



“Por un Desarrollo  
Agrario  
Integral y Sostenible”

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**Maestría en Ciencias en Mejoramiento Genético**

**Trabajo de Tesis**

**Divergencia fenotípica y genotípica en siete  
poblaciones de cebolla (*Allium cepa* L. var.  
Sebaqueña), colectadas en Matagalpa y  
Jinotega, Nicaragua 2015**

**Autor**

**Ing. Sury Zamora Mayorga**

**Asesores**

**Dr. Oscar Gómez Gutiérrez**  
**Dr. Oswalt R. Jiménez Caldera**

**Managua, Nicaragua**  
**Noviembre, 2018**





“Por un Desarrollo  
Agrario  
Integral y Sostenible”

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**Maestría en Ciencias en Mejoramiento Genético**

**Trabajo de Tesis**

**Divergencia fenotípica y genotípica en siete poblaciones de cebolla (*Allium cepa* L. var. Sebaqueña), colectadas en Matagalpa y Jinotega, Nicaragua 2015**

**Autor**

**Ing. Sury Zamora Mayorga**

**Asesores**

**Dr. Oscar Gómez Gutiérrez  
Dr. Oswalt R. Jiménez Caldera**

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador como requisito final para optar al grado de Maestro en Ciencias

**Managua, Nicaragua  
Noviembre, 2018**



Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

***Maestro en Ciencias en Mejoramiento Genético***

---

Miembros del Tribunal Examinador

---

Presidente (Grado académico y nombre)

Secretario (Grado académico y nombre)

Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: UNA-Sala Magna FAGRO, 22 de Noviembre del 2018

## INDICE DE CONTENIDO

<b>SECCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
2.1. General	4
2.2. Específicos	4
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
3.1. Ubicación y fecha del estudio	5
3.2. Diseño metodológico	6
3.3. Colecta de las poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña	6
3.4. Manejo del experimento	7
3.5. Análisis molecular	8
3.6. Amplificación y visualización de fragmento de ADN de las variantes alélicas ANS	9
3.7. Variables evaluadas	10
3.8. Procesamiento de datos y análisis estadístico	12
3.8.1. Variable de rendimiento	12
3.8.2. Variables morfológicas	12
3.8.3. Variable molecular	12
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>13</b>
4.1. Comportamiento productivo de siete poblaciones de cebollas variedad Sebaqueña	13
4.2. Comparaciones de frecuencias fenotípicas de ocho variables morfológicas en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña	16
4.3. Identificación de variantes alélicas reflejados en el gen ANS en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña	22
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>27</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b>	<b>28</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>33</b>

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios nuestro señor por darme fortaleza, sabiduría de finalizar esta etapa de mi vida.

Al Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) quien me dio la oportunidad de progresar intelectualmente para beneficio y servicio de Nicaragua.

A mis asesores Doctor Oswalt R. Jiménez y Doctor Oscar Gómez por haberme apoyado en el análisis estadístico y revisión de la presente tesis.

De igual manera quiero brindarle mis más profundas muestras de agradecimientos a la Masters en Ciencia Andrea Zamora por asesorarme en las técnicas de biología molecular, extracción de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), optimización de marcadores moleculares mediante la técnica Nested PCR (Redacción en cadena de la polimerasa) y lectura de fragmentos.

Al Ingeniero Agrónomo Francisco Blandón por haberme apoyado en la colecta de semilla botánica de cebolla en las principales zonas productoras del país.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo

Ing. Sury Zamora Mayorga

## **DEDICATORIA**

*A mi madre Xiomara Mayorga Hernández.*

*A mi tía Eugenia Mayorga.*

*A mis hermanos Dirck y Marineysi.*

Ing. Sury Zamora Mayorga

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Ubicación de colectas de semilla botánica de cebolla variedad Sebaqueña.	6
2	Marcadores moleculares tipo micro-satélites (SSR) utilizados para la identificación de variantes alélicas del gen ANS en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.	9
3	Análisis de varianza para la variable rendimiento expresada por el peso promedio de bulbo (g) en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.	13
4	Medias y categorías estadísticas para la variable rendimiento promedio de bulbos (g), de las poblaciones procedentes de Matagalpa y Jinotega.	15
5	Resultado de la prueba exacta de Fisher (valores p) para la comparación de frecuencias fenotípicas de ocho variables morfológicas en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.	17

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Principales factores climáticos registrados en el departamento de Matagalpa, periodo 2015.	5
2	Agrupamiento de siete poblaciones de cebolla en base a las frecuencias de ocho variables morfológicas utilizando los valores p según la prueba exacta de Fisher.	18
3	Presencia de los alelos ANS en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña, colectadas en los departamentos de Matagalpa y Jinotega.	22
4	Presencia del alelo ANS-L en individuos de la población de Suní (a), ANS-p en la población de San Marcos (b) y ANS-h1 en la población de Terrabona (c), utilizando marcadores Co-dominante SSR micro-satélite.	23



## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Diseño del experimento establecido en el Centro Experimental, San isidro Matagalpa ciclo postrera 2015.	33
2	Forma de medir el extremo del pseudo-tallo.	34
3	Clasificación de forma del extremo del tallo.	34
4	Clasificación de formas de la sección longitudinal del bulbo.	35
5	Características de las progenies de bulbos latentes de la variedad Sebaqueña.	36
6	Características de las progenies de bulbos no latentes de la var. Sebaqueña.	36
7	Evaluación e identificación de variantes alélicas de la coloración de bulbos en siete poblaciones de cebolla var. Sebaqueña.	37
8	Recuento total y porcentajes de los alelos ANS-L, ANS-p- y ANS-h1 presente en las siete poblaciones de cebolla, var. Sebaqueña.	38

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo documentar la variabilidad genotípica y fenotípica de siete poblaciones de cebolla var. Sebaqueña, colectadas en los departamentos de Matagalpa y Jinotega. El experimento se estableció en el municipio de San Isidro-Matagalpa en el año 2015 bajo un Diseño de Bloques Completos al Azar (BCA). Por otro lado, el análisis molecular se realizó en el laboratorio de Agro-biotecnología del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA), Managua. Se utilizó el sistema estadístico R, Core Team, versión 3.4.0. (2017), para comparar las frecuencias de las variables morfológicas a través de una prueba exacta de Fisher con valores p simulados en 10,000,000 réplicas. Para estimar el potencial productivo de las siete poblaciones se realizó un análisis de varianza, usando el paquete Agricolae de R versión 3.4.0. Las tonalidades del color rojo en los bulbos se determinaron mediante el peso molecular de cada alelo, haciendo uso de una escala molecular (Gold Biotechnology) de 50 a 1000 pb y de tres controles positivos evaluados, asimismo. Los resultados mostraron significancias en las expresiones fenotípicas, el análisis de varianza mostró que las poblaciones del departamento de Jinotega presentaron mejores rendimientos de 12.46 a 12.82 t. ha<sup>-1</sup>. Los marcadores identificaron tres variantes alélicas: (ANS-L) con frecuencia de 80 a 90 %, seguido por el alelo ANS-p 10 a 20% y el tercer alelo ANS-h1 con un 5%. De acuerdo con los resultados, estas poblaciones presentan un alto potencial para la mejora genética.

**Palabras clave:** Divergencia fenotípica, color de bulbo, segregación, síntesis de antocianina, *Allium cepa*, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

The present study aimed to document the genotypic and phenotypic variability of seven populations of onion var. Sebaqueña, collected in the departments of Matagalpa and Jinotega. The experiment was established in the municipality of San Isidro-Matagalpa in 2015 under a Random Complete Block Design (BCA). On the other hand, molecular analysis carried out in the Agro-biotechnology laboratory of the National Agricultural Research Center (CNIA), Managua. The statistical system R, Core Team, version 3.4.0 used. (2017), to compare the frequencies of the morphological variables through an exact Fisher test with p-values simulated in 10,000,000 replicates. To estimate the productive potential of the seven populations, an analysis of variance performed, using the Agricolae package of R version 3.4.0. The tonalities of the red color in the bulbs were determined by the molecular weight of each allele, making use of a molecular scale (Gold Biotechnology) of 50 to 1000 bp and of three positive controls evaluated as well. The results showed significance in the phenotypic expressions, the analysis of variance showed that the populations of the department of Jinotega, presented better yields of 12.46 to 12.82 t. ha<sup>-1</sup>. The markers identified three allelic variants: (ANS-L) with frequency of 80 to 90%, followed by the allele ANS-p 10 to 20% and the third allele ANS-h1 with only 5%. According to the results, these populations have a high potential for genetic improvement.

**Key words:** Phenotypic divergence, bulb color, segregation, anthocyanin synthesis, *Allium cepa*, molecular markers.

## I. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.), es una de las hortalizas más antiguas conocida por la humanidad, cultivada por más de 4,700 años. En la actualidad es cultivada y consumida en todo el mundo (Rabinowitch *et al.*, 2002), debido al sabor y valor nutricional, alto contenido de vitamina A y C, ácido fólico, fuente potencial de fructano y flavonoides. (Shin *et al.*, 2009, Longo *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2005) y utilizada como condimento y en la medicina. Según la FAO (2014), a nivel mundial se cultivan aproximadamente 3.34 millones de hectáreas destacándose como los países con mayor área sembrada Albania, Alemania, Antigua Bermuda, Arabia Saudita y Argentina.

En Nicaragua se cultivan aproximadamente 1,743 ha<sup>-1</sup> con rendimientos promedios de 7.14 t. ha<sup>-1</sup>, siendo el 90% de la producción procedente de la zona norte del país especialmente de los departamentos de Matagalpa, Jinotega y Estelí (INIDE, 2011), a pesar de que se produce en diferentes zonas del país, cada año se realizan importaciones de semilla y bulbos frescos para abastecer la demanda nacional. MIFIC (2008) reporta introducciones de 19.8 toneladas y un consumo per cápita de 3.53 kg por año. Una de las principales limitantes que no ha permitido el desarrollo de nuevas variedades de cebolla de polinización libre y la autosostenibilidad de semillas en Nicaragua, han sido las condiciones climáticas. Según Muñoz *et al.*, (2004), las altas temperaturas y los días cortos afectan el desarrollo bulbos, floración y restringen la producción de semilla.

A pesar que las condiciones climáticas del país no son las idóneas para el cultivo de cebolla, a finales de los 70's entidades como Misión Técnica de China-Taiwán, productores privados y el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), iniciaron los primeros pasos en el mejoramiento genético de la cebolla para la generación de variedades de polinización libre, como resultado de este esfuerzo surgió la variedad Sebaqueña generada por el INTA en el año 2005, la cual fue ampliamente difundida y adoptada por los productores cebolleros debido a su particularidad de florecer en diferentes zonas del país.

En la actualidad, muchos productores de la zona norte del país aún siguen cultivando esta variedad, realizando selección y conservación de su propia semilla para los próximos ciclos productivos según sus criterios de selección, situación por la cual ha tomado diferentes

denominaciones según la localidad donde es cultivada. Según Forno y Gómez (1995); Martínez (1997), se refieren a la variedad “Sebaqueña” como “cebolla de tallo”, “cebolla de bulbo”, “variedad mejorada”, “criolla”, “acriollada”, “original”, “latente precoz”.

