

LA ANDROESTERILIDAD EN CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.)

La cebolla es un cultivo muy extendido a nivel mundial, debido a que existe una amplia gama de cultivares adaptados a las diferentes condiciones ambientales que influyen en su desarrollo. 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. 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, que termina en una inflorescencia en umbela con un número variable de flores (de 50 a 2.000).

CRISTINA MALLOR GIMÉNEZ Y ANA GARCÉS-CLAVER
(DRAS. EN INGENIERÍA AGRÓNOMA E INVESTIGADORAS DEL CENTRO DE
INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN-CITA)

La cebolla es una especie alógama, es decir, produce flores fértiles y se reproduce mediante polinización cruzada. Aunque este comportamiento es el predominante, no es sin embargo exclusivo, ya que las plantas son perfectamente capaces de autopolinizarse. Las anteras de las flores individuales maduran y liberan el polen de 24 a 36 horas antes de la receptividad del estigma, lo que se denomina protandria o proterandria. Sin embargo, como la apertura de las diferentes flores se puede prolongar desde dos semanas hasta cuatro, es factible que el polen fecunde el estigma receptivo de una flor más desarrollada de la misma umbela o de las otras umbelas del mismo bulbo. Por lo tanto, la protandria supone sólo una barrera parcial frente a la autopolinización.

Híbridos en cebolla

Los cruzamientos entre poblaciones de cebolla ampliamente divergentes producen híbridos cuyo vigor excede el de los progenitores. Este efecto se denomina 'vigor híbrido' o 'heterosis'. Esto es debido a que en los híbridos, la influencia de cualquier alelo homocigoto recesivo desfavorable de las líneas parentales puede estar enmascarado por alelos dominantes favorables del otro progenitor. Fijar genotipos que presenten este vigor híbrido en los cultivares híbridos F1 se

ha convertido en la tendencia principal de la mejora de cebolla en los últimos años. Desde el punto de vista comercial, una ventaja adicional de los híbridos radica en el control que se ejerce por parte del mejorador o de la compañía de semillas, ya que éstos deben producirse necesariamente a partir de las líneas parentales.

La androesterilidad, es la incapacidad de producir polen fértil y se considera una herramienta muy útil para la obtención de híbridos en cebolla. En ausencia de androesterilidad, la polinización cruzada controlada sin autopolinización se consigue sólo eliminando trabajosamente a mano las anteras en maduración de una umbela antes de que desprendan el polen y transfiriendo manualmente el polen deseado a los estigmas. Este procedimiento es demasiado laborioso para todo lo que no sean unos pocos cruces controlados en un trabajo experimental o de mejora.

Jones y Clarke en 1925 fueron los primeros en aprovechar la androesterilidad de la cebolla utilizando un genotipo androestéril del cv. Italian Red que encontraron en unos campos experimentales en Davis (California). Jones y Clarke (1943) describieron como utilizar el sistema de androesterilidad citoplasmática en cebolla para producir semilla híbrida a gran escala. Desde entonces, la obtención de variedades híbridas F1 ha sido una de las técnicas utilizadas para la mejora en este cultivo. Los híbridos fueron rápidamente adoptados por los agricultores, debido al incremento

significativo en la producción comercial así como una mayor uniformidad para caracteres de interés agrícola en comparación con las variedades de polinización abierta (Dowker y Gordon, 1983; Evoor et al., 2007; Hosfield et al., 1977; Joshi y Tandon, 1976). Sin embargo, no siempre se manifiestan estas ventajas y hay trabajos que muestran un comportamiento similar entre variedades híbridas y poblaciones de polinización abierta (Cramer, 2001).

En España, la producción de cebolla se ha basado tradicionalmente en los tipos Babosa, Liria y Grano de Oro o Recas, todos ellos de polinización abierta. Sin embargo, en las últimas décadas, se inició la introducción de cultivares híbridos, basados en un principio en variedades obtenidas en otros países como Estados Unidos, Holanda y Japón, incrementando de esta forma la oferta de variedades en el mercado. En los últimos años, las casas comerciales de semillas están desarrollando cultivares adaptados a las latitudes y condiciones de España, y actualmente en los catálogos comerciales de semillas se puede encontrar una variada oferta de variedades híbridas de cebolla.

