

MILLORA GENÈTICA DEL CALÇOT (*Allium cepa* L.)

DESENVOLUPAMENT D'EINES DE SELECCIÓ I APLICACIÓ A L'OBTENCIÓ DE NOUS CULTIVARS

Autor

Joan Simó Cruanyes

Per optar al títol de

Doctor per la Universitat Politècnica de Catalunya

Castelldefels, Setembre 2013

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Francesc Casañas Artigas

al Departament d'Enginyeria Agroalimentaria i Biotecnologia

Universitat Politècnica de Catalunya

Programa de Doctorat en Tecnologia Agroalimentària i Biotecnologia



Departament d'Enginyeria
Agroalimentària i Biotecnologia

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA



Fundació
Miquel Agustí

RESUM

Els calçots, tiges florals immadures de la ceba (*Allium cepa* L.), són un cultiu típic de Catalunya i juguen un paper important en l'agricultura catalana. Es calcula que la producció de la campanya 2012-2013 va ser d'uns 48 milions d'unitats, amb un creixement constant els últims anys. Aproximadament el 15% d'aquesta producció es comercialitza sota el segell de qualitat europeu "Indicació Geogràfica Protegida Calçot de Valls". La varietat més comunament usada per a la producció de calçots és la ceba Blanca Tardana de Lleida (CBTL), que va començar, segons la opinió dels productors, una progressiva disminució del nombre de calçots per planta, ara fa uns 8 anys. L'objectiu principal d'aquesta tesi és, doncs, obtenir nous cultivars més productius, però l'escassa informació sobre la base genètica dels caràcters comercialment importants i les tècniques de maneig més eficients ha obligat a desenvolupar eines metodològiques per avançar en la millora del calçot. Així doncs, la tesi s'articula en cinc articles publicats en revistes indexades i on és recullen com a principals resultats: a) Un mètode estandarditzat de preparació de calçots per anàlisis sensorials i químiques consistent en la cocció al forn durant 18 minuts a 270°C, i la transformació en puré; b) La formulació de l'idiotip sensorial dels calçots basat en una dolçor elevada, baixa fibrositat i absència de sabors atípics; c) El valors elevats de variabilitat sensorial i agromorfològica inter-varietal estimada en calçots produïts per diverses varietats espanyoles de prestigi, algunes de les quals podrien incorporar-se a programes de millora; d) La modelització de poblacions de calçots mitjançant la funció de Gompertz pel que fa a l'evolució del nombre de calçots per planta al llarg del cultiu, la qual cosa permet fer comparacions i facilita la presa de decisions sobre el moment de collita; e) Les similituds en el fons genètic de les varietats tradicionals espanyoles de ceba estimada mitjançant AFLPs i microsatèl·lits, abonant un considerable flux genètic entre varietats i la diferenciació morfològica per pocs loci; f) El desenvolupament d'equacions de regressió eficients que permeten estimar el nombre de calçots de la planta a partir del nombre d'ulls que es detecten en l'estadi de ceba, i determinació de la influència de les dimensions mínimes que ha de tenir la ceba perquè s'expressi el potencial genètic de producció de calçots; g) Finalment, com a resultat del programa de millora, s'han desenvolupat els cultivars Roquerola, amb un desenvolupament primerenc i un nombre mitjà de calçots (4.6 calçots comercials per planta al Gener), i el cultivar Montferri amb un desenvolupament més tardà i que assoleix una mitjana de 8 calçots comercials per planta al Març.

Paraules clau: *Allium cepa* L. · Calçots · Variabilitat genètica · Anàlisi sensorial · Gompertz · Millora genètica

ABSTRACT

'Calçots', the floral stems of second-year onion (*Allium cepa* L.) resprouts, are a typical crop from Catalonia and they play an important role in Catalan agriculture. In the last season (2012-2013), 48 millions of units were produced and this number is constantly increasing. Around 15% of this production is commercialized under the European quality label 'Protected Geographical Indication Calçot de Valls'. The landrace 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' (CBTL), the most commonly used variety in the production of 'calçots', has undergone a gradual decreasing of the 'calçots' number per plant in the last 8 years. Therefore, the main aim of this thesis is to obtain more productive cultivars for 'calçots' production. However, the lack of information about the genetic basis of the main commercial traits and the most efficient handling techniques, made it necessary to develop methodological tools to move forward in 'calçots' breeding. As a result, the thesis is articulated in five indexed peer-reviewed papers, with the following main results: a) A standardized protocol for the preparation of samples for sensory and chemical analysis where 50 commercial-size 'calçots' per entry are roasted at 270°C for 18 minutes, and then pureed; b) The design of a sensory ideotype for 'calçots' based on high sweetness, low fiber perception, and low off flavors perception; c) The finding of high sensory and agromorphological intervariety variability for 'calçots' produced by different prestigious Spanish onion landraces, which could be incorporated in breeding programs; d) The modeling of 'calçots' populations through the determination of the 'calçots' number per plant at different stages of the crop, using a Gompertz function, which allows establishing comparisons and clarifying the optimum harvest time; e) The report of a high similarity in the Spanish onion landraces genetic background, estimated using SSR and AFLP, suggesting an important genetic flow among varieties and the implication of few loci in morphological differentiation; f) The development of efficient regression equations enabling good estimations of the number of 'calçots' per plant from the number of gemmae measured in the bulb phase, and the determination of the minimum size of the onion bulb that enables a non-limited expression of the genetic potential for 'calçots' production; g) Finally, as a result of a breeding program, we have developed the new cultivars 'Roquerola', with an early development and an medium number of 'calçots' (4.6 commercial 'calçots' per plant in January), and 'Montferri', with a late development and 8 commercial 'calçots' in March on average.

