

Agradecimientos

Al Ing. Agr. PhD. Pablo Speranza, Ing. Agr. PhD. Guillermo Galván y Dra. Gabriela Speroni por su confianza, orientación, disponibilidad y valiosos aportes que me brindaron para la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su colaboración y por compartir gratos momentos juntos.

Al Dr. Francisco Vilaró, Téc. Agrop. Gustavo Rodríguez y Asist. Adriana Reggio, por brindarme los materiales e información sobre las plantas analizadas, provenientes de INIA Las Brujas.

A todos los Docentes y Funcionarios de Facultad de Agronomía que siempre estuvieron ahí cuando necesité de su colaboración.

A mi familia, por su apoyo incondicional y comprensión durante todo este período de formación.

A Andrés que ha sido un pilar fundamental en mi vida y en la concreción de esta etapa.

Resumen

Las poblaciones locales de cebolla en Uruguay son una gran fuente de diversidad genética que ha sido utilizada para la obtención de algunos de los cultivares más difundidos del país. El mejoramiento genético de las cebollas locales radica principalmente en su adaptación varietal. Dada las exigencias del mercado, el interés de los agricultores sobre estos materiales se halla en la búsqueda de buenas características agronómicas, aprovechando sus adaptaciones agroecológicas y las técnicas de cultivo locales. En base a esto, en 1991 se inició un programa de mejoramiento genético de cebolla cuyo objetivo es la mejora de la calidad comercial. Para ello se realizan diferentes selecciones de poblaciones y se busca la identificación y caracterización de fuentes de androesterilidad para la producción de híbridos. En las cebollas existen, además de los citoplasmas normales (N), dos tipos diferentes de citoplasmas que inducen a la androesterilidad genética-citoplasmática en *Allium cepa*: CMS-(S) y CMS-(T). Éstos son utilizados en los programas de mejoramiento. En 2007 se multiplicó la población local UR9719 con dos objetivos la selección por resistencia entre líneas endocriadas de esta población y determinar la eficiencia del método de mejoramiento selección de progenie S1 aplicado sobre la población local. Dentro de esta población se observaron algunas plantas que no produjeron semillas en autopolinización, por lo que se consideraron plantas potencialmente androestériles. En este trabajo se trabajó con esas plantas a las cuales se les realizaron dos tipos de análisis: tinción con FDA y PCR. Con el primero se determinó la viabilidad del polen y con el segundo se identificaron caracterizaron los diferentes tipos de citoplasmas. La tinción con FDA mostró que algunas plantas producían polen viable, algunas polen inviable y otras no producían polen. Para la PCR se utilizaron tres tipos de marcadores moleculares, *cob* y *orfA501* y *orf725*. Este análisis determinó la presencia de CMS-T en todos los individuos analizados. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos inferir la presencia de genes nucleares restauradores de la fertilidad en la población local UR9719. Además se caracterizaron citoplasmáticamente, con el marcador molecular *orf725*, una serie de medios hermanos resultantes del cruzamiento por polinización abierta entre dos cultivares, "INIA Colorada" y "Rojo Duro", para determinar su comportamiento. En esta población se identificaron los tres tipos de citoplasmas posibles, CMS-S, SMS-T y citoplasma normal, en diferentes porcentajes. Esto es congruente con los citoplasmas presentes en los progenitores que les dieron origen.

Caracterización de fuentes de androesterilidad genético-citoplasmática en una población local de cebollas de Uruguay

Daniela Musso

Autora

Ing. Agr. PhD. Pablo Speranza, Ing. Agr. PhD. Guillermo Galván, Dra. Gabriela Speroni
Tribunal

**Facultad de Agronomía
Universidad de la República
Montevideo, 2012**

Contenido

I.	Introducción	6
A.	Mejoramiento de cebolla en Uruguay	7
B.	Androesterilidad genético-citoplasmática y su utilización para la producción de híbridos comerciales	9
II.	Objetivos	17
A.	General:	17
B.	Específicos:.....	17
III.	Materiales y métodos	17
A.	Material vegetal	17
B.	Tinción con FDA.....	18
1.	Metodología para determinar la viabilidad del polen.....	18
C.	Extracción de ADN	20
D.	Amplificación por PCR	20
1.	Metodologías para determinar el tipo de citoplasma	20
IV.	Resultados	22
V.	Discusión	29
VI.	Bibliografía	32

Introducción

El género *Allium*, proveniente de Asia, se encuentra dentro de la clase de las monocotiledóneas y pertenece al orden Asparagales (Brewster, 2008). Fue considerado inicialmente como perteneciente a la familia Liliaceae, pero los resultados de estudios moleculares lo incluyen en la actualidad, dentro de la familia Alliaceae, muy cercana a la familia Amaryllidaceae (Fristch & Freisen, 2002). Dentro del género *Allium* existen seis subgéneros: *Allium*, *Rhizirideum*, *Amerallium*, *Melanocrommyum*, *Bromatorrhiza* y *Caloscordon* que comprenden 700 especies. (Hanelt *et al.*, 1992; citado en Van Raamsdonk *et al.*, 2003).

Este género es de gran valor económico ya que incluye cultivos alimenticios y especies ornamentales (Fristch & Freisen, 2002). Los cultivos más importantes evolucionaron a partir de los parientes silvestres que crecen en las regiones montañosas de Asia central (Brewster, 2008). De las especies cultivadas de *Allium*, el bulbo de las cebollas es el producto de mayor importancia económica, está incluido en la dieta de las diferentes culturas del mundo, y esto se ve reflejado por la alta producción en los países con mayor población como China, India, Indonesia, Rusia y EE.UU. (Havey, 1993). El género *Allium* incluye la especie de cebolla cultivada *Allium cepa* L. Las mismas han sido utilizadas con diferentes propósitos en alimentos, en medicina e incluso con fines religiosos desde tiempos prehistóricos (Havey, 1993). Debido a su valor nutricional, el cultivo de cebollas ha sido significativo para la población mundial. En los murales del antiguo Egipto (3.000 a.C.), se puede observar su utilización como un recurso alimenticio de gran trascendencia (Shigyo & Kik, 2008).

Los bulbos son empleados para la propagación vegetativa (Fristch & Freisen, 2002). A pesar que el cultivo de cebollas es el más importante dentro del género *Allium* y ocupa el segundo lugar en valor después de tomates en la lista de cultivos de hortalizas en el mundo (Kik, 2002), el genoma y los recursos genéticos de las cebollas están escasamente caracterizados (McCallum, 2007a).

La mayoría de las especies de *Allium* son alógamas, es decir presentan polinización cruzada, diploides ($2n=16$) (Fristch & Freisen, 2002) y bianuales. Las poblaciones son altamente heterocigotas y la variación fenotípica considerable (McCallum *et al.*, 2007b). El alto nivel de heterocigosidad que existe en las poblaciones de cebolla es mantenido por generaciones de cruzamiento al azar. (Brewster, 2008). La

hibridización interespecífica se conoce en varios grupos de *Allium* como un modo de especiación a través del cual ocurre la evolución del género (Klaas & Friesen, 2002). Si bien la hibridación interespecífica espontánea no es rara, existen algunos grupos con fuertes barreras de cruzamiento, incluso entre especies morfológicamente muy similares (Fristch & Freisen, 2002).

Las especies de *Allium* se han adaptado a crecer en diferentes nichos ecológicos. Debido a esto, poseen ritmos diferentes de crecimiento. Existen taxa con floraciones en primavera, verano y otoño; algunas de ciclo de vida perenne largo y otras corto; con uno o varios ciclos anuales de formación de hojas; especies que presentan dormancia en invierno o verano. Muchas especies anuales crecen durante un corto período de tiempo en primavera y comienzos de verano donde ocurre la brotación de hojas y la maduración de las semillas que demoran de dos a tres meses (Fristch & Freisen, 2002).

Muchas especies silvestres de *Allium* son aún recolectadas y utilizadas como comestibles; sin embargo, sólo unas pocas especies son comercialmente cultivadas como alimento (Brewster, 2008). Los habitantes locales explotan y manejan las especies silvestres inadecuadamente. La excesiva cosecha por parte de los mismos conduce a que esté ocurriendo un gran declive de los recursos respecto al pasado (Fristch & Freisen, 2002).

A. Mejoramiento de cebolla en Uruguay

En Uruguay las poblaciones locales (PL) o variedades criollas tienen importancia económica en numerosos cultivos hortícolas (Galván *et al.*, 2005), representando una parte significativa del abastecimiento del mercado (Galván, 2000). La multiplicación de PL es un sistema de manejo de los recursos genéticos en el que simultáneamente se realiza la producción de semilla, la selección de los genotipos superiores, y el mantenimiento del germoplasma (Galván *et al.*, 2005). Las PL de cebolla del Uruguay constituyen una fuente de diversidad genética invaluable para el mejoramiento y han proporcionado el material genético en que se basan algunos de los cultivares más difundidos en el país (Monteverde *et al.*, 2009). El mejoramiento genético de las cebollas locales radica principalmente en que su rango de adaptación varietal es considerablemente estrecho (Vilaró *et al.*, 2005).

