

EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA ANDROESTERILIDAD EN CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.)

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

CITA, Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza.

Palabras clave: esterilidad citoplasmática masculina, líneas mantenedoras, híbridos

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. Los factores inductores de la 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, pero puede ser restaurada por acción de genes nucleares ‘restauradores de la fertilidad’. Por tanto, la identificación del tipo de citoplasma (mitotipo) es esencial para conocer el carácter androestéril. Los individuos con el mitotipo normal (N), siempre darán lugar a individuos con polen fértil. Sin embargo, los individuos cuyos mitotipos tengan los factores inductores de la CMS no siempre serán androestériles. 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. Por tanto, 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*, facilitaría la identificación de las líneas, androestéril y mantenedora, necesarias para una obtención adecuada de híbridos. Se han desarrollado algunos marcadores moleculares para distinguir los mitotipos, pero sólo el marcador MK (Kim et al 2009), distingue en una única reacción de amplificación los tres mitotipos. En relación al *locus Ms*, se han desarrollado diferentes tipos de marcadores [OPT y PsaO (Bang et al., 2011); DNF-566 y RNS-357 (Yang et al., 2013); jnurf05 (Park et al., 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 PsaO) 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. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el comportamiento de estos marcadores 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

Como material vegetal se ha utilizado: i) seis plantas de la línea androestéril BGHZ4552 (S/*msms*); ii) seis plantas de la línea mantenedora BGHZ4553 (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 di acetato) (S/*msms* o T/-); iv) cuatro plantas de la línea androestéril PF (S/*msms*) y cuatro de otra fértil PM (N/-), ambas pro-

cedentes de la parcela de un agricultor que produce semilla híbrida a escala comercial. Para la identificación del mitotipo se utilizó el marcador MK. Los marcadores asociados al *locus Ms* que se evaluaron fueron: OPT, PsaO, DNF-566, RNS-357 y jnurf05. 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. Para la línea mantenedora BGHZ4553 y la fértil PM se amplificó el fragmento correspondiente al mitotipo N, 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 BGHZ4552 y BGHZ4553; y los marcadores DNF-566 y RNS-357, no sólo identificaron incorrectamente la línea PF, sino que la amplificación de las líneas BGHZ4452 y BGHZ4553 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.

AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por INIA-FEDER (RTA2011-00118-C02-01) y GA- 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.