De acuerdo con Martíns (2007), una misma planta cultivada bajo condiciones ambientales diferentes puede mostrar aspectos fenotípicos distintos, la cual se puede expresar tanto en un ciclo como a través de generaciones, fenómeno que se le conoce como plasticidad fenotípica (Miner *et al.*, 2005). Por otro lado, Jiménez (2001), describe que mediante la conservación *in situ* por un periodo de tiempo se logra mantener la habilidad evolutiva y adaptación continua en respuesta a cambios de condiciones ambientales.

El cultivo de la cebolla es una especie de polinización cruzada, por lo tanto, las constantes interacciones y recombinaciones ofrecen la posibilidad de realizar selección, debido a la variabilidad fenotípica que expresan los individuos de una misma población. Dicha variabilidad es de gran interés por parte de los agricultores y fitomejoradores debido a que permite la selección de caracteres fenotípicos de interés para la formación de nuevas variedades adaptables a las condiciones ambientales locales.

De acuerdo con Lescay y González (2011), la variabilidad fenotípica en cultivares de cebolla, es de gran importancia para emprender programas de mejoramiento para la generación de nuevas variedades, de igual manera el color del bulbo es un rasgo genético que se utiliza para la identificación de las mismas (El-Shafie y Davis, 1967; Clarke *et al.*, 1944; Rieman, 1931). El color rojo en los bulbos de cebolla es un carácter de importancia nutricional y económica debido a que está asociado a la pungencia y alta concentraciones de flavonoides. Estas características hacen que en Nicaragua se cultiven híbridos de bulbos color rojo como Azua, Tropicana y Red Creole. De igual manera, anualmente se importan aproximadamente 2.4 t de estos genotipos (MIFIC, 2008), destinados especialmente a mercados selectivos como los supermercados.

En este sentido, el presente estudio tiene como finalidad, documentar el comportamiento productivo de siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña, colectadas en diferentes localidades de los departamentos de Matagalpa y Jinotega; de igual manera determinar el grado de variabilidad genética en base a la identificación de variantes alélicas que codifican la

biosíntesis de antocianinas (ligado al color rojo) y fenotípicas, de acuerdo a la comparación de frecuencias de ocho variables morfológicas en cada población.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. General**

- Explicar la variabilidad fenotípica y genotípica existente en siete poblaciones de cebolla, variedad Sebaqueña y su utilidad para programas de mejoramiento genético.

### **2.2. Específicos**

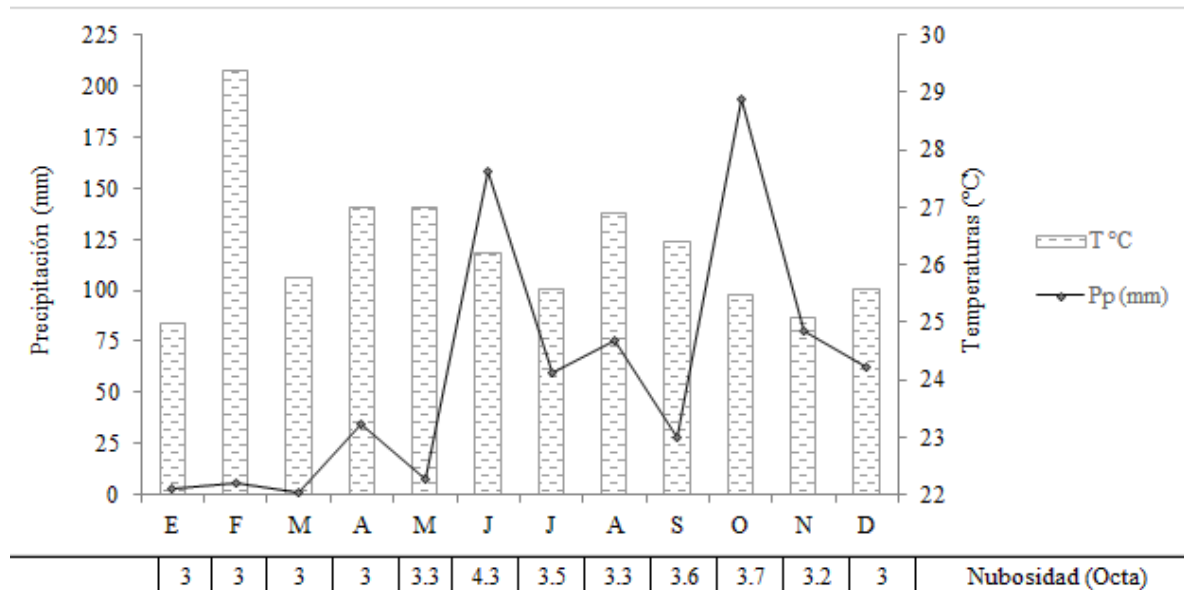
- Estimar el comportamiento productivo de siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña, colectadas en los departamentos de Matagalpa y Jinotega.
- Determinar diferencias fenotípicas entre siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña, colectadas en los departamentos de Matagalpa y Jinotega.
- Identificar variantes alélicas que codifican para la biosíntesis de antocianina y diferentes tonalidades de color rojo de bulbos, en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación y fecha del estudio

El estudio se realizó en dos etapas: La primera etapa conformada por un experimento en campo y la segunda etapa en el laboratorio.

De este modo, el experimento en campo se estableció en el ciclo de Postrera 2015 en el Centro Experimental Comandante Hugo Chávez Frías, ubicado entre las coordenadas 12° 15' de Latitud Norte y 85° 14' de longitud Oeste, en el km 197.5 carretera San Isidro-El Sauce (León) a 484 m.s.n.m. En la Figura 1, se muestran tres principales factores climáticos que prevalecieron en el departamento de Matagalpa durante el estudio (INETER, 2015).



**Figura 1.** Principales factores climáticos registrados en el departamento de Matagalpa, periodo 2015.

El experimento en el laboratorio consistió en el análisis molecular, realizado en el periodo 2015-2016 en el laboratorio de Agrobiotecnología ubicado en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA), departamento de Managua, km 14.1 carretera Norte, 3 km hacia el Sur y localizado geográficamente entre la latitud Norte 12° 08' y longitud Oeste 86° 09'.



### 3.2. Diseño metodológico

El diseño experimental en campo fue de Bloques Completos al Azar (BCA) con tres repeticiones y siete tratamientos (6 poblaciones más un testigo), como testigo se utilizó semilla, variedad Sebaqueña categoría registrada, procedente del centro experimental de San Isidro Matagalpa. La parcela experimental estuvo conformada por 48 plantas y la parcela útil por 16 plantas. La distancia entre plantas fue de 0.12 m y entre surcos de 1 m (Anexo 1).

Los tratamientos llevan el nombre de las localidades en las que fueron colectadas las semillas de cada población de cebolla Sebaqueña.

En el estudio molecular, no hubo un arreglo experimental, únicamente se tomó una muestra de cuarenta individuos por cada población colectada y se procedió a la extracción de ADN y la amplificación de los fragmentos de ADN de interés utilizando tres marcadores ligados al gen ANS responsable de la síntesis de antocianina.

### 3.3. Colecta de las poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña

La colecta del material vegetal (semilla botánica) se realizó en siete comunidades de los departamentos de Matagalpa y Jinotega, por conocer de su trayectoria histórica en la producción de bulbo y semilla de este genotipo. Por cada muestra colectada se tomaron datos generales de la finca y el productor utilizando una ficha de colecta propuesta por el INTA (2009) (Anexo 2).

**Cuadro 1.** Ubicación de colectas de semilla botánica de cebolla variedad Sebaqueña.

Poblaciones	Departamentos	Localidades	Coordenadas (UTM)	Altitud (msnm)	Distancia entre Jinotega y Matagalpa
1	Jinotega	San Marcos	0597173/1452117	724	20 Km
2	Jinotega	Suní	0597516/1454664	1001	
3	Matagalpa	San Isidro (testigo)	0588520/426090	472	
4	Matagalpa	Las Delicias	0602635/1403972	450	
5	Matagalpa	Terrabona	0612019/1408387	552	
6	Matagalpa	San Esteban	598973/1400767	402	
7	Matagalpa	El Bonete	0616663/1408459	626	

### **3.4. Manejo del experimento**

#### **3.4.1. Establecimiento del semillero**

Se seleccionó el terreno posteriormente se procedió a la limpieza de malezas y al levantamiento de un bancal de 2 x 10 m, actividad realizada de manera manual utilizando machete y azadón. De cada población se establecieron 4 surcos, los cuales comprendían alrededor de 200 plantas.

#### **3.4.2. Trasplante**

Se realizó a los 45 días después de la siembra del semillero cuando las plántulas obtuvieron de dos a tres hojas verdaderas. Las plántulas fueron desinfectadas antes del trasplante con Phyton® 20 SC a razón de 0.6 l. ha<sup>-1</sup>.

#### **3.4.3 Fertilización**

Se realizaron tres fertilizaciones, la primera a los 10 días después del trasplante (ddt) con la fórmula 12-30-10 a razón de 64.69 kg ha<sup>-1</sup> la segunda fertilización se realizó a los 25 dds con la misma fórmula a razón de 64.69 kg ha<sup>-1</sup> y la tercera se realizó a los 45 dds, con urea 46% a razón de 64.69 kg ha<sup>-1</sup>

#### **3.4.4 Control de malezas**

A los 15 días después del trasplante se realizó una aplicación de Oxifluorfen (Galigan® -24 EC) a razón 0.15 l. ha<sup>-1</sup>, para control de gramíneas; *Avena fatua* L, *Digitaria sanguinalis* L. y de hoja ancha; *Amaranthus* spp, *Portulaca oleraceae* L, *Cardus sylibum* L. posteriormente se realizaron limpieza manuales cada 15 días hasta la cosecha de los bulbos.

#### **3.4.5 Control de plagas**

Se realizó según resultados de muestreo, para el control de *Thrips tabaci* y *Agrotis ipsilon* se aplicó Spintor® y Monarca® a razón 0.25 l. ha<sup>-1</sup>. Dichos insumos se aplicaron de manera intercalada cada tres días hasta eliminar la incidencia de gusanos.

### 3.4.6 Control de enfermedades

Se realizó según los resultados de muestreos, para el control de *Brotytis* spp, *Alternaría porri* y mildiu (*Peronospora* spp) se realizaron aplicaciones de Carbendazim® y Phyton® a razón de 0.6 l. ha<sup>-1</sup> de manera intercalada.

### 3.5. Análisis molecular

Se estableció un semillero en campo en el CNIA. A los 45 días después de la siembra se seleccionó tejidos de hojas tiernas de 40 individuos por población, para un total de 280 muestras.

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo elaborado por Jiménez (2009) con algunas modificaciones. Para esto se tomaron 5 mg de tejido por cada muestra y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. A cada muestra se le agregó buffer de extracción (Tris- HCL 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM). Posteriormente se maceró el tejido usando pistilos plásticos estériles hasta homogenizar las muestras. Después de la maceración del tejido se agregó sulfato dodecil sódico (SDS) al 10% y se colocaron las muestras en una incubadora tipo baño maría a 65 °C por 10 minutos agitándola manualmente tres veces. Seguidamente, a cada muestra se le agregó Acetato de Potasio (3M) y se colocaron en una freezer a -20 °C por 20 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 minutos.