Keywords: *Allium cepa* L. · 'calçots' · Genetic variability · Sensory analysis · Gompertz · Breeding

AGRAÏMENTS (és de ben parit ser agrait)

Diuen que els calçots no es poden menjar en solitari, que s'han de menjar al voltant d'una gran taula, amb família, amics o companys. Crec que amb la realització d'una tesi passa una cosa semblant, almenys amb aquesta, ja que sense l'ajut d'un nombre molt important de persones no hagués estat possible. Així doncs, vull agrair a tota aquesta gent que m'hagi acompanyat al llarg d'aquests anys, ja que crec que una part d'aquesta tesi també els correspon.

A les entitats, sense el suport de les quals hagués estat impossible la realització de la tesi: Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya; Indicació Geogràfica Protegida el Calçot de Valls; Universitat Politècnica de Catalunya; Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana; i la Fundació Miquel Agustí.

Volia fer un especial agraiement als agricultors que m'han permès realitzar els experiments a casa seva i han tingut la infinita paciència d'ensenyar-me i alhora fer-me cas amb les coses estranyíssimes que fèiem als seus camps. Germans Blanch, Sebastià i Mario, moltes gràcies i espero que tot el que hem fet us hagi servit també a vosaltres.

A en Francesc Casañas, director i mestre. Per donar-me l'oportunitat de participar en un projecte com aquest, de guiar-me en tot moment i junts aprendre tant d'un cultiu que ens era desconegut.

Als companys i amics de la Fundació, els que som i els que hi han sigut. Ana, Andrea, Aurora, Boi, Carme, Dani, Joan, Josep, Marçal, Nando, Roca, Roser i Toni. Gràcies per fer-me la feina més fàcil i entretinguda, l'*agrofitness* no seria el mateix sense vosaltres.

Als coautors dels diferents articles. Jordi, Laura i Ximo. Gràcies per fer-me entendre l'estadística i per introduir-me al fascinant món de la genètica molecular.

Als companys i amics de l'Escola. Ari, Clara, Cristina, Graciela, Jordis, Maria, Míriam, Olga, Sheiles, Rivia i Xavi. Alguns ja doctors, altres futurs doctors o tècnics, m'ho heu fet passar molt bé, i he après de tots, espero que el futur no ens allunyi gaire.