En Uruguay existe un germoplasma local con semillas multiplicadas artesanalmente por los productores hortícolas, cuyo origen proviene de variedades traídas por los inmigrantes. Este germoplasma puede presentar diversos grados de adaptación a las condiciones agroecológicas y a las técnicas de cultivo locales (Galván, 2000). En el cultivo de cebollas existe variabilidad genética en diversas características como adaptación a condiciones agroclimáticas, fecha de cosecha, floración, comportamiento frente a enfermedades, aptitud para la conservación y aspecto comercial. Esta información permite producir recomendaciones específicas, de acuerdo a la zona de producción y mercado de destino (Vilaró *et. al*, 2005). Por lo tanto, el mejoramiento genético ha hecho uso del germoplasma local, lo que ha permitido el aprovechamiento de su adaptación y su mantenimiento competitivo en la producción (Galván *et al.*, 2005).

El mejoramiento genético y la multiplicación de semillas realizados localmente, originan cultivares y poblaciones superiores a los mejorados en otras regiones (Pike, 1986), adaptadas a su ambiente. Este proceso está influenciado en cada cultivo por las características del material original y por el grado de heterogeneidad y heterocigosis de la especie. (Galván, 2000). En el caso de la cebolla, la misma está adaptada a clima frío y posee mejor comportamiento en países templados y con clima relativamente seco. La incidencia de precipitaciones en Uruguay conlleva a un aumento en las enfermedades foliares y de bulbo afectando el rendimiento y reduciendo la aptitud para la conservación. El cultivo de cebolla en el país consiste fundamentalmente en poblaciones locales mantenidas por productores durante décadas, lo que determina que sean adaptativamente superiores respecto a las semillas de otros orígenes además de ser económicamente menos costosas (Vilaró *et. al*, 2005). El interés de los agricultores en las poblaciones locales se ha basado en las características agronómicas (Galván, 2000).

La mayor parte de la producción de cebollas en Uruguay se destina al mercado local (Vilaró *et. al*, 2005). Dado que las exigencias del mercado son cada vez mayores, el germoplasma local presenta limitantes en su calidad comercial (Galván, 2000). En general, carecen de uniformidad y presentan características comerciales defectuosas. Asimismo la falta de control durante la obtención de la semilla provoca que la calidad sanitaria sea incierta. Estos problemas de productividad y calidad, limitan los proyectos hacia la exportación del producto (Vilaró *et. al*, 2005).

En base a las características favorables del germoplasma local, en 1991 se inició un programa de mejoramiento genético de cebolla (Galván & González, 1992). A partir de

estos programas, INIA y Facultad de Agronomía han obtenido y difundido varios cultivares locales de cebolla que han mejorado la competitividad del rubro (Campelo & Arboleya, 2005) y evidencian tanto ventajas productivas como comerciales. A través de los trabajos de mejoramiento genético realizados en INIA y Facultad de Agronomía se han desarrollado cultivares locales (Campelo & Arboleya, 2005). Los criterios de selección utilizados se han basado en obtener uniformidad y calidad comercial. Durante la década del '90, INIA Salto Grande liberó el cultivar local de mayor difusión y en la actualidad el principal de la zona norte, "INIA-Casera". El mismo fue obtenido por selección masal a partir de una población cultivada en la zona Litoral Norte. Por otra parte, Facultad de Agronomía en el año 2000 liberó "Pantanos del Sauce CRS", actualmente el cultivar más difundido en la zona sur. Éste se obtuvo a partir de poblaciones locales cultivadas en la zona de Pantanos del Sauce en Canelones. Los cultivares "INIA Casera" y "Pantanos del Sauce CRS" han mejorado la competitividad del rubro y han sido exportados: "INIA Casera" a Holanda, "Pantanos del Sauce CRS" a otros países europeos en contra estación, y ambos a Brasil (Campelo & Arboleya, 2005). En INIA Las Brujas se desarrollaron dos cultivares de cebolla: "INIA-Valenciana" liberada en la década del '80 e "INIA Colorada" liberada en 2004. En 2009 se liberó un nuevo cultivar a partir de un trabajo conjunto entre INIA y Facultad de Agronomía, "INIA FAGRO Dulce" la cual fue obtenida en dos ciclos de selección masal, a partir de una población local de origen regional (Vilaró *et. al*, 2005).

La importancia comprobada de los cultivares locales justifica su utilización y continuación de su desarrollo. Al presente se busca, mediante cruzamientos y posterior selección, combinar características favorables de cultivares locales y del exterior (Vilaró *et. al*, 2005). El objetivo principal es la mejora de la calidad comercial (Galván, 2000).

B. Androesterilidad genético-citoplasmática y su utilización para la producción de híbridos comerciales

En la actualidad se producen, mediante diferentes técnicas, cultivares híbridos comerciales en programas de mejoramiento de *Allium*, donde se seleccionan

determinadas características de interés agronómico. Estas variedades híbridas tienen la ventaja de aprovechar mejor la heterosis, es decir el incremento en tamaño o en vigor de un híbrido respecto al promedio de sus progenitores. La heterosis, es el resultado de reunir genes dominantes favorables de ambos progenitores, (Peohlman, 1987) aumentando la heterocigosis y enmascarando la carga genética. Por lo tanto, en los híbridos la influencia de cualquier alelo recesivo desfavorable presente en homocigosis en una de sus líneas parentales es ocultado por la presencia de alelos favorables dominantes provenientes del otro progenitor (Brewster, 2008).

La formación de cultivares híbridos es posible a partir del cruzamiento de líneas endocriadas, que son un conjunto de individuos genéticamente uniformes que descienden de una planta y son obtenidos a partir de varios ciclos de autofecundación forzada y selección posterior. A partir de cruzamiento de líneas endocriadas se obtiene la población F1, la cual es utilizada para producir el cultivo comercial. Las ventajas de los híbridos F1 es que no se reproducen de la semilla guardada, sino que deben ser producidos de nuevo en cada generación a partir de las líneas parentales apropiadas, que permanecen bajo el control de la empresa o semillerista (Brewster, 2008).

Los cruzamientos entre poblaciones de cebollas muy divergentes, pueden producir híbridos que superan en vigor a cualquiera de sus progenitores (Brewster, 2008). El cultivo de cebollas es uno de los pioneros en los que la heterosis ha sido comercialmente explotada. La presencia de androesterilidad en cebollas es uno de los principales componentes requeridos para la explotación de la heterosis (Pathak & Gowda 1994). La androesterilidad se utiliza como un método de hibridación masiva. Budar & Pelletier (2001), proponen una acepción de androesterilidad genético-citoplasmática más precisa que la que normalmente se utiliza: androesterilidad maternalmente heredada debido a un gen mitocondrial específico cuya expresión afecta la producción de polen viable sin otro perjuicio sobre la planta.

En las cebollas el método de mejoramiento que predomina es la hibridación entre genotipos distantes remotos, lo que permite aumentar la variabilidad genética (Kik, 2002). La importancia de los genes causantes de la androesterilidad en el mejoramiento vegetal, radica en la practicidad para producir cultivares híbridos (Brewster, 2008). Para elaborar un cultivar híbrido se cruza una línea particular androestéril con un donante de polen determinado para producir un híbrido F1 vigoroso con las características deseadas (Brewster, 2008).

Para la producción de semillas híbridas utilizando androesterilidad genético-citoplasmática, la línea endocriada que actúa como hembra debe tener una constitución génica $S\ ms/ms$ (S =esterilidad citoplasmática, ms/ms =homocigota doble recesivo para el locus restaurador nuclear) (Allard, 1980). De esta manera se asegura que la planta no se autofecunde ya que al poseer citoplasma androestéril no produce polen. Esta línea se mantiene por el cruzamiento de ésta con una línea mantenedora androfértil, cuya constitución genética es $N\ ms/ms$ (N =fertilidad citoplasmática). A su vez la línea paterna puede tener citoplasma estéril y el gen dominante para la fertilidad ($S\ Ms/Ms$, $S\ Ms/Ms$) o citoplasma normal (N) y cualquier combinación de genes ($N\ Ms/Ms$, $N\ Ms/ms$, $N\ ms/ms$) (Peohlman, 1987) (Fig 1.).

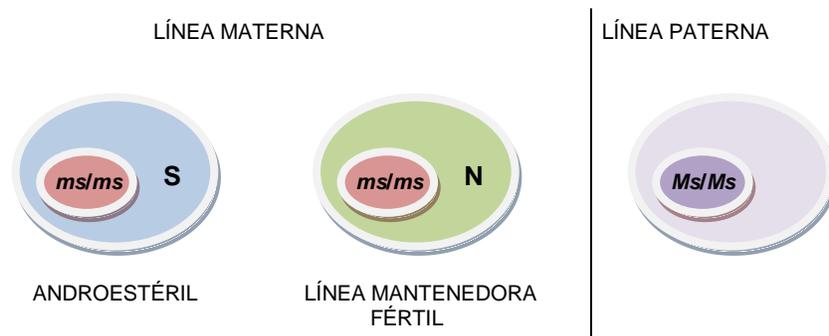


Fig 1. Representación esquemática de los genotipos que deben poseer los individuos cuando se utiliza la androesterilidad como forma de hibridación masiva.

