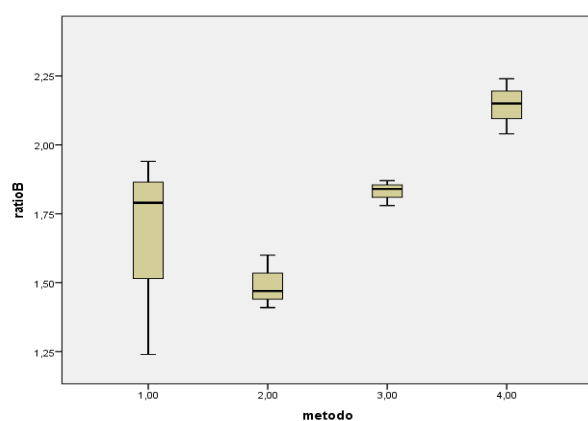
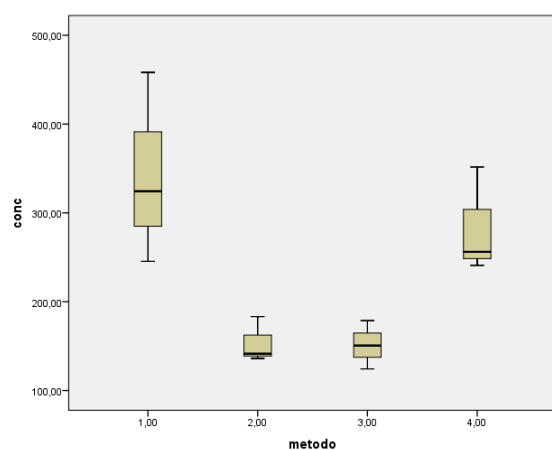
1.6. Condiciones y reacción para el par de cebadores RNS-357

°C	Tiempo	Ciclos	Reactivos	Volumen (μl)
95	6 min	1	H ₂ O MilliQ	12.4
95	30 s	35	Buffer 10x	2.5
58	45 s		MgCl ₂ (50 mM)	0.8
72	45 s		dNTPs (2,5 mM)	2
72	7 min	1	Cebador F3S2 (10 μM)	1
10	∞		Cebador R3S2 (10 μM)	1
			Taq. Polimerasa (5 u)	0.3
			ADN (10 μM)	5

Volumen final = 25 μl

ANEXO III: Comparación de medias obtenidas de valores de concentración de ADN y de los ratios 260/280 y 260/230 en los 4 ensayos realizados.

Gráficos de diagrama de cajas para los datos de concentración de ADN, ratio 260/280 (ratio A) y ratio 260/230 (ratio B) obtenidos en los cuatro métodos de extracción.



ANEXO IV: Resultados MK, OPT y Jnurf05 para Familia Fuentes 2

Individuo	jnurf05	OPT	MK	Individuo	jnurf05	OPT	MK
1	msms	MsMs	Normal	44	msms	MsMs	Normal
2	msms	MsMs	Normal	45	msms	Msms	Normal
3	msms	msms	Normal	46	MsMs	MsMs	Normal
4	msms	msms	Normal	47	msms	MsMs	Normal
5	msms	MsMs	Normal	48	MsMs	Msms	Normal
6	Msms	MsMs	Normal	49	msms	MsMs	Normal
7	msms	MsMs	Normal	50	msms	MsMs	Normal
8	msms	MsMs	Normal	51	msms	MsMs	Normal
9	msms	MsMs	Normal	52	msms	MsMs	Normal
10	msms	MsMs	Normal	53	msms	MsMs	Normal
11	msms	msms	Normal	54	msms	MsMs	Normal
12	msms	MsMs	Normal	55	msms	MsMs	Normal
13	msms	MsMs	Normal	56	Msms	MsMs	Normal
14	msms	MsMs	Normal	57	msms	MsMs	Normal
15	msms	MsMs	Normal	58	msms	Msms	Normal
16	msms	MsMs	Normal	59	MsMs	Msms	Normal
17	Msms	MsMs	Normal	60	msms	MsMs	Normal
18	Msms	MsMs	Normal	61	msms	MsMs	Normal
19	msms	MsMs	Normal	62	msms	MsMs	Normal
20	Msms	MsMs	Normal	63	MsMs	MsMs	Normal
21	msms	msms	Normal	64	msms	MsMs	Normal
22	msms	MsMs	Normal	65	msms	msms	Normal
23	msms	msms	Normal	66	msms	MsMs	Normal
24	msms	msms	Normal	67	msms	MsMs	Normal
25	msms	MsMs	Normal	68	msms	Msms	Normal
26	msms	Msms	Normal	69	msms	msms	Normal
27	MsMs	MsMs	Normal	70	msms	MsMs	Normal
28	msms	Msms	Normal	71	msms	MsMs	Normal
29	msms	Msms	Normal	72	msms	MsMs	Normal
30	msms	Msms	Normal	73	msms	MsMs	Normal
31	msms	Msms	Normal	74	msms	MsMs	Normal
32	msms	MsMs	Normal	75	msms	MsMs	Normal
33	msms	MsMs	Normal	76	msms	MsMs	Normal
34	msms	MsMs	Normal	77	msms	Msms	Normal
35	msms	MsMs	Normal	78	msms	MsMs	Normal
36	msms	Msms	Normal	79	msms	Msms	Normal
37	msms	MsMs	Normal	80	Msms	MsMs	Normal
38	msms	MsMs	Normal	81	msms	Msms	Normal
39	msms	MsMs	Normal				
40	msms	MsMs	Normal				
41	Msms	MsMs	Normal				
42	msms	Msms	Normal				
43	msms	Msms	Normal				