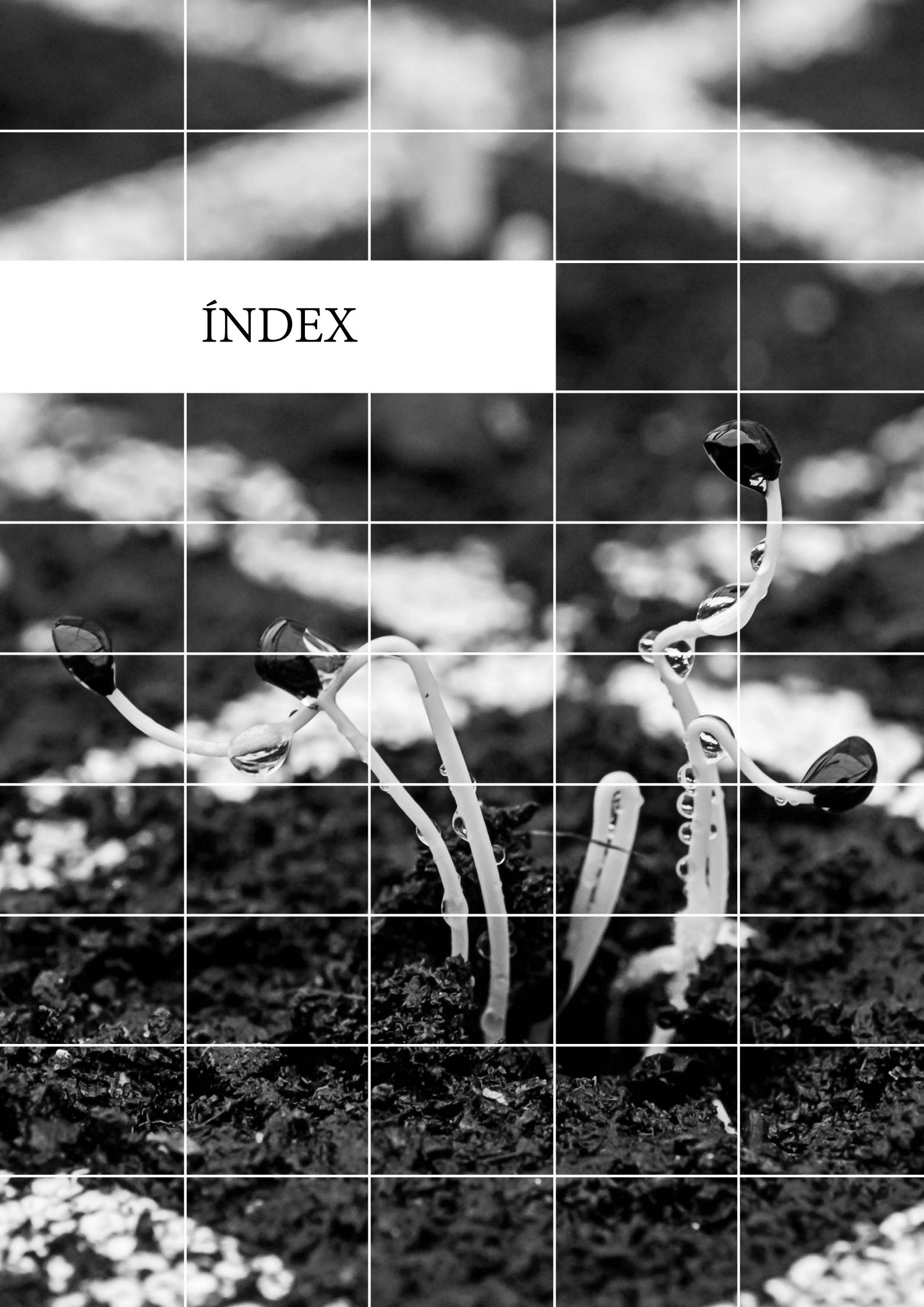
Als estudiants que han treballat amb nosaltres. Gerard, Gina, Marta, Sílvies i Xavi. Gràcies per la vostra ajuda i que tingueu un esplèndid futur com a enginyers que segur que ho serà.

Als amics de l'Autònoma, amb vosaltres vaig passar una de les millors etapes de la meva vida, i m'heu ajudat a passar-ne una altre, que no diria que ha estat pitjor, però si clarament diferent. Alba, Albert, Berta, Caro, Keyvan, Mireia, Montse, Nere, Neus, Nil, Oriols i Pau. Gràcies i visca la Biocalçotada (cada any que passa la faig amb més coneixement de causa).

Als amics, Sant Benet deia *Ora et Labora*, actualitzat hauria de ser *Vita et Labora*, està clar que la *vita* al vostre costat és molt millor. Cristòbal, Diego, Lara i Víctor, moltes gràcies i a seguir vivint.

Finalment i no per això menys important, a la família, als tiets, cosins i avis, especialment a l'avi Esteve, estic segur que li hagués encantat veure la tesi acabada i poder explicar a la gent que els seu net ja és definitivament el doctor calçot. Als pares i germana, moltes gràcies per acompanyar-me, i ajudar-me sempre que ho he necessitat. I, evidentment, a la Marina. Sens dubte ets qui tens més part d'aquesta tesi, amb tu serveixen pràcticament tots els agraïments, m'has ajudat venint al camp, escrivint, escoltant, però sobretot m'has ajudat vivint, gràcies per ser-hi i ara que els dos som doctors haurem de començar a pensar que fem amb el temps lliure.