Androesterilidad en cebolla

Los factores inductores de la androesterilidad en cebolla, o esterilidad citoplasmática masculina (CMS), se encuentran en el genoma mitocondrial, por lo que se trata de un carácter que se transmite sólo de las madres a la descendencia. La CMS puede ser restaurada por la acción de genes nucleares 'restauradores de la fertilidad' (Rf).

En las plantas androestériles, el polen no se desarrolla y por ello son incapaces de autofecundarse. Así, cualquier semilla que se produzca en estas plantas deberá ser necesariamente el resultado de una polinización cruzada. Las flores de plantas androestériles son al principio de apariencia similar a las flores fértiles, pero en ellas no tiene lugar la microsporogénesis y no se desarrollan los granos de polen. De esta manera, en vez de producirse una antesis normal, las anteras se marchitan, adoptando una coloración parda y una forma arrugada. De forma gradual, todas las anteras que aparecen de color amarillo-verdoso también se van marchitando (Figura 1).

En cebolla existen dos tipos de 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 dominante, denominado Ms, para CMS-T pueden estar interviniendo al menos tres genes, un gen independiente y dos complementarios (Jones y Clarke, 1943; Schweisguth, 1973). El sistema CMS-S es el preferido por los mejoradores y empresas de semillas, ya que la herencia de un único



Figura 1. Umbela con flores fértiles y umbela con flores androestériles.

locus es más sencilla y estable en diferentes condiciones climáticas (Havey, 2000).

Según el tipo de citoplasma (mitotipo), podemos encontrarlos con 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 (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 (N msms): 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 éstas producirán descendencias cuyo genotipo será CMS-S msms. Las plantas con esta constitución se dan con una frecuencia del 5% en la mayoría de las poblaciones (Pike, 1986).

Sembradoras remolcadas y autopropulsadas para grandes profesionales



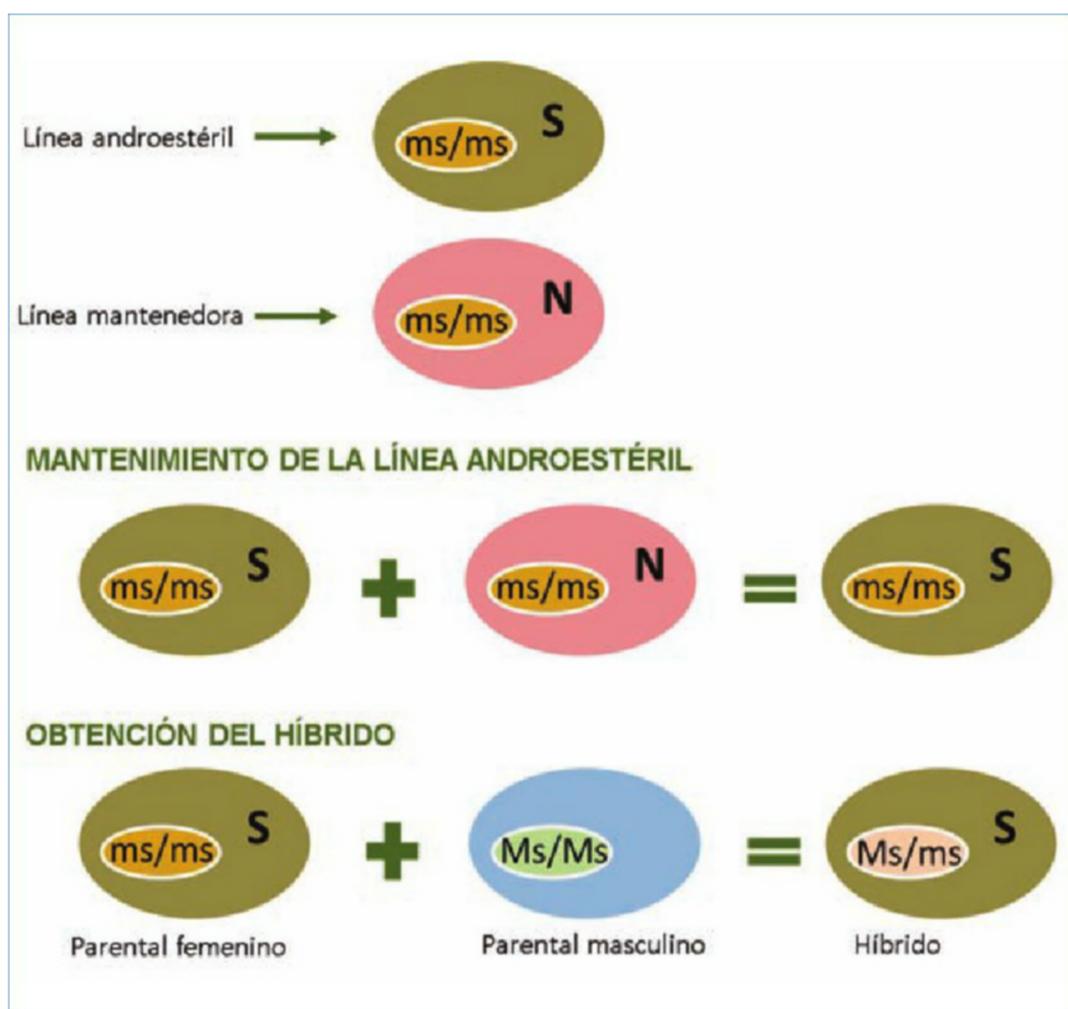
Tel : +33 5 46 35 28 28 E-mail : terrandonis@ics-agri.com
www.terrandonis.com