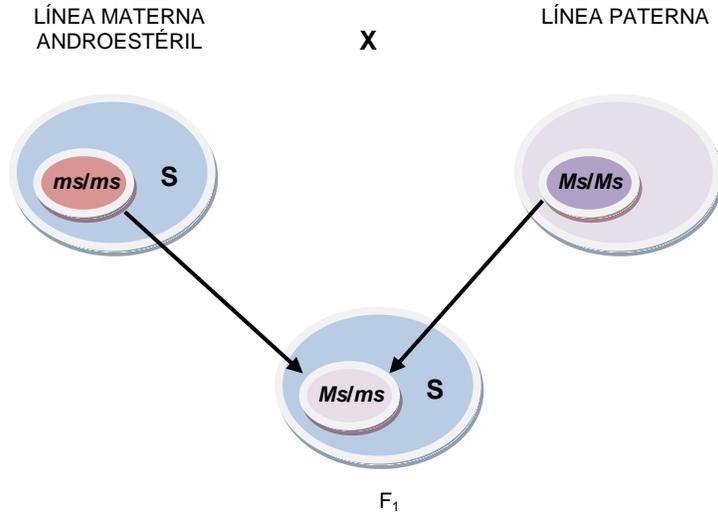


Fig 2. Representación esquemática de la producción de híbridos simples utilizando la androesterilidad como método

Tanto la línea paterna endocriada como la línea mantenedora se mantienen por cosechas de las semillas que producen, ya que son el producto del cruzamiento entre ellas mismas siempre y cuando estén adecuadamente aisladas de polen externo.

Una vez obtenidas las líneas endocriadas paternas y maternas se siembran juntas para que se crucen y así obtener la semilla híbrida en la F1, la cual se cosecha de las plantas androestériles lo que asegura que no haya habido autofecundación (Fig 2 y 3.).

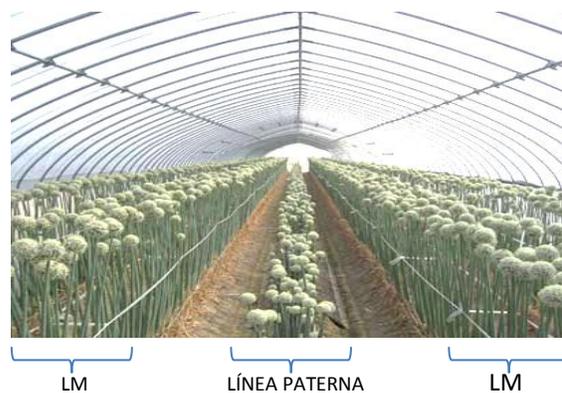


Fig 3. En el centro se observa la línea paterna endocriada y a ambos lados filas de líneas maternas (LM) endocriadas

La transmisión maternal de citoplasmas específicos combinada con la herencia mendeliana de los genes nucleares, permite un eficiente y completo control de la polinización (Engelke *et al.*, 2004). En ausencia de la androesterilidad, el control de la polinización cruzada, para que no exista ningún tipo de polinización libre, se puede lograr sólo mediante la laboriosa eliminación de las anteras de las flores antes de la liberación del polen. Luego, la transferencia de polen que se desee utilizar debe realizarse a mano. Este procedimiento es demasiado trabajoso, por lo que es útil solamente para unos cuantos cruzamientos controlados en el mejoramiento o el trabajo experimental (Brewster, 2008). Por lo tanto, los sistemas CMS son de gran utilidad en el presente para la producción de semillas híbridas de cebolla y otros cultivos (Havey, 2000).

La androesterilidad se caracteriza porque los gametos masculinos no son funcionales, como resultado del efecto de genes mutantes (androesterilidad genética), de factores citoplasmáticos (androesterilidad citoplasmática) o combinaciones de ambos (androesterilidad genético-citoplasmático) (Allard, 1980). La misma puede tener múltiples causas: condiciones de crecimiento adversas, de enfermedades, o de mutaciones (Budar & Pelletier, 2001).

Las plantas androestériles aparecen tanto en plantas autóгамas como alógamas como resultado de mutaciones en cualquiera de los múltiples loci que rigen las diferentes etapas vitales en la formación del polen. Estos mutantes son muy útiles para el mejoramiento de plantas, ya que simplifica la generación de híbridos (Allard, 1980). La primera referencia de la utilización de androesterilidad para la producción de semillas híbridas de cebollas fue hecha por Jones y Davis (1944) tras descubrir la androesterilidad genético-citoplasmático en las mismas (Allard, 1980).

Las manifestaciones fenotípicas de las plantas androestériles pueden ser muy variadas: ausencia de órganos masculinos, fallas en el desarrollo normal del tejido esporangénico, aborto de polen en cualquier momento de su desarrollo, ausencia de estambres dehiscentes o incapacidad del polen maduro para germinar en el estigma compatible (Budar & Pelletier, 2001). Las plantas hermafroditas genéticamente androestériles mantienen las funciones femeninas normales (Budar & Pelletier, 2001).

Los sistemas CMS (androesterilidad genético-citoplasmática) muestran una incompatibilidad nuclear-citoplasmática que puede ocurrir espontáneamente, o luego de tratamientos con mutágenos o como resultado de cruzamientos interespecíficos (Hanson & Conde 1985 citado en Havey, 1993).

La CMS ha sido identificada en aproximadamente 140 especies, 47 géneros y 20 familias de angiospermas (Laser & Lersten, 1972). Estos sistemas CMS son excelentes modelos para el estudio de la interacción entre factores nucleares y citoplasmáticos, debido a la restauración de la fertilidad dependiente de genes nucleares que suprimen las disfunciones citoplasmáticas (Schnable & Wise, 1998).

En las cebollas, la androesterilidad depende del efecto combinado de genes nucleares y un factor citoplasmático. Los genes nucleares tienen dos formas, la dominante, y la recesiva. Cuando la dominante está presente, la planta produce polen fértil. Cuando la recesiva está presente en homocigosis, dependiendo del factor citoplasmático presente, puede resultar en polen estéril. El genotipo homocigota únicamente causa androesterilidad si se encuentra en combinación con el factor citoplasmático S. Si un individuo presenta factor citoplasmático N, independientemente de su genotipo nuclear, producirá polen viable (Brewster, 2008).

En cebollas, existen dos diferentes sistemas CMS: CMS-(S) (Jones & Emsweller 1936 citado por Kim *et al.* 2009) y CMS-(T) (Berninger 1965 citado por Kim *et al.* 2009). Estos sistemas CMS se han utilizado para la producción de híbridos (Kim *et al.* 2009). CMS-(S) se descubrió en el cultivar de cebollas 'Italian Red' cuya esterilidad resulta de la interacción del factor citoplasmático S y un único gen restaurador nuclear en su forma recesiva *ms/ms* (Jones & Emsweller, 1936; Jones & Clarke, 1943 citados por Engelke *et al.*, 2003). Por otro lado, CMS-(T) se descubrió en el cultivar 'Jaune paille des Vertus' (Berninger 1965, citado por Engelke *et al.*, 2003) y está afectado por la segregación de tres loci restauradores independientes en el genoma nuclear (Berninger, 1965 citado por Cho *et al.*, 2006). Las plantas con citoplasma T 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 que actúan juntos para restaurar la fertilidad de sus genes nucleares (Havey, 2002)

De Courcel *et al.* (1989), Holford *et al.* (1991a), Satoh *et al.* (1993), Havey (1995), (2000) (citados por Engelke *et al.*, 2003) encontraron indicios de que el citoplasma-(S) sería de origen aloplásmico. La obtención de este tipo de plantas se logra mediante cruzamientos de sustitución (Kihara, 1951 citado por Lacadena, 1996), donde una especie cultivada (B), que se desea mejorar, se cruza primeramente con una especie extraña (A) la cual va a actuar como línea materna aportando el citoplasma. Luego se realizan retrocruzamientos con la especie cultivada la cual actúa siempre como línea paterna

([AxB] xBxBxB...). De esta manera la información genética extraespecífica introducida se reduce a la contenida en los organelos citoplasmáticos, ADN mitocondrial y ADN cloroplástico (Lacadena, 1996). Por otro lado, el citoplasma-(T) debe ser considerado como una mutación autoplásmica del citoplasma-(N) (Engelke *et al.*, 2003). Los dos tipos de citoplasmas androestériles, CMS-S y CMS-T, son utilizados en los programas de mejoramiento de híbridos F1 de cebollas (Cho *et al.*, 2006). El citoplasma S es ampliamente utilizado para la producción de semillas debido a que su androesterilidad es estable en todos los ambientes, no hay reducción en su fertilidad femenina, además de la habitual ocurrencia del alelo recesivo en el gen nuclear restaurador (*MsMs*) permitiendo la propagación de semillas de líneas androestériles (Jones and Clarke 1943, citado en Havey, 2000). El segundo recurso de androestrilidad, citoplasma T, fue identificado por Berninger (1965), caracterizado genéticamente por Schweisguth (1973) y es utilizado para producir semillas híbridas de cebollas en Europa. La androesterilidad genético-citoplasmática es el método para producir semillas híbridas de cebolla más económica y ampliamente utilizado (Havey, 2000). La identificación de los tipos de citoplasmas permitiría clasificar la naturaleza genética de las plantas estériles, la cual ocurre espontáneamente en variedades de polinización abierta. Análisis genéticos revelaron que los factores *ms* y (S) ocurrirían en diferentes frecuencias en variedades de cebollas de diferentes países (van der Meerand van Bennekom, 1971 citado en Engelke *et al.*, 2003). Las líneas androestériles (*S ms/ms*) y su línea isogénica mantenedora (*N ms/ms*) son esenciales para la propagación de híbridos F1 utilizando los sistemas CMS (Cho *et al.*, 2006).