ÍNDEX



ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	13
Primera Part: El calçot	15
1.1 Descripció botànica	15
1.2 Història	18
1.3 El cultiu	19
1.4 Importància econòmica	21
1.4.1 La ceba	21
1.4.2 El calçot	22
1.5 La IGP “Calçot de Valls”	24
Segona Part: La millora del calçot	26
2.1 Elaboració d'un idiotip	26
2.2 Selecció el primer any (relació ceba-calçot)	27
2.3 Modelització del creixement	27
2.4 La millora ambiental	28
2.5 La millora genètica	28
2.5.1 L'herència dels caràcters	28
2.5.2 Variabilitat genètica	31
2.5.3 Del fenotipat d'ADN al Genotipat	31
2.5.4 Fenotipat de caràcters comercialment importants en les cebes i els calçots. Els atributs sensorials	34
2.5.5 Estratègies de millora en cebes	35
OBJECTIUS	39
RESULTATS	43
Capítol 1. <i>Tools for breeding ‘calçots’ (Allium cepa L.), an expanding crop</i>	45
Capítol 2. <i>Modelling ‘calçots’ (Allium cepa L.) growth by the Gompertz function</i>	57
Capítol 3. <i>Spanish onion landraces (Allium cepa L.) as sources of germplasm for breeding calçots: a morphological and molecular survey</i>	71
Capítol 4. <i>Breeding onions (Allium cepa L.) for consumptions as ‘calçots’ (second-year resprouts)</i>	87
Capítol 5. <i>‘Roquerola’ and ‘Montferri’, first improved onion (Allium cepa L.) cultivars for ‘calçots’ production</i>	95
DISCUSSIÓ	99
2.1 Elaboració d'idiotips	101
2.2 Selecció el primer any (relació morfologia de la ceba-nombre de calçots)	102
2.3 Modelització del creixement	103

2.4 La millora ambiental	104
2.5 La millora genètica	104
2.5.1 L'herència dels caràcters	104
2.5.2 Variabilitat genètica	104
2.5.3 Del fenotipat d'ADN al Genotipat	106
2.5.4 Fenotipat de caràcters comercialment importants en les cebes i els calcots. Els atributs sensorials	108
2.5.5 Estratègies de millora en cebes	110
2.6 El cultiu del calçot: passat, present i futur	110
CONCLUSIONS	113
ABREVIATURES	117
BIBLIOGRAFIA	121



INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

PRIMERA PART: EL CALÇOT

1.1 DESCRIPCIÓ BOTÀNICA

Els calçots són les tiges florals immadures de la ceba (*Allium cepa* L.) i apareixen durant el segon any de cultiu un cop passat el procés de bulbificació (Figura 1). Malgrat els calçots que es consumeixen habitualment són produïts únicament per una varietat de ceba, la Blanca Tardana de Lleida (CBTL), totes les varietats de ceba produueixen calçots, variant en nombre, morfologia i color. La producció, comptabilitzada en número de calçots, així com la morfologia i el color d'aquests varia notablement dependent de la varietat de ceba. Existeixen varietats que només produueixen un calçot mentre que d'altres són capaces de desenvolupar-ne més de quaranta. La morfologia varia tant en longitud com en diàmetre, existint una correlació negativa entre el nombre de calçots i el seu diàmetre. El color extern dels calçots, sovint va relacionat amb el color de la pell del bulb de primer any.



Figura 1. Diferents etapes del cicle de desenvolupament del calçot (Varietat Blanca Tardana de Lleida): A) pocs dies després de germinar, B) ceba a punt per ser collida, C) els rebrots d'una ceba partida, i D) calçots collits a punt per ser comercialitzats.

El cicle de la ceba es pot dividir en quatre fases principals: 1) fase juvenil; 2) fase tèrmica; 3) fase de competència; i 4) fase de finalització (Figura 2) (Kampen, 1970). Durant la fase juvenil tenen lloc la germinació i l'emergència de la llavor, les quals es troben fortament influenciades per la temperatura, amb un òptim al voltant dels 25°C (Taula 1). En aquesta primera fase, la ceba passa de l'estat de plàntula al què s'anomena planta juvenil. Durant aquest procés la planta té un creixement dual. Per una banda, desenvolupa la part aèria amb una predominança pel creixement foliar; aquest tipus de creixement ve determinat per una ràtio entre llum vermella (660 nm) i vermella llunyana (730 nm) elevada, un fotoperíode curt i baixes temperatures. Per altra banda, hi ha un desenvolupament del bulb, determinat per una baixa proporció de la ràtio entre llum vermella i vermella llunyana, fotoperíodes llargs i altes temperatures (Brewster, 2008). La fase juvenil acaba quan la planta assoleix una mida suficient per tal de ser induïda a floració, mida molt variable segons el cultivar (Figura 2).