Producción de híbridos utilizando la androesterilidad

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 que actuará como parental femenino deberá tener la constitución genética 'CMS-Smsms', con esto, se asegura que no se produzca la autofecundación. Estas líneas maternas se mantienen al cruzarlas con líneas mantenedoras. En cuanto a la línea que actuará como parental masculino, puede tener una constitución de citoplasma normal (N) con cualquier combinación (MsMs, Msms o msms) o con un citoplasma S y una combinación Msms o MsMs. Una representación esquemática de los genotipos asociados a la androesterilidad para la producción de híbridos se muestra en la Figura 2.

Para la producción de las semillas híbridas es importante que las líneas fértiles y androestériles florezcan simultáneamente, de modo que exista una cantidad suficiente de polen del parental masculino fértil mientras que los estigmas de las plantas del parental femenino androestéril estén receptivos. Sin embargo, esto no siempre sucede, y las diferentes líneas de un híbrido pueden no florecer a la vez cuando se tratan de idéntica forma. Algunas estrategias para superar este problema incluyen el almacenamiento de los bulbos a distintas temperaturas antes de la plantación o el escalonamiento en las fechas de plantación de las dos líneas. Una vez que se han producido los cruzamientos, las semillas híbridas F1 se recolectan en las plantas del parental femenino.

Figura 2. Esquema de los genotipos asociados a la androesterilidad para la producción de híbridos.