Las mutaciones en el genoma mitocondrial de las plantas que conllevan a los sistemas CMS, reducen o eliminan el desarrollo de la producción de polen fértil en las anteras. Sin embargo, existe en el genoma nuclear genes restauradores de la fertilidad masculina que restablecen la aptitud del polen. Las mutaciones de estos genes afectan a un gran número de funciones ocasionando en su forma doble recesiva la androesterilidad nuclear (Budar & Pelletier, 2001).

Durante el desarrollo de líneas endocriadas en el programa de mejoramiento de poblaciones locales de cebolla en Facultad de Agronomía, se han identificado plantas androestériles. La frecuencia varía entre un 1 a 3 % para distintas poblaciones (Galván & Sollier, 1994). En 2007 se multiplicó la población local UR9719 (ciclo intermedio a tardío, buen rendimiento, calidad de bulbos desuniforme) obteniendo así la primera endocría, con

los siguientes objetivos: la selección por resistencia entre líneas endocriadas de esta población y determinar la eficiencia del método de mejoramiento selección de progenie S1 aplicado sobre la población local (Porta, 2010). Para ello, UR9719 fue colectada en Canelones, y multiplicada en el Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía. Una vez obtenida la S1 se observó mayor variabilidad la cual podría ser explicada por el aumento de alelos en homocigosis y fijación de alelos luego de un ciclo de autofecundación (Porta, 2010). Además, dentro de esta población UR9719 se observaron algunas plantas que no produjeron semillas en autopolinización, por lo que se consideraron plantas potencialmente androestériles. Sin embargo, a simple vista no es posible determinar a qué tipo de CMS pertenecen o si era algún tipo de androesterilidad no descrito. Por otra parte, en el programa de mejoramiento de cebollas que está llevando a cabo INIA, se utilizan como progenitores algunos híbridos comerciales que seguramente poseen CMS. Teniendo en cuenta esta situación es importante conocer, para el manejo y multiplicación posterior de los materiales del programa, en qué proporción se mantiene la androesterilidad. Por estas razones resulta importante poner a punto un sistema de identificación de los tipos de CMS y aplicarlo a la descripción de los materiales que manejan los programas de mejoramiento en Uruguay.

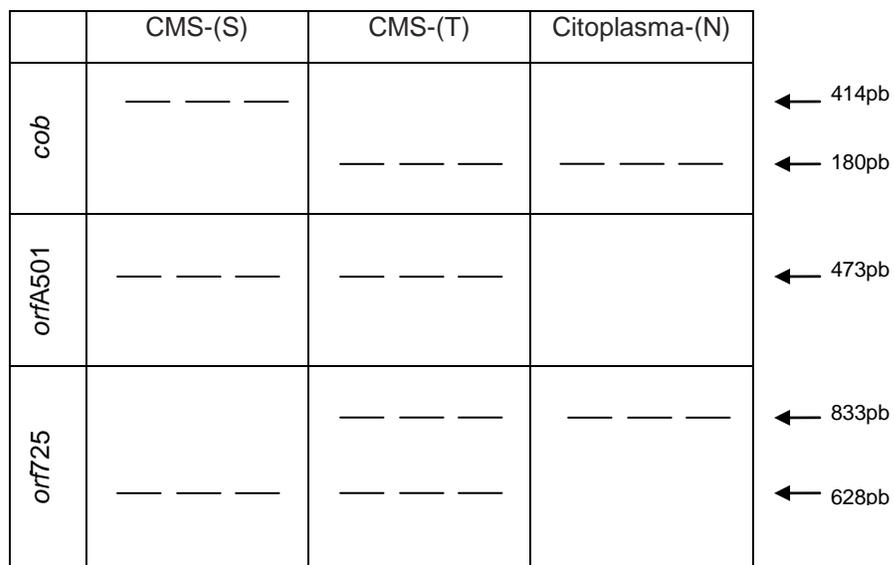


Fig 4. Representación esquemática del patrón de bandas esperadas para los tres tipos de citoplasmas, CMS-(S), CMS-(T) y Citoplasma-(N) según el marcador molecular utilizado *cob*, *orfA501* y *orf725*.

II. Objetivos

A. General:

- Confirmar la presencia y caracterizar fuentes de androesterilidad en las colecciones de variedades locales de cebolla del Uruguay

B. Específicos:

- Analizar la viabilidad del polen en plantas identificadas como posibles materiales androestériles en una población local
- Determinar el tipo de citoplasma presente en los materiales androestériles identificados.
- Determinar el tipo de citoplasma presente en los materiales de un programa de mejoramiento por familias de medios hermanos de INIA, originadas de una población híbrida obtenida por libre polinización entre individuos de la variedad anteriormente conocida como “INIA Colorada” y el híbrido comercial “Rojo Duro”.

III. Materiales y métodos

A. Material vegetal

Se analizaron doce plantas de la población local UR9719, previamente identificadas como posibles plantas androestériles y dos plantas de la misma población a las que se les observó polen y fueron utilizadas como controles, todas ellas colocadas en macetas en el invernáculo de la Facultad de Agronomía (Fig 5.). A cada una de ellas se les adjudicó un número para su identificación: 5, 30, 51, 84, 103, 118, 119, 128, 129, 131, 133, 197 y 39, 141 respectivamente.

Además se utilizaron otras plantas como controles provenientes de cultivares comerciales: Cavallier, Tropical, Primavera, Presto, Allegro, H9, Super Early Shugyoku E, Texas Early Grano 502, Granex Hybrid 33. En las figuras se observan con las abreviaciones CAV, TRO, PRI, PRE, AL, H9, SH, TEX y GR respectivamente. También se

analizaron de una población proveniente de INIA Las Brujas, un conjunto de familias de medios hermanos originadas de una población híbrida obtenida por libre polinización entre individuos de la variedad "INIA Colorada" y el híbrido comercial "Rojo Duro". Estas plantas se identificaron con los números 1, 6, 13, 16, 23, 32, 34, 35, 36, 40, 44, 52, 69, 71, 73, 75, 76, 84, 94 y 97. Para cada línea se analizaron dos plantas.

B. Tinción con FDA

1. Metodología para determinar la viabilidad del polen

La germinación del polen está principalmente determinada por el estado de la membrana de las células vegetales; esto significa que el principal determinante de la viabilidad del polen es el estado de la membrana celular. Al momento de la dispersión, la membrana está disociada, no forma la barrera osmótica y el grano de polen está parcialmente deshidratado. Las propiedades normales se recuperan cuando el grano de polen alcanza el estigma donde es controladamente hidratado. Según esta visión, el decaimiento de la viabilidad aparente se relaciona con la pérdida progresiva de la capacidad de las membranas del grano de polen para recuperar una estructura normal en la rehidratación. Por lo tanto, existe una gran correlación entre el test de reacción fluorocromática (FCR) y la germinación. (Shivanna & Heslop-Harrison, 1981).

El test de FCR puede utilizarse como un índice de la germinabilidad del polen. Permite determinar la integridad del plasmalema de las células vegetales y la presencia de una esterasa capaz de escindir el éster fluorogénicos, diacetato de fluoresceína (FDA) (Shivanna & Heslop-Harrison, 1981). Esta técnica mide la integridad de la membrana plasmática y la actividad enzimática de la célula vegetativa. El FDA penetra a la célula vegetal como un éster de ácido graso y es hidrolizado en su interior liberando la fluoresceína que se acumula en el citoplasma y fluoresce. Se consideran viables los granos de polen que brillan intensamente al ser observados al microscopio de fluorescencia (Shivanna & Rangaswamy, 1992)

Para el análisis de la calidad del polen, se colectó polen fresco de flores en reciente anthesis de las plantas de la población local UR9719 y se les realizó la técnica de reacción fluorocromática (FCR). Se analizaron un verticilo internos y uno externo de tres flores de cada planta (Fig 6.). Para la tinción del polen se empleó el colorante FDA (di-

acetato de fluoresceína). Para ello se utilizó una solución de sacarosa 10% a la cual se le adicionó, gota a gota, una solución de diacetato de fluoresceína en acetona (2mg/mL), hasta que la mezcla se tornó persistentemente turbia.



Fig 5. Plantas potencialmente androestériles, seleccionadas en 2007 por la no producción de semillas en la autofecundación.

El polen colectado de cada verticilo se colocó en un portaobjetos se incorporó una gota de la solución anteriormente mencionada y se incubó en cámara húmeda por 10 minutos. Luego se cubrió con cubreobjeto y se realizó el conteo en microscopio de fluorescencia Olympus Vanox AH-3, con filtro para el rango de excitación del azul, B, y fuente de luz UV. De acuerdo al brillo emitido por los granos, los mismos se clasificaron en polen viable y polen no viable (Fig 7.)