· 16 ·

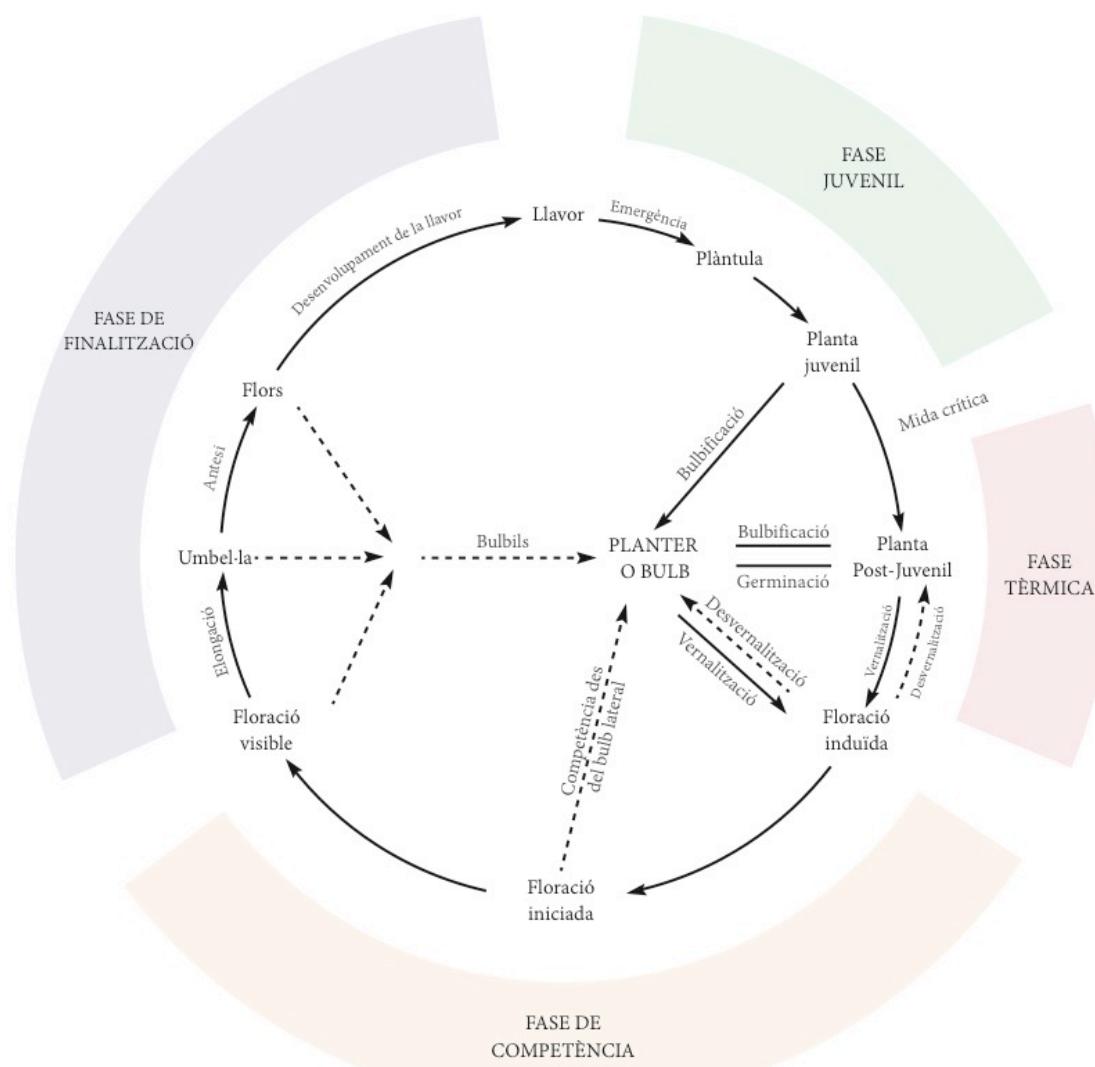


Figura 2. Etapes en el cicle vital de la ceba. Els processos poc habituals o reversibles estan indicats en línia discontinua. Modificada de Brewster (2008).

Durant la segona fase, anomenada fase tèrmica o termo-fase, es produeix la vernalització, tant si es tracta d'una planta post-juvenil com si es tracta d'un bulb (Figura 2). Aquest procés es produeix amb temperatures òptimes entre 8-12°C (Taula 1). Un cop transcorregut un temps en aquest rang de temperatures, que altra vegada varia molt segons el cultivar, la floració queda induïda. Aquest procés és reversible, doncs es pot produir una desvernalització amb un tractament tèrmic al voltant dels 28°C (Figura 2).