Después de la centrifugación de cada muestra se extrajo 200 µl del sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf estéril. Adicionalmente a cada muestra se agregó 100 µl de 2-propanol y luego se incubaron durante 20 minutos a -20 °C. Pasados los 20 minutos las muestras se centrifugaron nuevamente a 15,000 rpm durante 15 minutos a 5 °C. Una vez realizado el proceso de centrifugación se procedió a extraer el 2-propanol, se lavó el pellet de ADN dos veces con etanol al 70%.

Por último, el pellet de ADN de cada muestra fue secado a temperatura ambiente por 50 minutos y se les agregó 100 µl buffer TE 1 X (Tris- HCL (100 mM) pH 8.0 y EDTA (1 mM) y se conservaron en un freezer a -20 °C.

Para identificar las variantes alélicas que codifican para la biosíntesis de antocianina en los bulbos de cebolla, se utilizaron tres marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) (Cuadro 2), ligados a los alelos ANS-L, ANS-p y ANS-h1 (Kim *et al.*, 2006).

**Cuadro 2.** Marcadores moleculares tipo micro-satélites (SSR) utilizados para la identificación de variantes alélicas del gen ANS en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.

Número	Marcadores	Secuencia (‘5_al 3’_)	Alelos relacionados
1	Forward	TTTGCTCGATCGTTTAGCRGAAGAAGA	ANS-L
	Reverse	TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGCA	
2	Forward	TCTTCCTTTTGTGCTTGGAGCTGATGC	ANS-p
	Forward	ATTCTGGGATGTTACACCTTGCATGCTTC	
	Reverse	GCCACCATCTCACATCATCCACAACCT	
3	Forward	TGGTCGTACCGCTCTTGGTAAGCCTTG	ANS-h <sub>1</sub>
	Reverse	CAACAACAAATCCTTCCGCCTCGACAT	
	Reverse	ATAAGCTCCGGCGAATCGGATTTGAAC	

### 3.6. Amplificación y visualización de fragmento de ADN de las variantes alélicas del gen ANS

La amplificación de los tres marcadores se realizó utilizando Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) individuales y anidada (Nested PCR). El marcador ligado al alelo ANS-L, fue diluido a 10 pmol. Las reacciones utilizadas fueron en base a 20 µl (10 µl Master mix 2x, 2 µl marcador forward, 2 µl marcador reverse, 5 µl agua libre de nucleasas y 1 µl de ADN genómico). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® nexus GSX1, bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial 3 minutos a 94°C, 30 s. 65°C, 30 s, 72°C por 3 minutos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos en 38 ciclo.

El segundo y tercer marcador están ligados a los alelos ANS-p y ANS-h1. La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), para ambos se realizó de manera anidada utilizando un termociclador Mastercycler® nexus GSX1. La primera reacción fue en base a 20 µl (10 µl Master mix 2x, 2 µl marcador forward, 2 µl marcador reverse, 5 µl agua libre de nucleasas y 1 µl de ADN genómico), utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial 3 minutos a

94 °C, 30s. 65 °C, 30s. 72 °C por 3 minutos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Esto se realizó en 38 ciclos. Una vez finalizado el programa se procedió a realizar la segunda reacción con las mismas concentraciones y el mismo programa, pero con el segundo forward y 1µl del producto PCR obtenido en la primera reacción utilizado como plantilla de ADN genómico. El mismo procedimiento se realizó con el tercer marcador.

Al finalizar la amplificación, las muestras fueron teñidas con 4 µl de 6x loading Dye y colocadas en gel de agarosa al 1.2% (100 ml de TBE al 0.5x) teñida con 1 µl bromuro de etidio (2 µl) y colocadas dentro de una cámara de electroforesis. El proceso de electroforesis se realizó durante 90 minutos con 90 voltios, 320 amperios. Cada gel estuvo compuesto de 13 muestras que conteniendo también ADN genómico de cebolla variedad Sebaqueña, de bulbo amarillo, rojo oscuro comercial y rojo intermedio. Al finalizar la electroforesis los geles fueron colocados en un transluminador para verificar la presencia de los alelos.

### **3.7. Variables evaluadas**

#### **3.7.1. Variables morfológicas y de rendimiento**

En el estudio de campo se evaluaron ocho variables morfológicas y una de rendimiento (peso de bulbo en g). Las variables morfológicas fueron: hojas por pseudo-tallo, longitud de pseudo-tallo, diámetro del pseudo-tallo, altura de la hoja más alta, diámetro ecuatorial y diámetro polar del bulbo. Todas estas variables se tomaron como cuantitativas y posteriormente se transformaron a pseudo-cualitativas. Únicamente las variables forman del extremo del tallo y forma de la sección longitudinal del bulbo se tomaron como cualitativas, conforme a la lista del descriptor propuesto por la Unión Internacional para la Protección de la Obtención de Vegetales UPOV (2008). La cantidad de plantas muestreadas fue de 45 por cada población.

a. Número de hojas por pseudo-tallo: Se tomó a los 95 días después del trasplante, contabilizando todas las hojas desarrolladas.

b. La longitud del pseudo-tallo: Se midió a los 95 con una cinta métrica y se tomó entre el extremo superior del bulbo (que se define como el punto de inflexión del-cuello) y el punto en que surge la hoja verde más alta en el pseudo-tallo.

c. Altura de la hoja más alta: Se tomó a los 95 días después del trasplante, cuando las plantas presentaban óptimo desarrollo, seleccionando la hoja más alta de cada planta y posteriormente se procedió a medirla con una cinta métrica utilizando la escala; bajo, medio y alto.

d. Diámetro del pseudo-tallo: Se midió tres días después de la cosecha, después de ser secado a temperatura ambiente, se midió de acuerdo al punto medio del pseudo-tallo (Anexo 3).

e. Diámetro ecuatorial del bulbo: Se midió con el pie de rey al momento de la cosecha de acuerdo a la posición del diámetro ecuatorial máximo del bulbo.

f. Diámetro polar del pseudo-tallo: Se midió al momento de la cosecha, utilizando pie de rey y se tomó desde el extremo superior al extremo inferior del bulbo.

g. Forma del extremo del tallo: La medición de esta variable se realizó a los 120 días después de la siembra, cada bulbo se comparó con las imágenes bajo la escala (Anexo 4).

h. Forma de la sección longitudinal del bulbo: Esta variable se tomó a los 120 días después de la siembra, cada bulbo seleccionado se comparó bajo la escala (Anexo 5).

J. Peso del bulbo (g): Se realizó un día después de la cosecha. Antes de pesar se cortaron las hojas desde extremo inicial del pseudo-tallo y posteriormente se pesaron en una balanza digital, 15 bulbos por repetición y 45 bulbos por población

### **3.7.2. Variable molecular**

#### **Número de alelos**

La medición de los alelos se realizó utilizando una regla molecular de 100 a 1000 pb. De igual manera se utilizaron controles de ADN de bulbos de cebolla amarilla (C1), bulbos de cebolla rojo oscuro comercial (C2), bulbos de cebolla roja intermedio Sebaqueña (C3).

### **3.8. Procesamiento de datos y análisis estadístico**

#### **3.8.1. Variable de rendimiento**

Para el análisis de la variable peso promedio del bulbo, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), haciendo uso del sistema estadístico R Core Team (2017), para la separación de medias Tukey al 95%, se utilizó el paquete Agricolae R versión 3.4.0. (De Mendiburu, 2017). El modelo utilizado para estimar el comportamiento productivo y conocer el efecto de cada uno de los factores en estudio de las siete poblaciones se describe a continuación:  $y_{ijk}: \mu + \alpha_i + \theta_{(a)ij} + \beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$  donde  $\mu$ : Media general,  $\alpha_i$ : Efecto de las poblaciones por lugar de origen,  $\theta_{(a)ij}$ : Efecto de las poblaciones dentro del origen,  $\beta_{ij}$ : Efecto del bloque,  $\epsilon_{ijk}$ : Error experimental.

#### **3.8.2. Variables morfológicas**

Las variables morfológicas, se agruparon para formar un fenotipo. A través de la distribución de frecuencias, se simularon los valores de p en base a 10,000,000 réplicas, para ser comparadas entre poblaciones en base a la prueba exacta de Fisher. El análisis se realizó con el programa R Core Team (2017).

Para estimar diferencias o similitudes entre las poblaciones, se construyó un dendrograma haciendo uso del sistema estadístico MEGA versión 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016).

#### **3.8.3. Variable molecular**

Para los datos moleculares se calculó el porcentaje de presencia-ausencia de los tres alelos en estudio (ANS-L, ANS-p y ANS-h1) en las siete poblaciones, utilizando el programa (Excel 2013).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Comportamiento productivo de siete poblaciones de cebollas variedad Sebaqueña

Los resultados obtenidos a través del análisis de varianza (ANDEVA), mostraron diferencias altamente significativas ( $Pr > 0.0032$ ) en el factor población anidadas conforme al origen y diferencia significativa en el factor origen ( $Pr > 0.0273$ ), es decir que las siete poblaciones son diferentes de acuerdo a las localidades donde fueron colectadas. Por otro lado, el coeficiente de variación fue de 41.96%, resultado que muestra que existe una alta variabilidad entre las poblaciones de acuerdo al componente de rendimiento (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis de varianza para la variable rendimiento expresada por el peso promedio de bulbo (g) en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadro	Cuadrados medios	F <sub>cal</sub>	Pr(>F)
Origen	1	2346	2345.69	4.918	0.027312*
Población (O)	5	8695	1738.95	3.6459	0.003217**
Bloque	2	1951	975.73	2.045	0.310552NS
Residual	306	145950	476.96		

CV: 41.96%

Según Rodríguez *et al.*, (1971), el coeficiente de variación ha sido interpretado de diferentes maneras, grado de adaptabilidad de los genotipos en diferentes ambientes, resumiendo que un genotipo será más estable, cuanto más bajo sea el coeficiente de variación para el carácter analizado. De igual manera Kozak *et al.*, (2013), interpreta el coeficiente de variación como una manera de medir la variación interna de los tratamientos, como también el grado de variabilidad de una variable, entre más alto mayor variabilidad presenta la variable.

En base a evaluaciones experimentales, sin importar las condiciones edafoclimáticas, la variedad Sebaqueña suele expresar alta variabilidad en cuanto a su potencial productivo. Por mencionar, Laguna (1999), evaluó 27 genotipos de cebolla de bulbo amarillo en el Valle de Sébaco (Nicaragua), utilizando como testigo la variedad Sebaqueña, según los resultados obtenidos dicha variedad presentó el 55% de bulbos comerciales (> de 5 cm) y rendimiento de 25 t. ha<sup>-1</sup>.