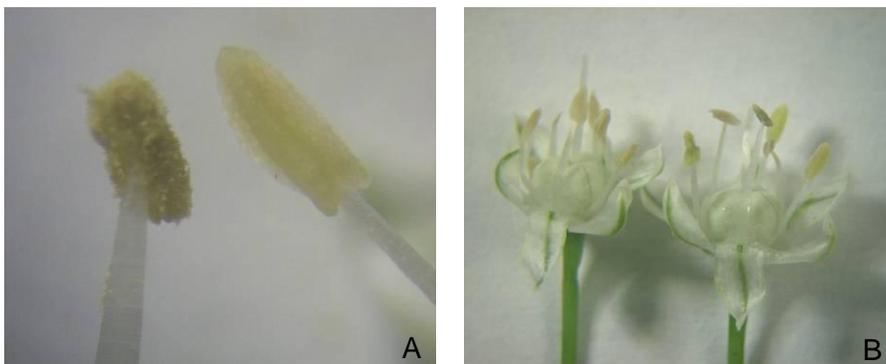


Fig 6. Anteras y flores de la población local UR9719. (A) A la izquierda, antera de una planta normal fértil en antesis; a la derecha, antera de planta estéril 118. (B) Flores de la planta 118 de la población UR9719

C. Extracción de ADN

El ADN genómico total, de todas las plantas utilizadas, fue extraído de hojas frescas de las plantas, de acuerdo al protocolo de extracción de ADN CTAB de Doyle & Doyle (Doyle & Dickson, 1987), con la modificación de agregarle 600 µl de CTAB buffer. La electroforesis de las extracciones se llevó a cabo en geles de agarosa 0.8% en 100µl de TBE 1X y se corrieron durante 75 minutos a 110V. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de UV y se fotografiaron.

D. Amplificación por PCR

1. Metodologías para determinar el tipo de citoplasma

Los marcadores moleculares se pueden utilizar para probar la variabilidad genética subyacente cuando ésta no está siendo sometida a la acción de las presiones evolutivas (Klaas & Friesen, 2002). Los genomas mitocondriales han recibido mayor atención desde que se vio que los eventos de recombinación dentro de ellos son los responsables de los sistemas CMS (Engelke *et al.*, 2004). Se han sintetizado primers que permiten la identificación de los tres tipos de citoplasmas. Los genomas mitocondriales de las plantas son capaces de tolerar ciertos reajustes que afectan realmente a la estructura de genes, los cuales generan nuevos genes recombinantes que parecen estar implicados en la androesterilidad citoplasmática (Bailey-Serres *et al.*, 1986; Dewey *et al.*, 1986.; Young & Hanson, 1987 citados por Palmer & Herbon, 1988). Varios estudios empíricos recientes cuestionan la aparente simplicidad de la baja tasa de mutación de la herencia materna asociada a la transmisión de la CMS y la mutación (McCauley & Olson, 2008).

En 2003, Engelke *et al.*, realizaron un trabajo para determinar estos citoplasmas utilizando dos tipos de marcadores diferentes, *cob* y *orfA501*. La utilización de los marcadores *cob* permite distinguir las plantas con citoplasma CMS-S, que amplifican bandas de 414pb, de las plantas con citoplasma N o CMS-T; sin embargo no permite diferenciar entre estos dos últimos ya que para ambos la banda de amplificación obtenida es de 180 pb. Por otro lado el marcador *orfA501* permite reconocer aquellos individuos con citoplasma N dado que éstos no amplifican pero no permite distinguir entre CMS-S y

CMS-T ya que para ambos casos se obtienen bandas de 473 pb. La combinación de los marcadores *cob* y *orfA501* permite distinguir entre los tres tipos de citoplasmas en las plantas; por un lado se diferencian los CMS-(S) de los CMS-(T) y citoplasmas-(N) (*cob*) y por el otro se diferencian estos dos últimos (*orfA501*) (Fig 4.). Dado que estos marcadores, *cob* y *orfA501*, tiene temperaturas de annealing diferentes, 53°C y 60°C, respectivamente (Engelke *et al.*, 2003) no es posible trabajar con ambos en la misma reacción de PCR, es decir que necesariamente se deben hacer dos reacciones, una para cada marcador.

En 2009, Kim *et al.*, desarrollaron un marcador molecular basado en la organización quimérica de un gen (*orf725*). Éste permite diferenciar entre los tres tipos de citoplasmas de cebollas. El diseño del mismo consta de un primer común (MK-F) que se une a la secuencia de codificación *coxI* y dos primers más que se unen a regiones únicas para *orf725* (MK-R1) o *coxI* (MK-R2). Como resultado de la amplificación con este marcador se obtiene una sola banda de 833 pb para citoplasma N correspondiente a *coxI*, debido a que el gen *orf725* existe en un nivel indetectable; los CMS-T son detectados por la presencia de dos bandas, una de 833 pb y otra de 628 pb correspondientes a la amplificación de *coxI* y *orf725*; y en el caso de los CMS-S se obtiene una sola banda de 628 pb correspondiente a *orf725* debido al número relativamente bajo de copia *coxI* y la presencia frecuente de la variante inactiva del mismo (Fig.4). Es un económico y eficiente marcador molecular ya que permite distinguir los tres tipos de citoplasmas en una sola reacción de PCR (Kim *et al.* 2009).

La PCR se realizó bajo las condiciones descritas en los papers de Engelke (2004) para los genes *cob* y *orfA501* y Kim (2009) para el gen *orf725*.

Las secuencias de los primers utilizadas son:

- *cob*:
 - (S)- específico: 5' GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT 3'
 - (N)- específico: 5' TCTAGATGTCGCATCAGTGAATCC 3'
 - primer común: 5' CTTTTCTATGGTGACAACCTCTT 3' (Engelke 2004).
- *orfA501*:
 - 5' ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC 3'
 - 5' CCAAGCATTGGCGCTGAC 3' (Engelke 2004).
- *orf725*:
 - MK-F 5' CATAGGCGGGCTCACAGGAATA 3'
 - MK-R1 5' AATCCTAGTGCCGGGTTTCT 3'
 - MK-R2 5' CAGCGAACTTTCATTCTTTCGC 3' (Kim 2009)

La electroforesis de las amplificaciones se realizó en geles de agarosa 1.5% en 100mL de TBE 1X y se corrieron durante 120 minutos a 90V. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de UV y se fotografiaron.

IV. Resultados

El análisis de viabilidad de polen no pudo realizarse en todos los individuos dado que algunas de las plantas de la población UR9719 ya habían sufrido dehiscencia cuando se recolectaron anteras. A algunas plantas se les hizo observación y disección de las anteras bajo lupa. En ellas se encontró nula a escasa producción de polen, y ausencia de la dehiscencia longitudinal que ocurre naturalmente (observaciones de G. Speroni). Posteriormente, se realizó el test FDA que confirmó que esas plantas no produjeron polen viable. Como se observa en la Figura 7, existe una notoria diferencia entre el brillo y tamaño de los granos de polen viables. Los granos de polen viables son de mayor tamaño y brillan intensamente, mientras que los no viables son amorfos y sin brillo. Los resultados obtenidos de viabilidad analizados con tinción FDA se muestran en la Tabla 1. En total, se analizaron 10 de las 12 plantas, de las cuales 8 se confirmaron como androestériles y 2 como fértiles. Las plantas control, 39 y 141, también fueron sometidas al análisis con FDA, dando como resultado polen viable. Como se observa en la Tabla 1, las plantas 5 y 128 presentaron alrededor del 50% de los granos de polen viables, mientras que dentro de las 8 restantes, la 30, 103, 131 y 197 poseían el 100% del polen inviable y las plantas 84, 118, 129 y 133 no presentaron polen. Esta técnica nos aportó mayores indicios de posible presencia de sistemas CMS en la población UR9719.

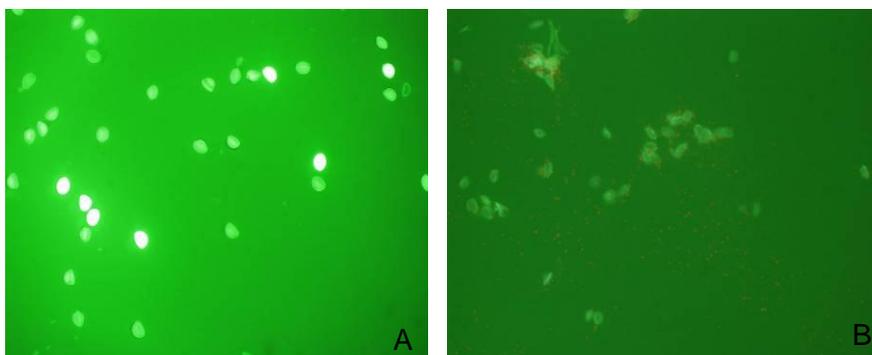


Fig 7. Determinación de la viabilidad del polen en individuos con citoplasma T utilizando tinción con FDA. (A) individuo fértil. (B) individuo androestéril.