Un cop la planta ha estat induïda a floració s'inicia la fase de competència, que deu el nom a la "competència" que existeix entre el desenvolupament de bulbs per part de les gemmes laterals i la inflorescència. És durant aquesta fase que es desenvolupen els calçots. La fase de competència s'acaba amb l'inici de l'elongació de l'escap i, per tant, la visibilitat de la poncella (Figura 2), i és llavors quan s'inicia la fase de finalització, relacionada amb un augment de les temperatures fins a un rang òptim d'entre 25 i 30°C (Taula 1). L'elongació de l'escap (acostuma a fer entre 1-2 m) finalitza amb l'aparició de la umbella i la posterior antesi per donar lloc a entre 400-600 flors. Durant el procés d'elongació i antesi, un augment perllongat de les temperatures (per sobre els 28°C) pot donar lloc a l'aparició d'elements de reproducció asexual com són els bulbils (Figura 2). Amb l'obertura de la umbella i l'aparició de les flors, s'inicia el procés de pol·linització, majoritàriament entomòfila, i que es veu afavorida per temperatures al voltant de 27°C i una humitat relativa alta (Taula 1). La fase de finalització i, per tant, el cicle, acaba amb el desenvolupament de la llavor, que es pot veure truncat per temperatures superiors a 50°C.

Taula 1. Requeriments tèrmics i altres factors importants per les diferents fases del cicle de la ceba implicats en el desenvolupament de la inflorescència (Brewster, 2008).

Estadi de desenvolupament (Fase)	Temperatura (°C)		
	Òptima	Rang	Altres factors importants
Germinació (juvenil)	25	0 - 37	Aigua, ventilació
Emergència (juvenil)	20 - 25	13 - 28	Aigua, ventilació
Creixement vegetatiu (juvenil)	20 - 25	10 - 35	Llum, aigua, nutrients, fotoperíodes més curts que durant la bulbificació
Vernalització (tèrmica)	8 - 12	2 - 17	Baixos nivells de N, alts nivells de carbohidrats solubles, fotoperíodes llargs
Desenvolupament de la inflorescència en planta o bulb (Competència)	15 - 17	10 - 18	Nivells normals de N (3-3.5% dm), fotoperíodes llargs
Elongació de l'escap (Finalització)	25 - 30	15 - 40	
Antesi (Finalització)	25 - 30	15 - 35	Obertura dels capítols en llum diurna
Pol·linització (Finalització)	27	15 - 43	Humitat Relativa <70% incrementa la propagació del pol·len
Desenvolupament de la llavor (Finalització)	25 - 30	15 - 43	50°C és letal

1.2 HISTÒRIA

A diferència de la majoria d'espècies cultivades, avui en dia encara es desconeix quin és el parent silvestre del qual es va domesticar la ceba. De totes maneres Hanelt (1990) va postular *Allium vavilovii* com l'espècie silvestre actual més pròxima a la ceba. Estudis més recents fets a nivell molecular semblen confirmar aquesta teoria (Friesen i Klass, 1998; Fritsch *et al.*, 2001). El que si que sabem del cert és que la ceba és un dels cultius més antics que es coneixen. En espècies com la ceba, on la part comestible és un bulb carnós, la reconstrucció de la història resulta més complicada que en altres cultius on el que es menja són les llavors, preparades per aguantar llargs períodes de temps, com els cereals. En el cas de la ceba cal recórrer a pintures o gravats per tal d'esbrinar des de quan es consumeixen. És a l'antic Egipte on trobem les primeres proves gràfiques del consum de ceba en gravats a les tombes de la tercera i quarta dinastia (2700 aC). Aquests documents juntament amb mencions bíbliques al llibre de l'Èxode i evidències del consum a Mesopotàmia, fa pensar que la domesticació de la ceba comença fa uns 5000 anys, segurament de manera simultània a diferents zones que inclourien els actuals Iran i l'oest i zones muntanyoses del nord de Pakistan. No obstant, el fet que encara es desconegui el parent silvestre directe de la ceba, fa que la zona de domesticació sigui força difusa (Jones i Mann, 1963; Hanelt, 1990; Havey, 1995). Es creu que durant la domesticació es va afavorir un canvi en el patró al-lomètric del creixement de la planta en favor del bulb, acurtant el cicle de vida de la planta a la biennalitat i afavorint l'adaptació a un gran nombre d'ambients (Hanelt, 1990). A Europa arriba a partir dels Minoics (2000 – 1400 aC), una civilització amb gran poder marítim durant aquesta època. Tant la cultura grega com la romana en fan un gran ús, i són molts els escriptors grecs que en fan referència. Durant l'edat mitjana, l'ús de la ceba va esdevenir de gran importància a tota Europa, donat el triple ús que se'n feia: hortalissa carnosa, condiment i ús medicinal. A Amèrica arriba de la mà dels primer descobridors, i es té constància que Colom les va plantar a les Índies el 1494 (Carravedo i Mallor, 2007).

. 18 .