Por otro lado, Morales *et al.*, (2000) del Instituto Politécnico de Loyola en San Cristóbal (República Dominicana), evaluó el comportamiento productivo de 16 híbridos en conjunto con la variedad Sebaqueña, esta última presentó rendimiento de apenas 11 t. ha<sup>-1</sup>. En cambio, la Red Colaborativa de Investigación y Desarrollo de Hortalizas para América Central, Panamá y República Dominicana (Redcahor, 2000), se realizó una evaluación de 18 híbridos de cebolla en el valle de Sébaco-Matagalpa en el cual la variedad Sebaqueña presentó rendimiento de apenas 7.81 t. ha<sup>-1</sup>. Por su parte INTA (2003) reportó rendimientos promedios de 20 t. ha<sup>-1</sup> en bulbos y 500 kg ha<sup>-1</sup> en semillas.

A pesar que múltiples resultados indican rangos de variaciones significativos en cuanto a los componentes de rendimiento, en Nicaragua no se reportan estudios relacionados a la composición genotípica y fenotípica de la variedad Sebaqueña, la mayoría de los estudios han sido enfocados en evaluación de componentes de rendimiento. No obstante, queda claro que esta variedad en términos productivos es muy inestable, las razones pueden atribuirse a factores como: variabilidad climática, manejo agronómico, selección de semillas por parte de los productores instaurando cambios en las frecuencias fenotípicas y genéticas.

Según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) se agrupan tres categorías estadísticamente diferentes, cuyo rendimiento promedio varió de 9.78 a 12.82 t. ha<sup>-1</sup>, siendo la población procedente de San Marcos y Suní del departamento de Jinotega, que expresaron mayor rendimiento (Cuadro 4). Es importante mencionar que una de las zonas potenciales para la producción de cebolla en Nicaragua es el departamento de Jinotega, donde se establecen aproximadamente 277 a 350 mz en cada ciclo productivo según reporte de INIDE (2011).

**Cuadro 4.** Medias y categorías estadísticas para la variable rendimiento promedio de bulbos (g), de las poblaciones procedentes de Matagalpa y Jinotega.

Poblaciones	Rendimiento t.ha <sup>-1</sup>	Categoría	Media general t.ha <sup>-1</sup>
San Marcos	12.82	a	
Suní	12.46	ab	
San Isidro (Testigo)	11.01	abc	
Las Delicias	10.93	abc	11.07
Terrabona	10.52	bc	
San Esteban	9.99	bc	
Bonete	9.78	c	

De acuerdo con Laguna (2008), el municipio de la Concordia y sus comunidades aledañas tales como: San Marcos, Suni, Namanji, Colón, Llano Largo, Sacacli, entre otros, prestan las mejores condiciones de clima y suelo para la producción de bulbos de cebolla de calidad, considerando que el cultivo de cebolla es sensible al medio ambiente y se desarrolla mejor en climas templados.

En la región tropical, como consecuencia de las altas temperaturas y días cortos, la mayoría de las variedades no desarrollan bulbos y las que mejor se comportan no muestran todo su potencial productivo (Montenegro, 2014). Por otro lado, Thomson *et al.*, (1972), señalan que una producción exitosa del cultivo de cebolla depende tanto de la variedad como de las condiciones impuesta por el medio ambiente.

Es importante resaltar que los factores que influyen directamente en la formación del bulbo de la cebolla son principalmente; longitud del día, temperatura y el tipo de variedad. De acuerdo con Tapia (1999), la cebolla es de estación fría y es medianamente resistente a las heladas. Las altas temperaturas pueden estresar a la planta, provocando trastornos fisiológicos, disminuyendo la velocidad del desarrollo de la hoja y el número de las mismas.

Así mismo la influencia del fotoperiodo por la calidad e intensidad de la luz es indispensable, la luz infra roja y altas intensidades de luz favorecen el desarrollo del bulbo (Bertaud, 1986). Al disminuir la duración del día la intensidad luminosa baja, las hojas lo perciben y mandan señales a otras partes de la planta, iniciando la dormancia (Chope *et al.*, 2012). En este sentido, el efecto combinado de la temperatura y el fotoperiodo induce a la formación de bulbos de cebolla, siendo posible que, en zonas tropicales la temperatura sea un factor determinante.

Existen tres tipos de variedades dependiendo de su requerimiento lumínico, para inducir la formación de bulbos: 1) cultivares tempranos o de fotoperiodo corto, 2). cultivares de media estación o de fotoperiodo intermedio, y 3). cultivares tardíos o de fotoperíodo largo. Siguiendo estas exigencias del cultivo, se puede decir que en Nicaragua las variedades que se adaptan son los cultivares de ciclo temprano y fotoperiodos cortos, debido a que los días más largos apenas llegan a once horas y 45 minutos, sin embargo, la intensidad de luz puede variar en diferentes zonas.

De este modo, es posible considerar que exista una serie de factores que pueden ocasionar cambios tangibles en las frecuencias fenotípicas y genotípicas, como responsables de la actual variabilidad de la variedad Sebaqueña; e.g, selección de semilla en cantidades no representativas de la población lo cual induce a la endogamia u homocigosis, mutaciones y ausencia de mantenimiento varietal.

#### **4.2. Comparaciones de frecuencias fenotípicas de ocho variables morfológicas en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña**

Los resultados obtenidos en el análisis de la frecuencia a través de la prueba exacta de Fisher para datos contables con valores p simulados en 10,000,000 réplicas, mostraron diferencias significativas en la mayoría de las poblaciones, es decir que las poblaciones son diferentes. Sin embargo, al comparar las poblaciones de San Marcos-San Isidro y Suni-Bonete, estas no presentaron diferencias significativas, lo que muestra que estas poblaciones son fenotípicamente similares (Cuadro 5). Dichos resultados son basados en la comparación de las ocho variables morfológicas y corroborados en el análisis de agrupamiento (Figura 2).

**Cuadro 5.** Resultado de la prueba exacta de Fisher (valores p) para la comparación de frecuencias fenotípicas de ocho variables morfológicas en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.

	San Marcos	Suní	San Isidro	Las Delicias	Terrabona	San Esteban
San Marcos						
Suní	0.005287					
San Isidro	<b>0.2831NS</b>	6.1e-06				
Las Delicias	4e-07	1e-07	1.4e-06			
Terrabona	0.000217	5.53e-05	0.0001445	1e-07		
San Esteban	3.9e-06	2e-07	1e-07	1e-07	1e-07	
El Bonete	4.3e-06	<b>0.1727NS</b>	1e-07	1e-07	0.0001219	0.0008634

p<0.05: diferentes (\*)

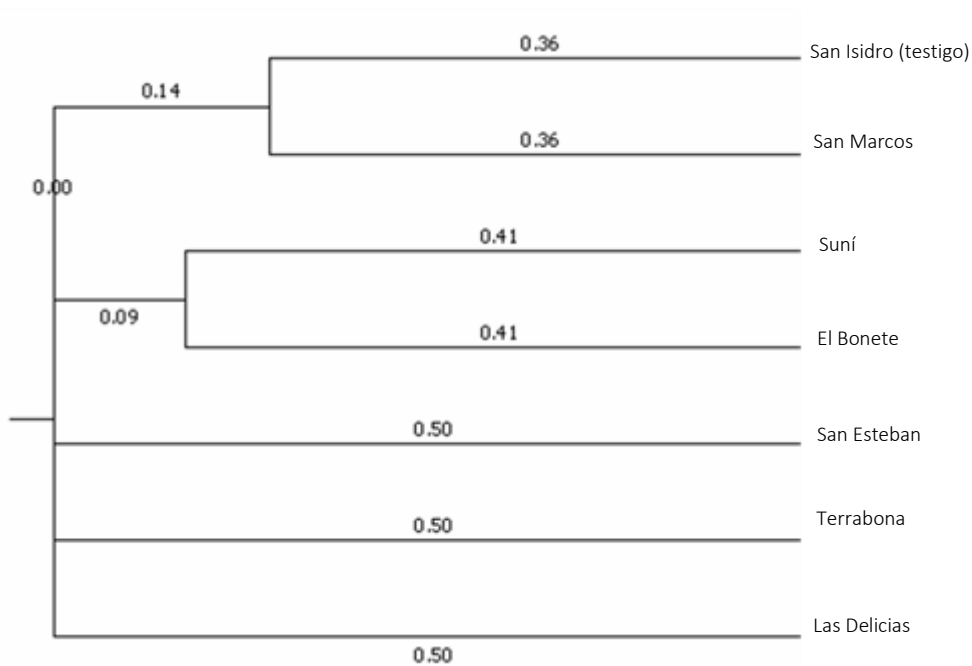
p>0.05: iguales (NS)

A partir de estos resultados se puede aseverar que existe una alta variabilidad fenotípica entre las poblaciones. De acuerdo con Chimote *et al.*, (2013), una población muestra diversidad fenotípica y genética cuando existe una alta variación en caracteres cualitativos y cuantitativos, resultado de procesos de recombinación y mutación de genes durante un largo período de tiempo, a su vez resultantes de la selección natural y la selección llevada a cabo por los agricultores (Porta, 2010). De igual manera Choer (2005), describe que la diversidad genética les concede a las especies habilidades para la adaptación a cambios climáticos y ambientales además de resistencia a nuevas plagas y enfermedades.

Sin embargo, la variabilidad que presentan estas poblaciones puede ser de gran utilidad para emprender programas de mejoramiento para la generación de nuevas variedades a partir de la variedad Sebaqueña, sin necesidad de realizar cruzamiento. Según Lee *et al.*, (2018), en muchos países del mundo, fitomejoradores han generado variedades modernas, derivadas de variedades reliquia mantenidas dentro de los sistemas agrícolas tradicionales. Sin embargo, Lagos *et al.*, (2003), Pardo (1988) describen que la variabilidad genética es la materia prima en la cual trabaja el fitomejorador y que, si no existiera variabilidad genética en los caracteres, los intentos por mejorar las especies vegetales serían en vano.

Como se describió anteriormente un programa de mejoramiento reside en la existencia de la variabilidad genética en la población. Esa divergencia puede ser evaluada a través variables

morfológicas y agronómicas. Sin embargo, una metodología que ayuda a entender tanto las similitudes y diferencias son los análisis de agrupamiento. En ese sentido se realizó un agrupamiento en base a las ocho variables morfológicas.



**Figura 2.** Agrupamiento de siete poblaciones de cebolla en base a las frecuencias de ocho variables morfológicas utilizando los valores p según la prueba exacta de Fisher.

De acuerdo al análisis de agrupamiento (Figura 2) se conformaron tres grupos, a continuación, se describen las poblaciones que los conforman y las variables que comparten similitud y diferencias.

- 1) San Marco-San Isidro, comparten similitud en las frecuencias de las variables; número de hojas por pseudo-tallo, longitud de pseudo-tallo, diámetro del pseudo-tallo y altura de la hoja más alta.
- 2) Suni-El Bonete comparte similitud al comparar las frecuencias; número de hojas por pseudo-tallo, longitud de pseudo-tallo, diámetro del pseudo-tallo y altura de la hoja más alta.
- 3.) San Esteban- Terrabona- Las Delicias, difieren en las variables longitud de pseudo-tallo y diámetro del pseudo-tallo.

A pesar que las poblaciones San Marcos-San Isidro y Suni- El Bonete poseen similitud en las mismas cuatro variables, las frecuencias son distintas (Anexo 10).

