

Evaluación de marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla (*Allium cepa* L.)

A. Garcés-Claver, J.I. López y C. Mallor

Unidad de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza



Introducción

La androesterilidad o esterilidad citoplasmática masculina (CMS), es la incapacidad de producir polen fértil y se considera una herramienta muy útil para la obtención de híbridos en cebolla. Existen dos tipos de CMS en función del control genético de la restauración de la fertilidad: la CMS-S, donde la restauración de la fertilidad es controlada por un único locus, denominado *Ms*, y la CMS-T, donde la restauración puede estar controlada por tres loci independientes, siendo esta última, no deseada por los mejoradores dada la complejidad del control genético. Los factores inductores de la CMS se encuentran en el genoma mitocondrial y como resultado de la interacción mitotipo/genotipo se pueden encontrar las líneas androestériles (CMS-S/*msms*; CMS-T/-) y las líneas mantenedoras (N/*msms*). La utilización de marcadores moleculares estrechamente ligados tanto al mitotipo como al gen *Ms*, facilita la identificación de las líneas, androestéril y mantenedora, necesarias para una obtención adecuada de híbridos.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el comportamiento de los marcadores disponibles asociados al mitotipo y al locus *Ms* en líneas de cebolla androestériles y mantenedoras conservadas en el Banco de Germoplasma de Hortícolas de Zaragoza (BGHZ) y, por tanto, su utilidad en programas de mejora.

Material y métodos

Se han utilizado: i) seis plantas de la línea androestéril BGHZ-4552 (*S/msms*); ii) seis plantas de la línea mantenedora BGHZ-4553 (N/*msms*); iii) una entrada de la variedad cebolla Fuentes de Ebro (FE) con fenotipo androestéril identificada en campo y verificada mediante tinción vital del polen con FDA (Fluoresceína diacetato) (*S/msms* o T/-); iv) cuatro plantas de la línea androestéril PF (*S/msms*) y cuatro de otra fértil PM (N/-), ambas procedentes de la parcela de un agricultor que produce semilla híbrida a escala comercial.

Para la identificación del mitotipo se utilizó el marcador MK (Kim et al 2009), y para el locus *Ms*, los marcadores: OPT, PsaO (Bang et al., 2011), DNF-566, RNS-357 (Yang et al., 2013) y *jnurf05* (Park et al., 2013). Las condiciones de las reacciones de amplificación que se utilizaron fueron las descritas para cada marcador por los distintos autores.

Resultados y discusión

Para el marcador MK asociado al mitotipo, los resultados obtenidos fueron los esperados según el fenotipo de las líneas en todas las muestras analizadas. Las líneas BGHZ4552 y PF presentaron el fragmento amplificado asociado al sistema CMS-S, mientras que en la línea FE se amplificó el fragmento correspondiente al sistema CMS-T (Fig 1a). Para la línea mantenedora BGHZ4553 y la fértil PM se amplificó el fragmento correspondiente al mitotipo N (Fig 1b), en concordancia al fenotipo 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 *jnurf05*, identificando como homocigotas recesivas (*msms*) las líneas BGHZ4452, BGHZ4553 y PF y como homocigota dominante (*MsMs*) la línea PM. Respecto al resto de marcadores utilizados: OPT identificó incorrectamente la línea BGHZ4452, obteniendo el estado alélico *MsMs* en vez del esperado *msms*; PsaO identificó incorrectamente las líneas BGHZ-4552 y BGHZ-4553; y los marcadores DNF-566 y RNS-357, no sólo identificaron incorrectamente la línea PF, sino que la amplificación de las líneas BGHZ-4452 y BGHZ-4453 no fue la esperada, siendo necesaria una optimización de la reacción.

A la vista de los resultados, para el material vegetal utilizado en este trabajo, sólo los marcadores MK y *jnurf05* utilizados conjuntamente identificaron correctamente el genotipo de las líneas de acuerdo a su carácter androestéril.



UMBELA CON FLORES ANDROESTÉRILES



UMBELA CON FLORES FÉRTILES

Tabla 1. Análisis de 5 marcadores moleculares asociados a la androesterilidad en cebolla utilizando cinco líneas fenotipadas de *A. cepa* L.

Fenotipo	Entrada	Procedencia	Marcador				
			MK	PsaO	DNF-566 / RNS-357	OPT	Jnurf05
androestéril	4552	BGHZ	CMS-S	<i>Msms</i> (fértil)	nd	MsMs (fértil)	<i>msms</i> (estéril)
androestéril	FE	CITA	CMS-T	-	-	-	-
androestéril	PF	agricultor	CMS-S	<i>msms</i> (estéril)	MsMs(fértil)	<i>msms</i> (estéril)	<i>msms</i> (estéril)
mantenedora	4553	BGHZ	N	<i>Msms</i> (fértil)	nd	MsMs (fértil)	<i>msms</i> (manten)
fértil	PM	agricultor	N	<i>Msms</i> (fértil)	MsMs(fértil)	<i>msms</i> (fértil)	MsMs (fértil)

nd: no identificada por amplificación inespecifica

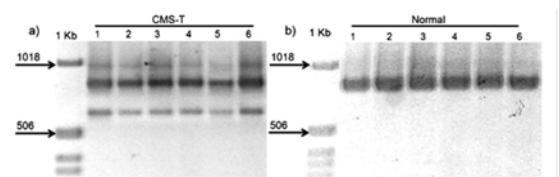


Figura 1: Productos de amplificación con el marcador MK asociados al mitotipo; a) las amplificaciones del 1 a 6 corresponde a seis repeticiones de la línea FEE; b) la amplificaciones del 1 a 6 corresponden a la línea mantenedora BGHZ-4553

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto INIA-FEDER (RTA2011-00118-C02-01) y el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación A16).

REFERENCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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(2):267-277.