Las figuras 8 y 9 muestran extracciones de ADN de las plantas de la población local UR9719 (Fig. 8A), de cultivares comerciales (Fig. 8B) y de los materiales del programa de mejoramiento de familias de medios hermanos de INIA (Fig. 9).

Tabla 1. Viabilidad de polen para los genotipos potencialmente androestériles de la población local UR9719 mantenidos en maceta, evaluados en la floración, noviembre-diciembre 2008, reacción fluorocromática (FCR). S/D sin dato

Planta	Floración	Observaciones	Porcentaje de viabilidad	Viabilidad de polen
5	tardía	Presencia de polen viable (D. Musso)	53,3%	Fértil
30	tardía	Polen no viable (D. Musso)	0%	Nula (androestéril)
51	tardía	S/D	-	S/D
84	intermedia	Sin polen (observación G. Speroni),	-	
103	tardía	Polen no viable (D. Musso)	0%	Nula (androestéril)
118	temprana	Sin polen (observación G. Speroni),	-	
119	intermedia	S/D	-	S/D
128	intermedia	Presencia de polen viable (D. Musso)	50,6%	Fértil
129	temprana	Sin polen (observación G. Speroni),	-	
131	intermedia	Polen no viable (D. Musso)	0%	Nula (androestéril)
133	temprana	Sin polen (observación G. Speroni),	-	
197	tardía	Polen no viable (D. Musso)	0%	Nula (androestéril)

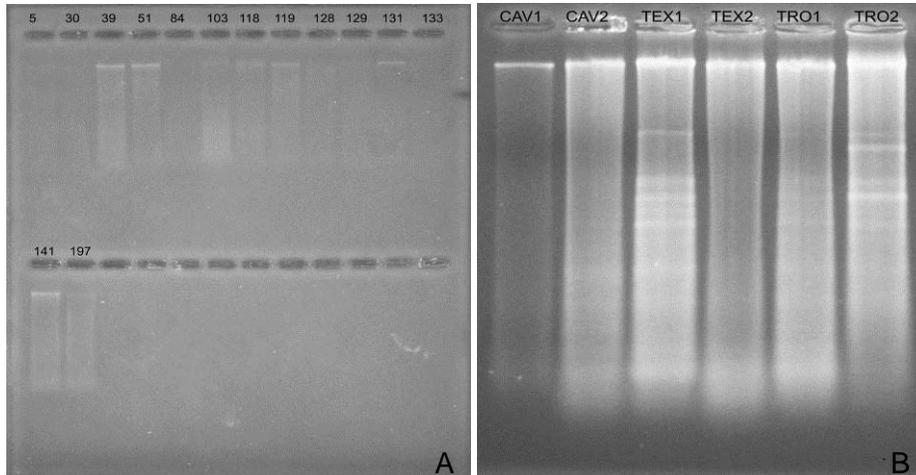


Fig 8. Geles de agarosa 0.8%, teñidos con bromuro de etidio. (A) extracción de ADN de las plantas de la población UR9719. (B) extracción de ADN de tres de los cultivares comerciales Cavallier, Texas Early Grano 502 y Topical respectivamente repetidos dos veces.

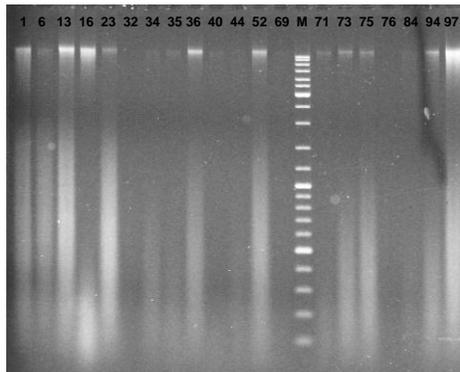


Fig 9. Extracción de ADN de las plantas de medios hermanos provenientes de INIA Las Brujas. Los números corresponden a las plantas identificadas con los mismos. La M es marcador de peso molecular Gene Ruler utilizado para ver la calidad del gel.

En la figura 10 se observan las amplificaciones resultantes de las PCR con los marcadores moleculares *cob* y *orfA501*, para las plantas de la población UR9719 y los cultivares comerciales. El análisis conjunto de ambos marcadores moleculares permite caracterizar los tipos de citoplasmas de cada planta, lo que no es posible si se trabaja con uno solo de ellos. Para las mismas, también se les realizó el análisis con el marcador *orf725* (Fig. 11) el cual permite determinar los tres tipos de citoplasmas. Los resultados obtenidos con la utilización de los tres marcadores fueron congruentes. De esta manera

se pudo determinar la existencia de algunos cultivares comerciales con citoplasmas androésteriles de tipo S (Primavera, H9, Granex Hybrid 33 y Cavallier) o T (Allegro y Tropical), además de la presencia de cultivares con citoplasma tipo N (Super Early Shugyoku E, Presto y Texas Early Grano 502). Por otro lado, las plantas analizadas de la población local UR9719, presentaron todas citoplasma de tipo T, incluso aquellas que presentaron polen viable en el análisis con FDA y las utilizadas como controles positivos ya que producían semillas. El resultado del análisis con los tres marcadores moleculares se resume en la Tabla 2.

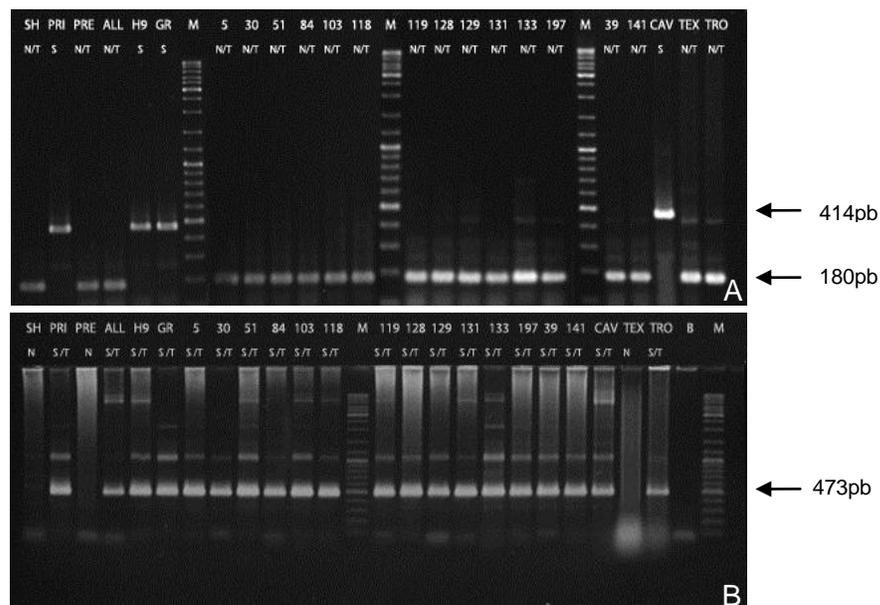


Fig 10. Amplificación por PCR de las regiones A) *cob* y B) *orfA501*, en individuos de la población UR9719 y algunos cultivares comerciales. B corresponde al control negativo. M es el marcador de peso molecular Gene Ruler utilizado para para determinar el tamaño de las bandas obtenidas. A la derecha se muestra el tamaño de las bandas adquiridas.

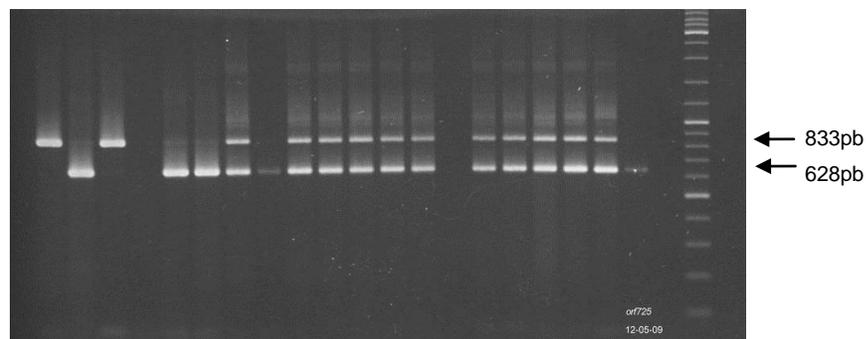


Fig 11. Amplificación por PCR de la región *orf725* en individuos de la población UR9719 y algunos cultivares comerciales. Los carriles marcados con una X corresponden a fallas en la amplificación. M es el marcador de peso molecular Gene Ruler utilizado para para determinar el tamaño de las bandas obtenidas. A la derecha se muestran los tamaños de las bandas

Tabla 2. Distribución de los diferentes tipos de citoplasmas CMS-(S), CMS-(T) y citoplasma –N representados con las letras S, T y N respectivamente obtenidos con los marcadores moleculares *cob*, *orfA501* y *orf725*, para las plantas de la población UR9719 y los cultivares comerciales

Accesión	<i>cob</i>	<i>orfA501</i>	<i>orf725</i>
Super Early Shugyoku E	N/T	N	N
Primavera	S	S/T	S
Presto	N/T	N	N
Allegro	N/T	S/T	T
H9	S	S/T	S
Granex Hybrid 33	S	S/T	S
5	N/T	S/T	T
30	N/T	S/T	T
51	N/T	S/T	T
84	N/T	S/T	T
103	N/T	S/T	T
118	N/T	S/T	T
119	N/T	S/T	T
128	N/T	S/T	T
129	N/T	S/T	T
131	N/T	S/T	T
133	N/T	S/T	T
197	N/T	S/T	T
39	N/T	S/T	T
141	N/T	S/T	T
Cavallier	S	S/T	S
Texas Early Grano 502	N/T	N	N
Tropical	N/T	S/T	T

El análisis de las 20 familias de medios hermanos, provenientes de INIA Las Brujas, con el marcador molecular *orf725* muestra que existe diversidad tanto en el número como en el tipo de citoplasmas presentes (Fig 12.). El mismo evidencia un alto porcentaje de familias que poseen citoplasma androestéril: las familias 16, 32, 35, 36, 69, 71, 76, 94 y 97 presentaron CMS-S (45%), las familias 37, 44, 52, 73, 75 y 84 presentaron CMS-T (30%), mientras que solo 5 familias (1, 6, 13, 23 y 40) presentaron citoplasma N (25%) (Fig. 13).