Por otro lado, es interesante observar que la población de San Marcos, procedente de Jinotega y población de San Isidro, procedente del Matagalpa, tenga similitud en las frecuencias de algunas variables. Sin embargo, es importante resaltar que el centro experimental INTA San Isidro Matagalpa es un proveedor de semilla especialmente de la variedad Sebaqueña, por lo que existe la posibilidad que la semilla proceda de la misma población.

El tercer agrupamiento se encuentra formado por tres poblaciones, procedentes del departamento de Matagalpa. Sin embargo, difieren en al menos dos variables. De acuerdo a Malpica (2012), la variabilidad fenotípica puede ser el resultado de barreras o distancias donde el intercambio del material genético entre poblaciones es limitado y la presencia de niveles bajo de flujo genético permite factores como la selección natural promover la diferenciación entre poblaciones.

#### **a. Número de hojas por pseudo-tallo**

De acuerdo a Lescay y Moya (2006), el número de hojas por planta posee una correlación positiva con el rendimiento total y comercial de los bulbos, por lo tanto, se puede utilizar como índice de selección en la identificación potencial de rendimiento debido a que posee una alta heredabilidad de aproximadamente 62 y 86%.

Por otro lado, la etapa vegetativa del ciclo del cultivo se distingue claramente dos sub etapas, la primera la planta se dedica a absorber nutrientes disponibles para el crecimiento del sistema radicular, y sobre todo del área foliar. En esta etapa, se observa aumento en el número de hojas y en el área de las láminas de las hojas, de tal manera que cada nueva hoja alcanza un tamaño mayor que la hoja anterior, sin embargo cuando la planta recibe del ambiente las condiciones adecuadas para iniciar la bulbificación, el destino de los nutrientes disponibles para el crecimiento cambia bruscamente, todos son destinados a la elongación celular y acumulación de reservas en la base (parte inferior de las vainas o catáfilas), en esta segunda etapa dejan de aparecer hojas nuevas. Las láminas de las hojas nuevas ya emergidas terminan de crecer, pero no alcanzan un tamaño superior a las hojas anteriores.

### **b. Longitud y diámetro del pseudo-tallo**

El cultivo de cebolla posee dos tipos de tallos uno conocido como el falso tallo parte superior del bulbo hasta el inicio de las hojas y el otro llamado el tallo verdadero localizado en la base de la planta. En el presente estudio se midió el falso tallo o pseudo-tallo, estas variables varían de acuerdo al tipo de variedad y especie, en las cebollas de puerro esta variable presenta diferencias altamente significativas cuando se utiliza distintas distancias de siembra puede llegar a medir más de 20 mm y más de 150 mm longitud (Peña, 2015). En cambio, en las cebollas dulces es menor, debido a que este al finalizar la etapa de desarrollo del bulbo, este se dobla para dar inicio al segundo ciclo de cebolla, la floración y producción de semilla.

### **c. Altura de la hoja más alta**

La altura de las plantas es una variable influenciada por el medio ambiente y condiciones de manejo agronómico, Coca *et al.*, (2012); Chang y Randle (2005), describen que uno de los factores relacionados al número de hojas o crecimiento vegetativo son los altos niveles de salinidad en el agua y el exceso de agua, por otro lado, Amaya *et al.*, (2011), vinculan la altura de la planta de cebolla con los niveles de fertilización de urea y potasio.

### **d. Diámetro polar y diámetro ecuatorial del bulbo**

Según Ronda (2004), describe que estas variables son sensibles al medio ambiente en especial fotoperiodo, temperaturas y variedad y están correlacionadas de manera positiva con el tamaño del bulbo y el tamaño de la umbela. De igual manera, Guiñazú (1996), describe que el bulbo de tamaño medio a grande (5 a 10 cm de diámetro), permite una mayor producción de semillas que los bulbos pequeños (menores de 5 cm). El tamaño del bulbo varía entre las variedades, pero también se puede ajustar cambiando las densidades de siembra, dependiendo del tamaño del perfil deseado. El perfil de tamaño de los bulbos será más grande a densidades de plantas más bajas y más pequeño a densidades de plantas más altas.

Por su parte Assuero *et al.*, (2007), describen que una restricción hídrica moderada en el cultivo de cebolla, adelantaría el inicio de la formación del bulbo. Sin embargo, los rendimientos disminuyen cuando la deficiencia hídrica coincide con el “período crítico” al inicio del crecimiento de los bulbos.

#### **e. Forma del extremo del tallo**

La forma del extremo del tallo, depende de la variedad y es una variable altamente influenciada por el medio ambiente y manejo agronómico que se le brinde a la plantación (Galmarini, 1997).

#### **f. Forma de la sección longitudinal del bulbo**

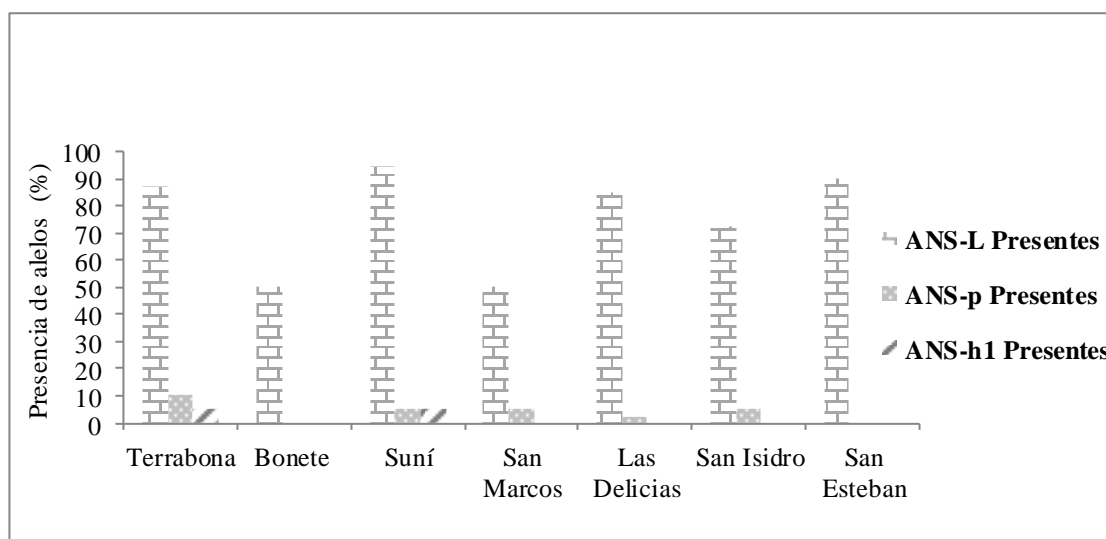
Debido a la gran variabilidad de forma que existe en la cebolla, Meruvia (2001), indica que se pueden clasificar en: Elíptica, grano, globosa, cónica, globosa achatada. Según Ahmed *et al.*, (2013), describen que la forma de bulbo es una característica morfológica de gran interés para la clasificación de variedades y las formas de bulbos pueden variar de plana a globo, siendo esta última preferida tanto para el mercado fresco y procesamiento, sin embargo, debido a las condiciones climáticas algunas variedades tienden a producir bulbos "altos" más largos que anchos, una forma de bulbo que es menos deseable por parte de los productores de cebolla y consumidores.

En base a lo antes descrito se puede considerar que la variedad Sebaqueña ha perdido parte de su pureza genética debido a las divergencias en sus caracteres fenotípicos y en comparaciones a las progenies que dieron origen a esta variedad (Anexo 6) y (Anexo7). De acuerdo con las directrices de la UPOV (2008), para el registro de una variedad se debe de demostrar que una población es Distinta, Homogénea y Estable. Sin embargo, para tener mayor información es recomendable realizar evaluaciones multi-ambientales, considerando parámetros genéticos que permitan conocer el efecto del ambiente y su interacción con la (s) población (es).



### 4.3. Identificación de variantes alélicas reflejados en el gen ANS en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña.

De una muestra de cuarenta individuos por población se realizó un recuento de la presencia de las tres variantes alélicas del gen ANS, codificantes en la biosíntesis de flavonoides y antocianina de los bulbos de cebolla (Anexo 9), obteniendo valores de presencia de 80 a 90 % del alelo ANS-L en las poblaciones de Terrabona, Suní y San Esteban, seguido el alelo ANS-p con un intervalo de presencia de 10 a 20% en las poblaciones de Terrabona, Suní y San Marcos y un 5% el alelo ANS-h1 en las poblaciones de Terrabona y Suní (Figura 3).

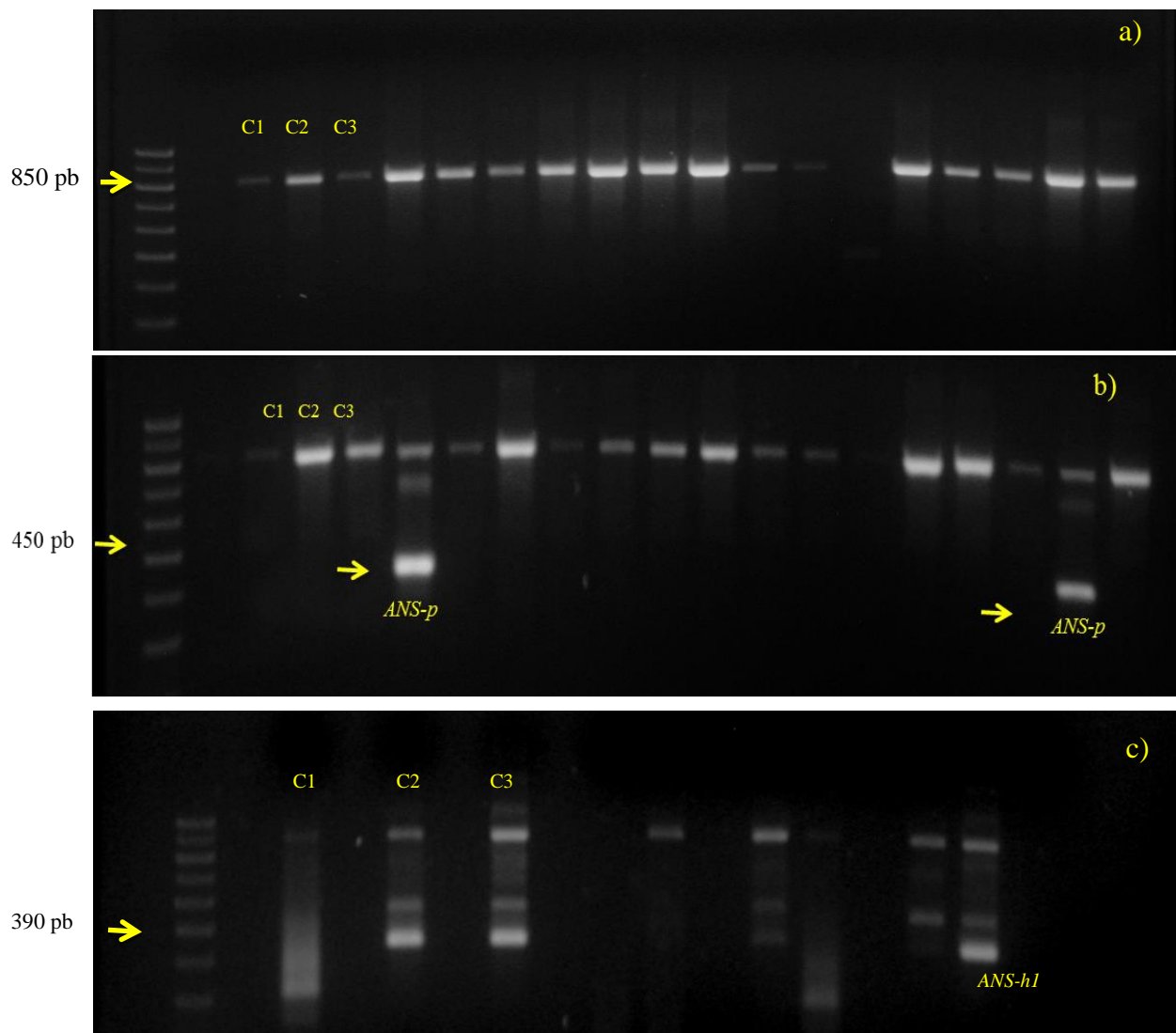


**Figura 3.** Presencia de los alelos ANS en siete poblaciones de cebolla variedad Sebaqueña, colectadas en los departamentos de Matagalpa y Jinotega.