En comparació amb la ceba, el calçot és un cultiu extraordinàriament modern i fins al moment molt local. Es creu que, a finals del s. XIX, un pagès de Valls, en Xat de Benaiges, va descobrir els calçots tirant a la brasa uns brots de ceba vella. Aquests es van cremar per fora però van quedar tendres per dins. També és a ell a qui se li atribueix l'ús de la salsa típica que va associada amb aquest plat, la salsa salvitxada o romesco, elaborada a base d'ametlla, avellana, nyora, tomàquet, all, vinagre i oli d'oliva (Lladonosa, 2005).

A principis de segle XX, el consum de calçots quedava relegat a les celebracions d'algunes famílies de Valls i no és fins a mitjans del segle passat, quan es comença a popularitzar. Primer a través de calçotades populars i, posteriorment, transcendint les comarques tarragonines fins a estendre's arreu de Catalunya i fins i tot en altres punts d'Espanya.



Figura 3. Pintura romana del segle III descoberta a Szony (Hongria) on s'hi pot observar un home menjant el que recorden els calçots actuals (www.elpuntavui.cat).

que és atribuïble al seu descobriment o redescobriment, per part del Xat de Benaiges.

1.3 EL CULTIU

El cultiu dels calçots és biennal; el primer any és anàleg a un cultiu convencional de ceba i és a partir de la recol·lecció del bulb que és específic del cultiu de calçots (Figura 4). En climes mediterranis el planter de la ceba s'inicia a finals de novembre, quan es sembra la llavor per ser cultivada en hivernacle. Aquesta germina i es desenvolupa fins el mes de gener, quan és trasplantada al camp. Tal i com s'ha esmentat en el primer apartat, durant els primers estadis la planta desenvolupa principalment noves fulles i enforteix el sistema radicular i, posteriorment, inicia el procés de bulbificació que consisteix en una alentiment del creixement del sistema vegetatiu aeri i la mobilització de substàncies de reserva a la base de les fulles interiors, que s'engrosseixen i donen lloc al bulb. Amb el bulb ja format, la part vegetativa aèria entra en decadència fins que s'asseca. Durant el mesos d'estiu el bulb és retirat del camp i emmagatzemat en sacs o caixes.

Entre mitjans d'agost i principis de setembre aquests bulbs són retrasplantats en un nou camp de cultiu. La data de plantació dependrà molt del clima de la zona: en els climes més interiors de la zona típica de cultiu a l'entorn de Valls, es solen trasplantar més aviat, per tal que la planta estigui suficientment desenvolupada com per aguantar els primersfreds, mentre que a la costa s'intenta posposar el trasplant per tal d'evitar les calor dels mesos d'estiu que, juntament amb la humitat de la costa, esdevé una situació ideal per al desenvolupament de malalties fúngiques.

Els bulbs es planten en solcs separats uns 75 cm i amb una distància entre cebes de 30 cm, resultant unes densitats de plantació al voltant de 32,000 cebes/ha. Amb els primers regs (o pluges) la ceba rebrota i comença a desenvolupar les noves tiges que esdevindran calçots. Durant els mesos de novembre i desembre

L'ús dels rebrots de la ceba no és un fet ni tant local ni tant recent; de fet, autors romans com Apicius ja parlen de receptes de *Porrus capitatus* a la brasa. A més, recentment, l'arqueòleg László Borhy ha descobert una pintura romana del s. III a l'actual població de Szony (Hongria), Brigetio, durant l'època romana. En aquesta pintura es pot observar una persona menjant el que semblen calçots, o el que s'anomenava en aquella època *Porrus capitatus* (Figura 3). Actualment el consum dels rebrots de la ceba és una pràctica habitual per tal de disposar de ceba durant tot l'any, encara que sovint aquests rebrots són consumits com a cebes tendres. Certament, doncs, l'ús dels rebrots de la ceba és difícilment atribuïble al pagès de Valls però, segurament, el fet que el consum de calçots vagi més enllà del simple fet d'alimentar-se i que s'hagi convertit en un menjar associat a les celebracions, si

es procedeix a cobrir de terra la part inferior de la planta per tal que aquesta quedi blanca i més agradable alhora de menjar. D'aquest procés se n'anomena recalçar i d'aquí deuen el seu nom els calçots.

A partir del més de novembre, els calçots van assolint una mida suficient com per ser consumits i és llavors quan, fins el més d'abril, s'inicia el procés de recol·lecció. La collita acostuma a ser un procés manual ja que consisteix en anar passant pel camp per tal de determinar quina de les motes (conjunt de calçots provinents d'una única ceba) conté un nombre suficient de calçots aptes pel consum. És important que tots els calçots d'una mateixa mota esdevinguin comercials al mateix moment ja que aquesta es cull sencera i, per tant, aquells calçots que no arribin a la mida mínima considerada per l'agricultor no podran ser comercialitzats.