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos para cada línea.

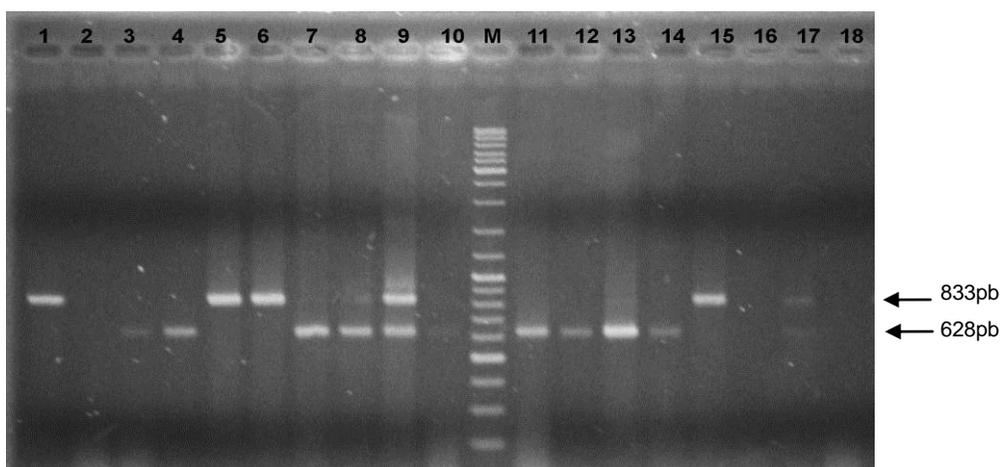


Fig 12. Amplificación por PCR de la región *orf725* en individuos híbridos con uno de sus progenitores proveniente del cultivar comercial "Rojo Duro". De cada línea se amplificaron 2 plantas correspondientes a: 1-2 línea 13; 3-4 línea 16; 5-6 línea 23; 7-8 línea 32; 9-10 línea 34; 11-12 línea 35; 13-14 línea 36; 15-16 línea 40; y 17-18 línea 44. El carril identificado con una M corresponde al Marcador de Peso Molecular. Las líneas que amplificaron 628pb poseen CMS-S, las que amplificaron 833pb poseen citoplasma N, y las que amplificaron ambas poseen CMS-T.

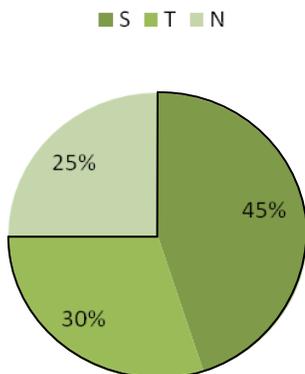


Fig 13. Porcentaje obtenido en la amplificación con el marcador *orf725* de los tres tipos de citoplasmas N, S y T de las 20 familias de híbridos provenientes de INIA Las Brujas. La fracción marcada con negro corresponde al total de (75%) de citoplasmas androestériles encontrados.

Tabla 3. Distribución de los diferentes tipos de citoplasmas CMS-(S), CMS-(T) y citoplasma - N obtenidos con el marcador molecular *orf725*, para los híbridos provenientes de INIA Las Brujas

Línea	Citoplasma
1	citoplasma - N
6	citoplasma - N
13	citoplasma - N
16	CMS-(S)
23	citoplasma - N
32	CMS-(S)
34	CMS-(T)
35	CMS-(S)
36	CMS-(S)
40	citoplasma - N
44	CMS-(T)
52	CMS-(T)
69	CMS-(S)
71	CMS-(S)
73	CMS-(T)
75	CMS-(T)
76	CMS-(S)
84	CMS-(T)
94	CMS-(S)
97	CMS-(S)

V. Discusión

Las células son permeables al ester no polar fluorogénico FDA, que dentro de las células es hidrolizado por esterases liberando de esta forma fluoresceína. La fluoresceína es un compuesto polar que no sale fácilmente de la célula intacta. Como resultado se acumula en la célula y es desdoblado enzimáticamente produciendo una fluorescencia verde brillante bajo la luz ultravioleta (UV). En las células con membranas dañadas, la fluoresceína se escapa tan rápido como la FDA entra a la célula, por lo que las células no fluorescen (Dankberg & Persidsky, 1976). En este trabajo, el análisis de plantas de la población UR9719 con la técnica FCR mostró que además de los valores positivos esperados para las dos plantas control, se obtuvieron valores positivos, en un 50% aproximadamente, para las plantas 5 y 128, que se habían presentado a priori, como posibles plantas androestériles. Esto podría suceder ya que pueden ocurrir diferentes grados de daño celular que alteren o no la permeabilidad de la membrana celular (Dankberg & Persidsky, 1976). Esta es una clara desventaja de este tipo de test ya que puede dar falsos positivos. Por lo tanto, si bien este análisis es sencillo de realizar y nos da una primera percepción de lo que sucede respecto a la esterilidad de una planta, es necesario realizar otros estudios para la confirmación.

En cambio, la PCR permite la identificación rápida y segura del carácter citoplasmático de las plantas pequeñas (Engelke & Tatlioglu, 2003). En este trabajo la amplificación con los tres marcadores moleculares utilizados *cob*, *orfA501* y *orf725*, arrojaron datos precisos y congruentes sobre las plantas del cultivar UR9719 y cultivares estudiados (Tabla 2.). Tanto los 12 individuos identificados primeramente como posibles androestériles, como los dos controles positivos presentaron citoplasma androestéril de tipo T. Estos datos concuerdan con otros obtenidos en la región respecto a la alta frecuencia de los sistemas CMS-T. Las variedades Bola Precoce y Crioula de Brasil presentaron, además de citoplasmas normales, sistemas androestériles, siendo la gran mayoría del tipo CMS-T y tan solo unos pocos del tipo CMS-S (Lopes *et al.*, 2006). Por su parte, algunos de los cultivares estudiados presentaron citoplasma normal, otros CMS-S y otros CMS-T. El análisis con marcadores permite determinar la existencia de fuentes de androesterilidad en esta población local de Uruguay. El sistema de androesterilidad CMS-S se ha utilizado durante mucho tiempo. En un trabajo realizado con variedades criollas

de cebollas procedentes de Argentina y Brasil, los resultados obtenidos mostraban únicamente cultivares con citoplasma normales y/o con CMS-S (Lopes *et al.*, 1999). Sin embargo, los datos de CMS-T eran raros, ya que hasta 2003 no era posible distinguir entre los citoplasmas N y CMS-T por métodos moleculares (Lopes *et al.*, 2006).

Dado que todos los individuos de la población UR9719 presentaron citoplasma de tipo T, incluso aquellos que mostraron fluorescencia cuando fueron sometidos a la técnica FCR, podemos inferir que estos últimos poseen el gen nuclear restaurador de la fertilidad. Los cultivares que muestran diferentes proporciones de citoplasmas androestériles, probablemente contengan también genes de restauración de la androesterilidad en altas frecuencias que permiten la producción de semilla fértil. Es probable que las poblaciones criollas tengan genes de restauración de la androesterilidad que permiten la producción de semilla fértil. Los individuos identificados como androestériles por ambos análisis, FDA y marcadores moleculares, probablemente carecen de estos genes nucleares de restauración y serán de utilidad para programas de mejoramiento. Las características agronómicas favorables de las PL son de gran valor para el mejoramiento genético que hace uso del germoplasma local aprovechando su adaptación (Galván *et al.*, 2005). Con la identificación de plantas androestériles, se pueden realizar cruzamientos dirigidos para seleccionar dichas características agronómicas.