Según Kim *et al.*, (2005a) existen cuatro variantes alélicas del gen ANS a las cuales se les atribuye la coloración roja de los bulbos de cebolla. Sin embargo, en el presente estudio se identificaron tres alelos debido a que el cuarto alelo (ANS-1) es inactivo. El ANS-L es un alelo que amplifica en las 810 pb y codifica para la coloración rojo oscuro en los bulbos. Sin embargo, se encuentran presentes cebollas de bulbos blancos y amarillos. El alelo ANS-p, amplifica entre las 450 pb y codifica para la coloración rosa o rojo intermedio de los bulbos y el alelo ANS-h<sub>1</sub> amplifica en los 390 pb y es responsable de la coloración roja de los bulbos encontrándose únicamente en bulbos de cebolla color oscuro (Kim *et al.*, 2005).

En la Figura 4, se observa la amplificación de los alelos ANS-L en trece muestras de la población de Suní; sin embargo, dos individuos de esta población no presentan el alelo ANS-L

(a); seguidamente se observa la amplificación del alelo ANS-p en dos individuos de la población de San Marcos (b) y en la tercera imagen se logra observar la amplificación del alelo ANS-h1 en la población de Terrabona y en los dos controles utilizados (C2 y C3).



**Figura 4.** Presencia del alelo ANS-L en individuos de la población de Suní (a), ANS-p en la población de San Marcos (b) y ANS-h1 en la población de Terrabona (c), utilizando marcadores Co-dominante SSR micro-satélite.

El primer marcador detectó la presencia del alelo ANS-L y con el segundo marcador se detectó la presencia del alelo ANS-p y ANS-h1. La muestra utilizada fue de cuarenta individuos por población (Terrabona, Suní, San Marcos, San Isidro, Las Delicias y San

Esteban). Por otro lado, el tercer marcador únicamente fue utilizado en las muestras por presentar doble alelos en el primero y segundo marcador, utilizando 11 muestras de las poblaciones de Terrabona y Suní.

La coloración roja oscura homogénea en los bulbos de cebollas es un rasgo importante en los programas mejoramiento, ya que es preferida tanto por los consumidores como por los agricultores. Sin embargo, la mayoría de las variedades de polinización libre de cebolla de color rojo son heterogéneas en color. Esta heterogeneidad puede atribuirse en parte al mantenimiento varietal. Por otro lado, la falta de información genética molecular sobre la herencia del color del bulbo ha impedido el desarrollo de cultivares de cebolla uniformemente roja. La variación cualitativa del color en la cebolla está determinada por cinco loci principales (I, C, G, L y R). También se reportó una variación cuantitativa de un color rojo (Kim *et al.*, 2007).

Los genes responsables del color rojo de los bulbos son dos: DFR-A y ANS que codifican para las enzimas dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y antocianidina sintasa (ANS), los cuales están implicados de forma complementaria en la producción de antocianinas en las cebollas, vinculados a los cromosomas 1 y 6 respectivamente (Kim *et al.*, 2005) y (Khar *et al.*, 2008). Dichos genes se encuentran en los locus (R y L) respectivamente (Kim *et al.*, 2009). De acuerdo a un estudio realizado por Eun-Young *et al.*, (2016), describen que existen once alelos inactivos del gen DFR-A, un alelo inactivo del gene ANS y tres alelos activos (ANS-L, ANS-p y ANS-h1), estos últimos responsables de las diferentes tonalidades del color rojo de los bulbos. En cambio, las frecuencias del alelo rosado son baja en líneas de reproducción rojas, pero es predominante en blanco y líneas amarillas (Kim *et al.*, 2004).

Según Kim *et al.*, (2007), mencionan que el color de los bulbos es un rasgo importante, a pesar que, presenta un complejo mecanismo de herencia involucradas en interacciones epistáticas entre los principales loci relacionados con el color.

Un estudio reciente reveló que la inactivación de la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) en la vía de síntesis de la antocianina, dió origen a dos alelos recesivos del gen de la antocianidina sintasa (ANS) responsables del color del bulbo rosa; uno en estado uno homocigoto recesivas

y dos en estado recesivo heterocigoto, resultados de cruzas entre parentales de color Amarillo y Rojo (Khar *et al.*, 2008).

Según Park *et al.*, (2013), afirman que existe una serie de variantes alélicas para el gen DFR-A y para el gen ANS, las cuales dan origen a complejas interacciones genéticas expresando diferentes tonalidades del color del bulbo rojo; por lo que se han desarrollado marcadores basados en PCR para la selección alélica en base a mutaciones en los alelos recesivos de estos dos genes resultado de ello se encontró la variantes alélicas ANS h<sub>1</sub>, alelo que codifica para la coloración rojo intenso de los bulbos de cebolla.

Los resultados del análisis molecular ejemplifican la utilidad de los marcadores moleculares en un programa de mejora a corto plazo, con la variedad Sebaqueña, teniendo en cuenta la actual segregación en el color de los bulbos (rojo e incluso amarillo). (Anexo 8).

Considerando que la cebolla es bianual y de polinización cruzada, la selección asistida por marcador aceleraría significativamente el período de reproducción y la generación de variedades o líneas parentales con los alelos que codifican para el color rojo, debido a que es posible seleccionar plántulas desde el estado de semillero acelerando significativamente etapa en el mejoramiento.

El color rojo de los bulbos es de gran importancia, debido a que poseen mayor resistencia a afectaciones por microorganismos patogénicos de suelo y mayor efectividad en el aprovechamiento a los rayos UV. Desde el punto de vista nutricional, los bulbos de cebolla rojo poseen grandiosas propiedades que ayudan a mejorar la salud, las altas concentraciones de flavonoide actúan como antioxidantes, ayudando a disminuir los efectos de los radicales libres y a la prevención de enfermedades cardiovasculares, colesterol, entre otras. Por otro lado, desde el punto de vista económico, la cebolla de bulbos color rojo son las mejor pagadas y destinada a un sector preferencial de consumo.

## V. CONCLUSIONES

- 1- En relación con el comportamiento productivo (rendimiento), las poblaciones difieren fenotípicamente de acuerdo con el lugar de origen. Se determinó que las poblaciones de Suní y San Marcos ubicadas en el departamento de Jinotega presentaron rendimiento de 12.82 a 12.46 t. ha<sup>-1</sup> con relación a la población testigo San Isidro que presentó rendimiento de 11.01 t. ha<sup>-1</sup>
- 2- Las comparaciones entre poblaciones, en base a las frecuencias fenotípicas simulando los valores de p con 10,000,000 réplicas, para ocho variables morfológicas, mostraron que únicamente las poblaciones de San Isidro & San Marcos y Suní & El Bonete no mostraron diferencias, es decir, fenotípicamente son similares.
- 3- En las siete poblaciones se identificaron tres variantes alélicas del gen ANS. El alelo ANS-L, ANS-p y un tercer alelo ANS-h1. El alelo con mayor porcentaje de presencia fue el ANSL en las poblaciones de Suní, San Esteban y Terrabona con 95%, 90% y 87.5%. El alelo ANS-h1 se presentó únicamente en las poblaciones de Terrabona y Suní con porcentaje del 5%.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- 1- Conservar la viabilidad genética expresada en estas poblaciones de cebolla, en bancos de germoplasma, para futuros programas de mejoramiento genético.
- 2- De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden emprender programas de mejoramiento genético a través de la selección asistida por marcadores, aprovechando la actual segregación de bulbo rosa e incluso amarillo que posee actualmente la variedad Sebaqueña para generación de nuevas variedades.
- 3- Establecer parcelas experimentales en diferentes ambientes para conocer la estabilidad y la adaptabilidad de las poblaciones en estudio.

## VII. LITERATURA CITADA

- Ahmed, N.; Khan S.; Afroza B.; Hussain K.; Qadri S.; Nazir G.; (2013). Morphological characterization in onion (*Allium cepa* L.) for preparation and implementation of plant variety protection (PVP) legislation and distinctness, uniformity and stability (DUS) testing under temperate conditions of Kashmir. African Journal of Agricultural Research 8(14):1270-1276.
- Amaya, J.; Méndez, E. 2011 Respuesta de niveles crecientes de NK en la producción de cebolla (*Allium cepa* L.) var. "Roja Arequipeña". Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Trujillo Peru. Scientia Agropecuaria Sitio en internet: [www.sci-agropecu.unitru.edu.pe](http://www.sci-agropecu.unitru.edu.pe). Scientia Agropecuaria 4(2013) 15 – 25.
- Assuero, S.; Rattin, J.; Saluzzo, G.; Sasso.; Tognetti, J.; 2007. Observaciones sobre la producción y conservación de cebolla en el sudeste de Buenos Aires en relación con la disponibilidad hídrica. Rev. Fac. Agron. 106 (2):109-118.
- Bertaud, D.; S. 1986. The effects of light on bulbing in onions. Proceedings Agron. Soc. N Z. 16(1):79-86.
- Chang, P.; Randle, W. 2005. Sodium chloride timing and length of exposure affect onion growth and flavor. J. Plant Nutr. 28(10), 1755-1766.
- Chimote, P.; Pattanayak D.; Naik P. 2013. Molecular and morphological divergence studies in Indian potato varieties. Division of Crop Improvement, Central Potato Research Institute, Shimla 171 001, India. Journal of Biotechnology.
- Chope, G. A.; Cools, K.; Hammond, J. P.; Thompson, A. J. and Terry, L. A. 2012. Physiological, biochemical and transcriptional analysis of onion bulbs during storage. Annals Bot. 109:819-831.
- Clarke, A.; Jones, A.; Little; T. 1944. Inheritance of bulb color in the onion. Genetics 29, 569–575.
- Coca, A.; Carranza C.; Miranda D.; Rodríguez, R.2012. Efecto del NaCl sobre los parámetros de crecimiento, rendimiento y calidad de la cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) bajo condiciones controladas. Facultad de Agronomía, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas - Vol. 6 - No. 2 - pp. 196-212.
- De Mendiburu, F. 2016. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-4. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Excel (2007) Software de hojas de cálculo Microsoft Excel
- El-Shafie, M.; Davis, G. 1967. Inheritance of bulb color in the onion (*Allium cepa* L.). Hilgardia, 607–622.
- FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture organization of the Nation Statistics Division. Production / crops onion.