Marcadores moleculares asociados a la androesterilidad

La identificación de los tipos de citoplasma (N, CMS-S o CMS-T) y de los genes restauradores de la fertilidad resulta esencial como primer paso para la obtención de híbridos F1, ya que, dada la característica bienal de este cultivo, este tipo de programas de mejora puede llevar de 4 a 8 años si se realizan pruebas de progenie convencional. 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). Se han desarrollado algunos marcadores moleculares para distinguir los mitotipos (Havey, 1993, 1995, 2000; Sato, 1998; Engelke et al., 2003; Cho et al., 2006; von Kohn et al., 2013), pero sólo el marcador MK (Kim et al., 2009), distingue en una única reacción de amplificación los tres tipos de citoplasmas, N, S y T. En relación al locus Ms, se han desarrollado diferentes tipos de marcadores [RFLPs Gökçe y Havey, 2002; dos marcadores alelo específicos OPT y Psa0 (Bang et al., 2011); dos SCAR, DNF-566 y RNS-357, (Yang et al., 2013); un CAPs jnurf05, (Park et al., 2013); un CAPS ACms.1100 (Bang et al., 2013); y varios SNPs (Havey, 2013)] a partir de genotipos con distinto fondo genético. Los genotipos utilizados para desarrollar estos marcadores se caracterizan, en algunos casos (ej.: jnurf05), por ser líneas segregantes (F2), con poca variabilidad entre sus progenitores, ocasionando una disminución del desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y el locus Ms, cuando los marcadores se han validado en otros materiales más alejados genéticamente. En otras ocasiones, los marcadores (ej.: OPT y Psa0) se desarrollaron utilizando poblaciones de polinización libre, en las cuales no es posible identificar líneas mantenedoras, lo que limita su uso para la selección de estas líneas. Uno de los últimos marcadores moleculares descrito asociado al locus Ms, ha sido el marcador co-dominante jnurf13 (Kim, 2014), el cual estaría a una distancia de Ms menor que jnurf05, posicionado a 0.05cM. Además, según cita el autor, este marcador co-segrega con los genes restauradores de ambos sistemas de androesterilidad (CMS-T y CMS-S), lo que representaría una ventaja a la hora de poder utilizar ambos sistemas para la obtención de híbridos. Por otro lado, al ser un marcador alelo específico, una única reacción de amplificación permitiría genotipar las muestras, sin necesidad de una posterior digestión, como si requiere el marcador CAPs jnurf05.

Aplicación de los marcadores moleculares

Recientemente, en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) se están desarrollando trabajos relacionados con la androesterilidad en cebolla, que se han iniciado con estudios de validación de marcadores moleculares asociados a este carácter. Así, la evaluación del comportamiento de marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en líneas de cebolla androestériles y mantenedoras conservadas en el Banco de Germoplasma

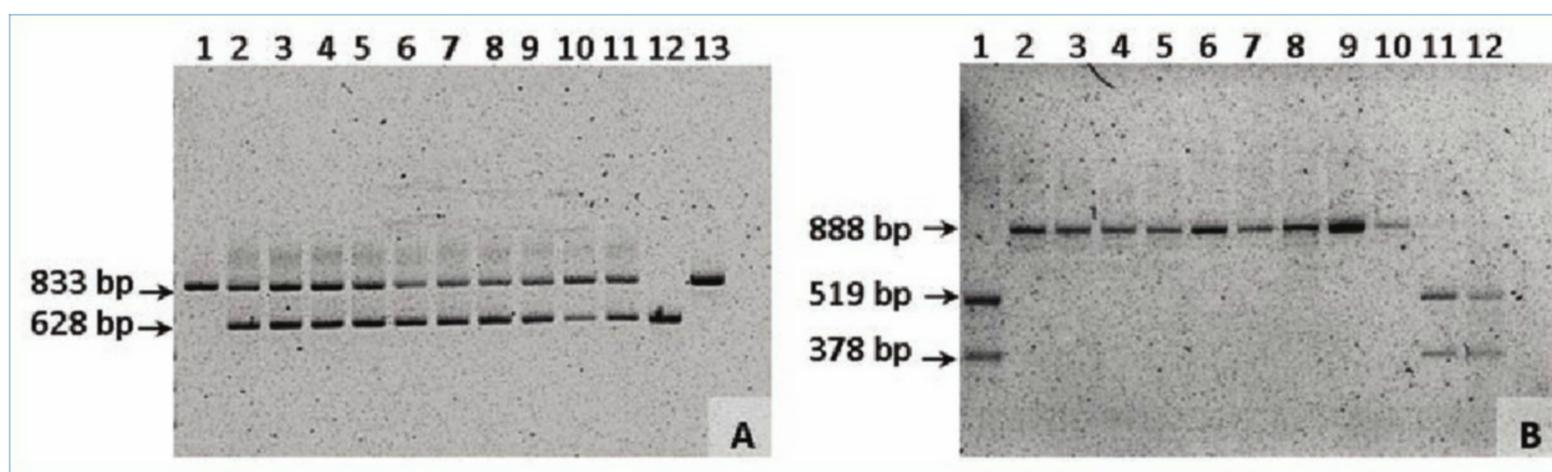


Figura 3. Fragmentos amplificados en distintas variedades de cebolla con los marcadores MK y jnurf05. A) Productos de PCR amplificados con el marcador MK asociado al tipo de citoplasma, los individuos 1-13 mitotipo CMS-T, los individuos 1 y 13 mitotipo normal, y el individuo 12 mitotipo CMS-S; B) productos amplificados con el marcador jnurf05 asociado al locus Ms, individuos del 2-10 homocigotos dominante (MsMs), individuos 1, 11 y 12 homocigotos recesivos (msms).