Los resultados obtenidos del análisis de las 20 familias de medios hermanos, provenientes de INIA Las Brujas, son congruentes con la constitución genética inferida para los materiales parentales y el procedimiento por el cual se obtuvieron las líneas analizadas. En un trabajo anterior se encontró en una muestra de 20 individuos de "INIA Colorada" un 16% de plantas con citoplasma normal (N) y un 84% de plantas con citoplasma de androestéril de tipo T (Musso *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta, que "INIA Colorada" es un cultivar producido a partir de una población local del sur por selección masal (Vilaró & Rodríguez, 2005), podemos inferir la presencia de individuos con androesterilidad de tipo T de la cual surgió. Por lo tanto, la utilización de estos progenitores en la producción de dicho cultivar puede haber contribuido al citoplasma de tipo CMS-T en estas líneas. Por otro lado, si bien no hemos analizado individuos del cv. "Rojo Duro", al tratarse de un híbrido comercial, es probable que su constitución citoplasmática sea androestéril de tipo S. En base a la ausencia de citoplasma de tipo S y al porcentaje de cada uno de los otros dos tipos de citoplasmas presentes en "INIA

Colorada”, y a la presencia asumida de citoplasma CMS-S en todos los individuos de la población “Rojo Duro” original, en el cruzamiento entre ambos cultivares, esperaríamos que aproximadamente el 50% de la progenie presentara citoplasma de tipo CMS-S, un alto porcentaje de citoplasma de tipo CMS-T y una baja proporción restante de citoplasma normal. El análisis de la progenie del cruzamiento anteriormente mencionado, indica que un 45% de las líneas estudiadas tienen linajes maternos de tipo CMS-S atribuibles al cv. “Rojo Duro” en la población mezcla original, mientras que el restante 55% de los linajes se originan en individuos de “INIA Colorada”, del cual el 25% corresponde a individuos con citoplasma normal y el restante 30% a individuos con sistema androestéril de tipo CMS-T. Por lo tanto existe una alta correspondencia entre las proporciones esperadas y observadas de tipos citoplasmáticos.

Finalmente, 75% de las 20 líneas presentan citoplasmas capaces de producir androesterilidad. Los individuos fenotípicamente androestériles identificados ,probablemente carecen de genes nucleares restauradores, por lo que pueden ser de utilidad para su incorporación como madres en cruzamientos dirigidos para la selección de genes en programas de mejoramiento. A su vez, podría reducirse la frecuencia de individuos androestériles en generaciones futuras seleccionando preferentemente individuos descendientes de las líneas con citoplasma N.

VI. Bibliografía

- Allard R.W. (1980) Principios de la mejora genética de las plantas. 4^a ed. Omega S.A., Barcelona, España.
- Brewster, J.L. (2008). Onions and Other Vegetable Alliums. 2^a CAB Int., Wallingford, Oxon, UK. 455pp.
- Budar, F., Pelletier, G. (2001) Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. C. R. Life Sciences 324:543–550.
- Campelo, E., Arboleya, J. 2005. Actualidad de la producción de cebolla en Uruguay. In: *Tecnología para la producción de cebolla*. Arboleya, J. (ed), INIA, Uruguay. Boletín de Divulgación 88: 1-15.
- 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
- Dankberg, F., Persidsky, MD. (1976) A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. Cryobiology: 13:430-432
- Doyle, J.J., Dickson E.E. (1987) Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. Taxon: 36: 715-722.
- Engelke, T., Agbicodo E., Tatlioglu T. (2004) Mitochondrial genome variation in *Allium ampeloprasum* and its wild relatives. Euphytica 137: 181-191
- Engelke, T., Tatlioglu, T. (2003) A PCR marker system for monitoring the frequencies of normal and sterility inducing cytoplasm types in German chive varieties. Plant Breeding: 122: 467–472
- 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

- Fritsch, R.M., Friesen N. (2002). Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch, H.D., Currah L. (Eds.). *Allium crop science: recent advances*. CABI Publishing, p.5-30.
- Galván, G., González, H. (1992). Prospect for onion breeding in Uruguay. *Onion Newsletter for the Tropics* 4:24-25.
- Galván, G., Sollier, S. (1994). Ocurrencia de androesterilidad en cebollas de Uruguay. V Congreso Nacional de Horticultura. Montevideo, p.25.
- Galván, G. (2000) La adaptación productiva del germoplasma local de cebolla y morrón su utilización en el desarrollo de cultivares. Universidad de la República Facultad de Agronomía Centro Regional Sur, Informe final.
- Galván, G., González, H., Vilaró F. (2005) Estado actual de la investigación en poblaciones locales de hortalizas en Uruguay y su utilización en el mejoramiento. *Agrociencia IX*: 115-122.
- 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 cytoplasm 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 cytoplasm of onion. *Theor Appl Genet* 101:778–782
- Havey, M.J. (2002) Genome organization in *Allium*. In: Rabinowitch, H.D., Currah, L. (Eds.), *Allium Crop Science. Recent Advances*. CABI Publishing, United Kingdom, pp. 59–79.
- Kik, C. (2002). Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. In: Rabinowitch, H.D., Currah L. (Eds.). *Allium crop science: recent advances*. CABI Publishing, pp.81-100.
- Kim, S., Lee E.T., Cho D.Y., Han T., Bang H., Patil B.S., Ahn Y.K, Yoon M.K. (2009) Identification of a novel chimeric gene, orf725, and its use in development of a molecular marker for distinguishing among three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). *Theor Appl Genet*: 118:433-441

- Klaas, M., Friesen, N. (2002). Molecular markers in *Allium*. In: Rabinowitch, H.D., Currah L. (Eds.). *Allium crop science: recent advances*. CABI Publishing, pp.159-185.
- Lacadena, J.R. (1996). *Citogenética*. 1ª ed. Computense S.A. Madrid, España
- Laser, K.D., Lersten, N.R. (1972). Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male-sterile angiosperms. *Bot. Rev.* 38:425–454.
- Lopes, D., Galmarini, C.R., Havey, M.J. (1999). Cytoplasm of elite open-pollinated onions from Argentina and Brazil. *Allium Improvement Newsletter* 9:1-4.
- Lopes, D., Anthonisen, D., Fernandes, C.A., Rodrigues, V. (2006) Caracterização molecular citoplasmática em cebola nas cultivares Bola Precoce e Crioula. In: 46 Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. *Horticultura Brasileira*: 24:1484-1487.
- McCallum, J. (2007a) Onion. In: Kole C. (Ed). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 5: 331-347.
- McCallum, J., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Kenel, F., Davis, S., Butler, R., ScheVer, J., Jakse, J., Havey, MJ. (2007b) Genetic mapping of sulfur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency. *Theor Appl Genet*: 114:815–822
- McCauley, D.E., Olson, M.S. (2008) Do recent findings in plant mitochondrial molecular and population genetics have implications for the study of gynodioecy and cytonuclear conflict? *Evolution* 62: 1013-1025.
- Monteverde, E., Speranza, P., Galván, G. (2009) Análisis preliminar de la diversidad genética en una colección de variedades criollas de cebolla del Uruguay. *INIA Serie de Actividades de Difusión Nro. 564*: 21-26
- Musso, D., Monteverde, E. Galván, G., Speranza, P. (2011) Androesterilidad genético-citoplasmática en el germoplasma local de cebolla y su utilización para la producción de híbridos comerciales. *INIA Serie Actividades de Difusión 640*: 26-31.
- Palmer, J.D., Herbon L.A. (1988) Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution* 28: 87-97.

- Pathak,C., Gowda, R. (1994) Breeding for the development of onion hybrids in India: problems and prospects. *Acta Horticulturae*: 358:239-242.
- Pike, LM. (1986) Onion Breeding. In: *Breeding Vegetable Crops*. Basset, M.J. (ed.), Connecticut: AVI Publishing Co., p. 357-394.
- Poehlman, J.M. (1987) Mejoramiento genética de las cosechas. 10ª ed. Limusa., México.
- Porta, B. (2010) Variabilidad, heredabilidad y correlaciones de características de interés agronómico en una población local de cebolla (*Allium cepa* L.) y en sus líneas S1. Tesis de Grado. UdelaR, Facultad de Ciencias, Montevideo. 73p.
- Schnable, P.S., R. P.Wise, R.P. (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant. Sci*: 3:175–180.
- Shivanna, K.R., Heslop-Harrison, J. (1981) Membrane State and Pollen Viability. *Ann Bot*: 47:759-770
- Shivanna, K.R., Rangaswamy, N.S. (1992). *Pollen Biology: A Laboratory Manual*. Springer-Verlag. 119 pp.
- Shigyo, M., Kik, C. (2008). Onion. In: *Vegetables, Vol. 2. Handbook of Plant Breeding*. Prohens, J., and Nuez, F., (eds). Springer Verlag. Berlin. p.121-162.
- Van Raamsdonk, L. W. D., Ensink, W., van Heusden, A.W.M., Vrieling-van Ginkel, M., Kik, C. (2003) Biodiversity assessment based on cpDNA and crossability analysis in selected species of *Allium* subgenus *Rhizirideum*. *Theor. Appl. Genet.* 107:1048-1058.
- Vilaró, F., Vicente, E., Pereyra, G., Rodríguez, G. (2005). Cultivares y mejoramiento genético en cebolla. In: *Tecnología para la producción de cebolla*. Arboleya, J. (ed), INIA, Uruguay. Boletín de Divulgación 88, p. 31-42.
- Vilaró, F., Rodríguez, G. (2005). Cultivares y mejoramiento genético en cebolla. INIA Serie Actividades de Difusión 405: 2-7