- Fornos, R. y Gómez, G. 1995. Efecto de tres tipos de empaques y tres ambientes sobre la calidad fisiológica de la semilla de cebolla (*Allium cepa* L.) variedad sebaqueña mejorada. Tesis. Ing. Agr. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía.
- Galmarini C. 1997. Manual de Cultivo de la Cebolla. Impreso en INTA Centro regional. Santiago CL 16 p.
- Guiñazú, M. 1996. Factores de manejo que afectan la floración en cultivos de cebolla (*Allium cepa* L.). Universidad Nacional de Cuyo. Avances en Horticultura. 1 (1): 41-54, 1996.
- Instituto Nacional de Información de Desarrollo. (INIDE). 2011. Informe final del IV Censo Nacional Agropecuario, Superficie establecidas del cultivo de cebolla en Nicaragua, ciclo productivo 2010-2011. cuadro 19.25 p.
- Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales (INETER). 2015. Dirección general de Meteorología.
- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (INTA). 2003. Variedad de cebolla sebaqueña tolerante a requemo. Informe técnico de investigación del CEVAS y experiencia con productores, periodo (2001- 2003) Código: CD-045.
- Jimenez, O. 2009. Genetic purity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'INTA ROJO') during seed production in Nicaragua. Master's Thesis. University of Helsinki, Finland.
- Jiménez, O. 2001. Comparaciones en los patrones de crecimiento de quince poblaciones de frijol común (*Phaseolus vulgaris*. L) conservada en finca de agricultores (*in situ*) y *ex situ* (Tesis inédita de ingeniería). Universidad Nacional Agraria.
- Khar, A.; Jakse, J.; Havey, M. 2008. Segregations for Onion Bulb Colors Reveal That Red Is Controlled by at Least Three Loci. Department of Horticulture, University of Wisconsin, Madison, WI 53706 USA; and National Research Centre for Onion and Garlic, Rajgurunagar, Pune Dist., Maharashtra, India, 410505 J. AMER. Soc. HORT. Sc, 133(1):42-47. 2008.
- Kim, S.; Baek, D.; Cho, D.; Yoon, M. 2009. Identification of two novel inactive DFR-A alleles responsible for failure to produce anthocyanin and development of a simple PCRbased molecular marker for bulb color selection in onion (*Allium cepa* L.). Theor Appl Genet 118:1391–1399.
- Kim S., Yoo K., Bang H. 2007. Marker-assisted genotype analysis of bulb colors in segregating populations of onions (*Allium cepa* L.). Vegetable and Fruit Improvement Center, Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, Texas 77843, USA. Mol. Cells, Vol. 23, No. 2, pp. 192-197
- Kim, S.; Haejeon, B.; Kil-Sun, Y.; Pike L. 2005 Identification of the fourth allele of the ANS (anthocyanidin synthase) gene and its effect on red color intensity in onions (*Allium cepa*). Vegetable & Fruit Improvement Center, Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, Texas 77843, USA. Euphytica (2006) 149: 45–51.



- Kim, S.; Jones, R.; Yoo, K.; Pike, L. 2006. The L locus, one of complementary genes required for anthocyanin production in onions (*Allium cepa*), encodes anthocyanidin synthase. *Theor Appl Genet* 111:120–127.
- Kim, S.; Binzel, M.; Yoo, K.; Park, S.; Pike, L. 2004. Pink (P), a new locus responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa* L.) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase. *Mol Genet Genomics* 272:18–27.
- Kozak, M.; Bocianowski, J.; Rybiński, W. 2013. Note on the use of coefficient of variation for data from agricultural factorial experiments *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19 (No 4) 2013, 644-646 Agricultural Academy.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. Publication PDF. <http://www.megasoftware.net>.
- Lagos, T.; Criollo, E.; Checa, O. 2003. Divergencia Genética y Heterosis. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Colombia. *Revista de ciencias Agrícolas* vol. 20.
- Lagunas, T. 1999. Evaluación agronómica de 24 cultivares de (*Allium cepa* L.), en el Valles de Sébaco en época seca. Informe de investigación REDCAHOR (1999- 2000).
- Lee, J.; Hasan, A.; Khan, R.; Natarajan, S.; Jung, H. 2018. Identificación varietal de cultivares de cebolla de polinización abierta utilizando una matriz nanofluídica de marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Departamento de Genética y Fitomejoramiento, Universidad Agrícola de Bangladesh, Mymensingh 2202, Bangladesh. *Agronomía* 2018, 8 (9), 179; doi: 10.3390 / agronomy8090179
- Lescay, B.; González, N.; Luis, M. 2011. Identificación de variables que puedan ser usadas como criterios de selección en programas de mejoramiento genético de la cebolla (*Allium cepa* L.). *Centro Agrícola*, 38(3):23-28; julio-sept., 2011 CE: 45, 07.
- Leyca, E.; Moya C. 2006. Determinación de las variables más importantes, heredabilidad y correlaciones fenotípicas, en la producción de bulbos de cebolla. *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no. 4, p. 69-72.
- Liu, Z.; Schwimer, J.; Liu, D.; Greenway, F.; Woltering, E. 2005. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitor. *J Agric Food Chem* 53:3909–3915.
- Longo, L.; Platini, F.; Scardino, A.; Alabiso, O.; Vasapollo, G.; Tessitore, L. 2008. Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Ther* 7:2476–2485.
- Malpica A. 2012. Divergencia genética y morfológica entre poblaciones migratorias y sedentarias de *Salasphoru patyceru* (AVES: *Trochilidae*). Tesis de Maestría. Xapalapa, Veracruz Mexico.
- Martínez S.M. 1997. Evaluación de cinco cultivares de cebolla (*Allium cepa* L), amarilla dulce de exportación del Valle de Sebaco, Matagalpa. Trabajo de Diploma Universidad Nacional Agraria. 1997 Managua Nicaragua.

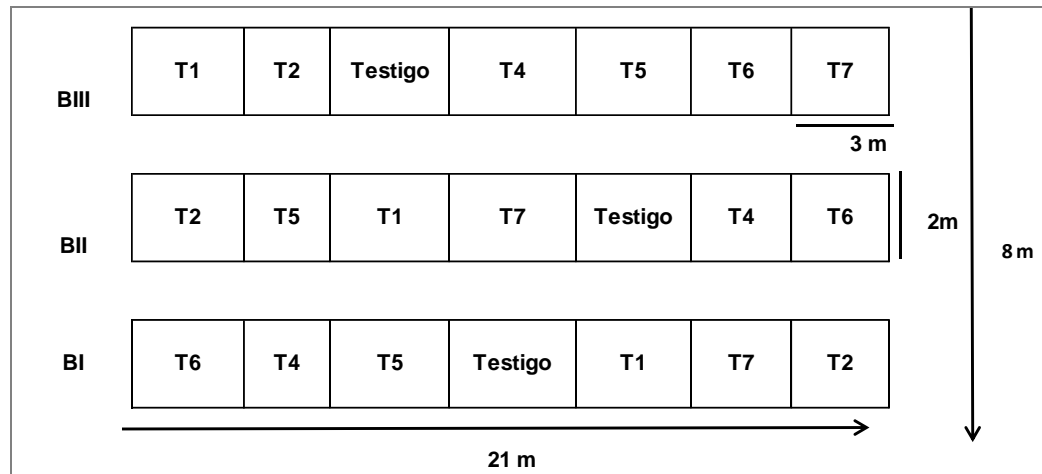
- Martíns, P. G. 2007. Plasticidad fenotípica de *pinus pinaster* frente a la disponibilidad de nutrientes. Trabajo de investigación tutelado. Universidad de Santiago de Compostela Escuela Politécnica superior de Lugo Ingeniería de Montes. Junio 2007.
- Meruvia, P. 2001. Manual de cebolla. Oruro, BO. Editorial Enflex. p 33 -36.
- Miner, B.; Sultan, S.; Morgan, S.; Padilla, D.; Relyea, R. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 685-691.
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio. (MIFIC). 2008. Dirección de Políticas Comerciales Externas (DPCE) Departamento de Análisis Económico. Producción regional y consumo. pag.5 y 12.
- Montenegro, C. 2014. Producción de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), una realidad en Santa Cruz del Norte, Mayabeque. *cultrop* 2014, vol.35, n.4, pp. 5-12. ISSN 0258-5936.
- Morales, J.; Navarro, P.; Rondón, F.; Báez, F.; Genao, C. 2000. Evaluación de variedades de cebolla en la República Dominicana *Agronomía Mesoamericana*, vol. 11, núm. 2, 2000, pp. 115-121 Universidad de Costa Rica Alajuela, Costa Rica.
- Muñoz, P. 2004. Una variedad de cebolla para clima tropical. *Cultivos Tropicales*, vol. 25, núm. 3, 2004, pp. 59-62 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba
- Pardo, J. 1988. Variabilidad: sus clase y uso en la mejora forestal: Mejora genética de las especies arbóreas. *Madriz Lucovasa* pp 30 46.
- Park, J.; Cho, D.; Moon, J.; Yoon, M.; Kim, S. 2013. Development of functional markers for detection of inactive DFR-A alleles responsible for failure of anthocyanin production in onions (*Allium cepa* L.). *Korean J Hortic Sci Technol* 31:72-79
- Peña, B. 2015. Efecto de la densidad de siembra y del aporque en la producción y calidad de la cebolla puerro (*Allium ampeloprasum* L. var. *porrum* J. Gay) Facultad Ingenierías, Programa Ingeniería Agronómica. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Dirección para correspondencia: Calle 222 No. 55-37, Bogotá.
- 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. Universidad de la República Facultad de Ciencias Licenciatura en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay.
- R, Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rabinowitch, H.; Currah, L. 2002. *Allium crop science: recent advances*. CAB International, Wallingford.
- Red colaborativa de investigación y desarrollo de hortalizas para América central, Panamá y República Dominicana (REDCAHOR). 2000. Informe de investigación 1999-2000/ ed. Por la red colaborativa de investigación y el desarrollo de las hortalizas para América

Central, Panamá y República Dominicana. San José. C.R REDCAHOR, 2000. 14 p;  
28 cm