de Hortícolas de Zaragoza (BGHZ), ha permitido seleccionar dos marcadores (MK y jnurf05), que utilizados conjuntamente identifican correctamente el genotipo de las líneas estudiadas de acuerdo a su fenotipo androestéril (Garcés-Claver et al., 2014) (Figura 3).

La utilización de estos marcadores en 20 variedades locales de cebolla procedentes del BGHZ, ha puesto de manifiesto variabilidad genética para el carácter androesterilidad, tanto para el mitotipo (N, CMS-T y CMS-S) como para el locus Ms en este material vegetal. (López, 2014)

Referencias bibliográficas

- Bang, H.; Kim, S.; Park, S.O.; Yoo, K.; Patil, B.S. 2013. Development of a codominant CAPS marker linked to the Ms locus controlling fertility restoration in onion (*Allium cepa* L.). *Sci. Hortic.*, 153: 42-49.
- 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.
- Berninger, E. 1965. Contribution à l'étude de la stérilité mâle de l'oignon (*Allium cepa* L.). *Ann. Amélior. Plant*, 15: 183-199.
- Cho, K.-S.; Yang, T.-J.; Hong, S.-Y.; Kwon, Y.-S.; Woo, J.-G.; Park, H.-G. 2006. Determination of cytoplasmic male sterile factors in onion plants (*Allium cepa* L.) using PCR-RFLP and SNP markers. *Mol. Cells*, 21: 411-417.
- Cramer, C.S. 2001. Comparison of open-pollinated and hybrid onion varieties for New Mexico. *HortTechnology*, 11: 119-123.
- Dowker, D.; Gordon, G.H. 1983. Heterosis and hybrid cultivars in onions. En: Frankel, R. (ed.) *Heterosis. Monographs on Theoretical and Applied Genetics*, Springer-Verlag, 220-231.
- 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.
- Evoor, S.; Veere Gowda, R.; Gangappa, E.; Krisna Monohar, R. 2007. Heterosis for yield, yield components and quality traits in onion (*Allium cepa* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Science* 20, 813-815.
- Garcés-Claver, A.; López, J.I.; Mallor, C. 2015. Evaluación de marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla (*Allium cepa* L.). *Actas de Horticultura*, 69: 51-52.
- 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. Hort. Sci.*, 127: 944-946.
- Havey, M.J. 1995. Identification of cytoplasmic types 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. 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. 2000. Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasmic types 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. Hort. Sci.*, 138: 306-309.
- Hosfield, G.L.; Vest, G.; Peterson, C.E. 1977. Heterosis and combining ability in a diallel cross of onions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102, 355-360.
- Jones, H.A.; Clarke, A. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 43: 189-194.
- Jones, H.A.; Emsweller, S.L. 1936. A male-sterile onion. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 34: 582-585.
- Joshi, H.; Tandon, J. 1976. Heterosis for yield and its genetic basis in the onion. *Indian Journal of Agricultural Science*, 46: 88-92.
- 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.
- Kim, S. 2014. A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene (Ms) and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions. *Molecular Breeding*, 34: 769-778.
- López, J.I. 2014. 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. Proyecto Fin de Carrera. Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza.
- 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.
- 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 mâle chez l'oignon, *Allium cepa* L. *Ann. Amélior. Plant*, 23: 221-233.
- 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 cytoplasmic types of onion. *Genome*, 56: 737-742.
- Yang, Y.Y.; Huo, Y.M.; Miao, J.; Liu, B.J.; Kong, S.P.; Gao, L.M.; Liu, C.; Wang, Z.B.; Tahara, Y.; Kitano, H.; Wu, X. 2013. Identification of two SCAR markers co-segregated with the dominant Ms and recessive ms alleles in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 190, 267-277.