- Rieman, G. 1931. Genetic factors for pigmentation in the onion and their relation to disease resistance. *J. Agr. Res.* 42, 251–278.
- Ronda, R. 2004. Uso de bulbos madres de tamaño pequeño en la producción de semilla de cebolla en condiciones tropicales. Unidad de Semillas y Extensiones, INIFAT- Sancti Spiritus. *Centro Agrícola*, año 31, no. 1-2, ene-jun., 2004
- Shin, D.; Lee, W.; Kang, M.; Ryu, C.; Kim, G.; Kang, H.; Shin, S.; Choi, H. 2009. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells by anthocyanins through suppression of Akt and activation of p38-MAPK. *Int J Oncol* 35:1499–1504.
- Shui-Sung Hsiang C, Jye Tsay T. 1983. Evaluación de progenies seleccionadas de bulbos de bulbos latente en cebolla criolla var. “Sebaqueña”. MINDINDRA-Misión Técnico-Agrícola-China.
- Shui-Sung Hsiang C, Jye Tsay T. 1982. Evaluación de progenies seleccionadas de bulbos no latentes en cebolla criolla var. “Sebaqueña”. MINDINDRA-Misión Técnico-Agrícola-China.
- Soto P.; Rothhammes F.; Valenzuela C.; Llop E.; Harb Z. 1974. Aplicación de un método de distancia en las comparaciones de poblaciones Prehispánica de Américas. Departamento de biológica celular y genética de la Universidad de Chile Santiago Sede Norte.
- Tapia, M. 1999. El cultivo de la cebolla. Universidad de Chile. Santiago, Chile. Publicaciones Misceláneas Agrícolas núm. 47. 1-10 pp.
- Thomson, R.; Booth, A.; Protor, F. 1972. Onion in the tropic. *Tropical Science*. V:14 N°. Pag 19-34.
- Unión para la Protección y Obtención de Vegetales. (UPOV). 2008. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. CEBOLLA, ECHALION, CHALOTA, TG/47 2008-04-09

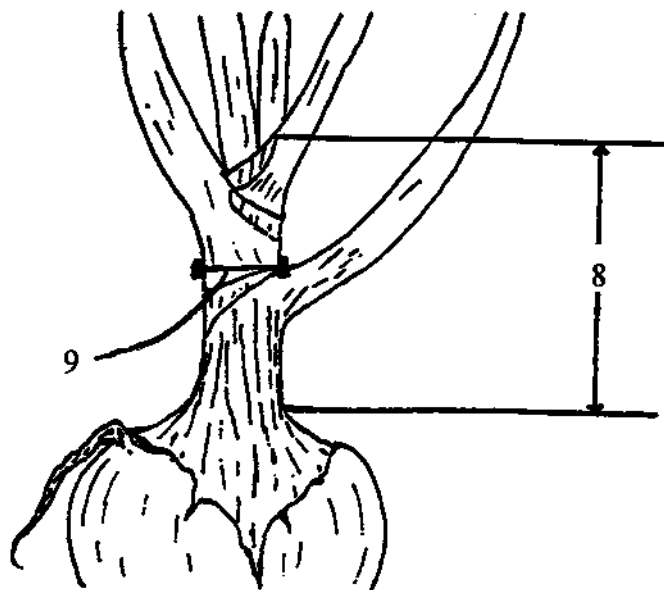
## VIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Diseño del experimento establecido en el Centro Experimental, San isidro Matagalpa ciclo postrema 2015.



Tratamiento	Localidad	Datos generales del experimento
T1:	San Marcos	Número de surco por tratamiento: 3
T2:	Suní	Número de planta por tratamiento: 48
T3:	Testigo-San Isidro	Número muestra por tratamiento: 45
T4:	Las Delicias	Ancho de cada bloque: 2 m
T5:	Terrabona	Longitud de la parcela experimental: 3 m
T6:	San Esteban	Distancia de siembra entre planta: 0.12 m
T7:	El Bonete	Distancia de siembra entre surco: 1 m

**Anexo 2.** Forma de medir el extremo del tallo.

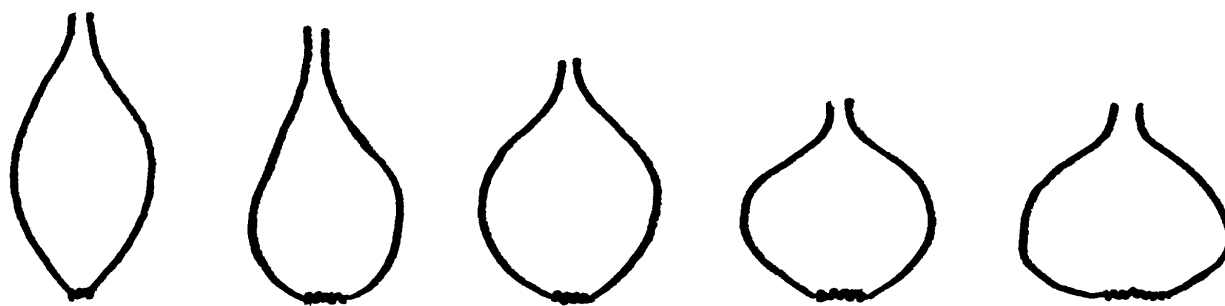


**Anexo 3.** Forma de medir el extremo del tallo.



- |           |       |                           |            |                           |                           |
|-----------|-------|---------------------------|------------|---------------------------|---------------------------|
| 1         | 2     | 3                         | 4          | 5                         | 6                         |
| deprimido | plano | ligeramente<br>prominente | redondeado | ligeramente<br>puntiagudo | fuertemente<br>puntiagudo |

**Anexo 4.** Clasificación de formas de la sección longitudinal del bulbo.



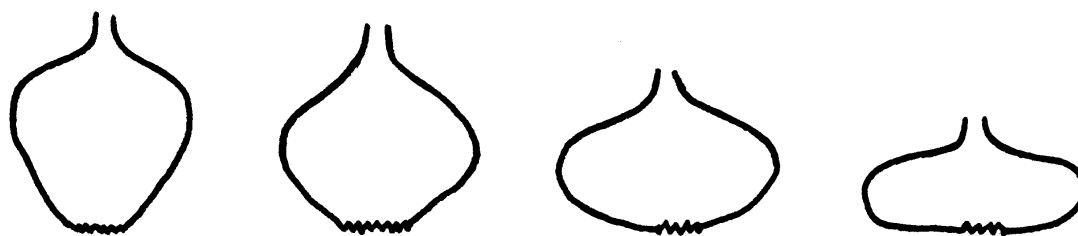
1  
Elíptica

2  
oval media

3  
elíptica ancha

4  
circular

5  
ovada



6  
obovada ancha

7  
róbica

8  
elíptica transversal  
media

9  
elíptica transversal  
estrecha

**Anexo 5.** Características de las progenies de bulbos latentes de la variedad Sebaqueña.

Número de progenies	Altura de planta (cm)	Tamaño de bulbo		Peso bulbo (g)	Rendimiento Kg. ha <sup>-1</sup>
		Diámetro ecuatorial (cm)	Diámetro polar (cm)		
11	31.00	6.00	4.00	74.60	8333
12	37.67	5.67	4.00	46.67	7666
13	35.33	5.83	3.83	46.67	6866
14	30.00	5.17	3.50	33.33	1000
15	38.55	5.5	4.00	50	7833
16	36.00	6.00	3.83	55.56	8500
17	32.76	5.67	3.83	55.56	6666
18	34.00	6.17	4.00	45	7666
19	26.67	5.00	3.33	40	7066
20	29.33	6.00	3.83	50	9500
Promedio	35.68	5.7	3.82	51.53	8433
Testigo	37.15	4.38	3.1	31	4233

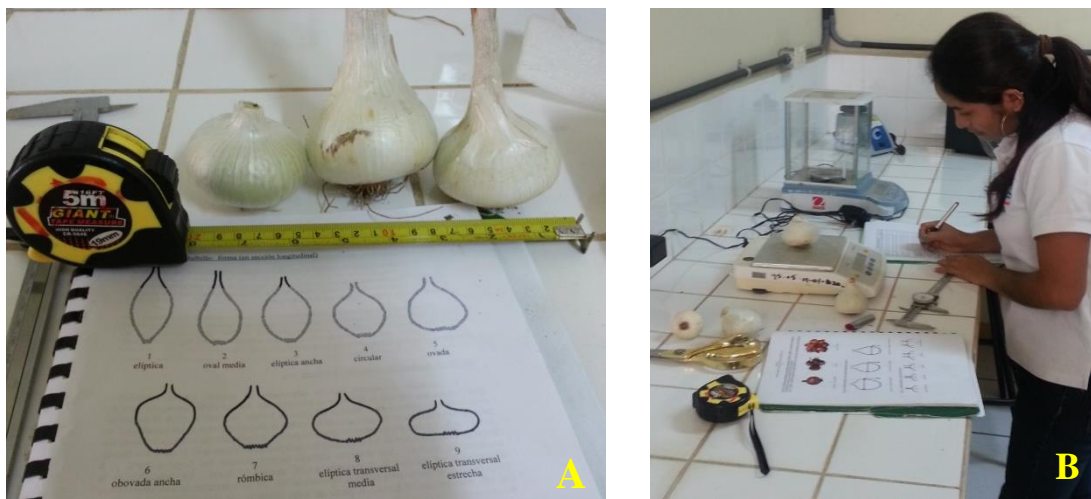
Fuente: Shui y Jye (1983).

**Anexo 6.** Características de las progenies de bulbos no latentes de la var. Sebaqueña.

Largo del cuello en (cm)	Diámetro del cuello (cm)	Tamaño de bulbo		Peso bulbo (g)	Rendimiento kg. ha <sup>-1</sup>	% Floración
		Diámetro ecuatorial (cm)	Diámetro polar (cm)			
42.84	2.02	8.17	4.00	168.00	14262	83
47.67	1.75	7.5	4.50	181.00	13858	17
42.67	1.7	8.59	4.58	200.00	13808	56
48.9	1.6	7.67	4.08	159.00	12131	15
41.83	1.99	7.87	4.60	190.00	12030	64
48.67	1.67	6.97	3.99	131.00	11959	49
52.37	1.83	8.25	4.34	181	11868	15
52.4	1.39	7.65	6.62	181	11555	2
46.9	2.29	7.67	4.42	163.00	11535	11
46.4	2.22	7.03	3.82	127	11474	21
43.9	2.34	7.70	5.19	209	11292	75
38.87	2.27	7.58	4	145	11212	62
43.83	1.97	7.7	3.92	168	11121	23

Fuente: Shui y Jye (1982).

**Anexo 7.** Evaluación e identificación de variantes alélicas de la coloración de bulbos en siete poblaciones de cebolla var. Sebaqueña.



Forma de la sección longitudinal del bulbo (A) y peso de bulbos (B).



Segregación de bulbos de color rojos intermedio en poblaciones de bulbos blancos (A y B) e identificación de variantes alélicas para las diferentes tonalidades del color rojo de los bulbos en las siete poblaciones de cebolla var. Sebaqueña (C).



**Anexo 8.** Recuento total y porcentajes de los alelos ANS-L, ANS-p- y ANS-h1 presente en las siete poblaciones de cebolla, var. Sebaqueña.

Poblaciones	ANS-L	ANS-p	ANS-h1	Total
	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes
Terrabona	35	4	2	41
Bonete	20	0	0	20
Suní	38	2	2	42
San Marcos	20	2	0	22
Las Delicias	34	1	0	35
San Isidro	29	2	0	31
San Esteban	36	0	0	36
Total	212	11	4	227

\*Recuento total

Poblaciones	% ANS-L	% ANS-p	% ANS-h1
	Presentes	Presentes	Presentes
Terrabona	87.5	10	5.00
Bonete	50	0	0.00
Suní	95	5	5.00
San Marcos	50	5	0.00
Las Delicias	85	2.5	0.00
San Isidro	72.5	5	0.00
San Esteban	90	0	0.00

\*Porcentajes