• 20 •

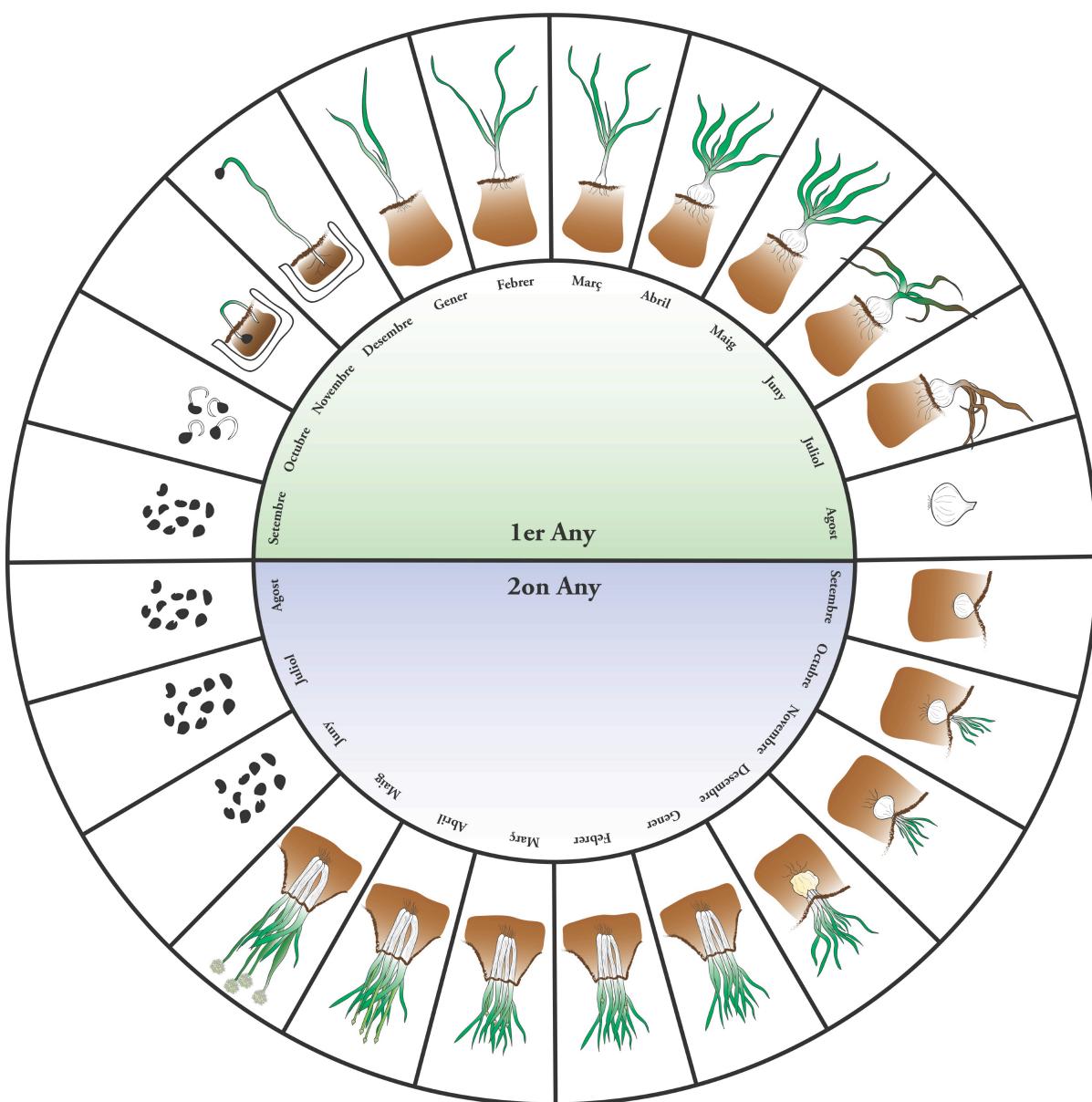


Figura 4. Diagrama circular del cultiu biennal del calçot.

El cultiu finalitza amb l'elongació de l'escap i l'emergència de les flors, quan la part interior del calçot esdevé més fibrosa i deixa de ser agradable al consum. En cas que sigui necessària la recol·lecció de la llavor, es deixa créixer la tija i a finals de maig la poncella situada a la part terminal de la tija s'obre donant lloc a la inflorescència en forma d'umbel·la formada per centenars de flors (Figura 4).

1.4 IMPORTÀNCIA ECONÒMICA

1.4.1 La ceba

Segons dades de la *Food and Agriculture Organization* (FAO), l'any 2011 hi havia més de 4.5 milions d'hectàrees destinades a la producció de ceba a nivell mundial, amb una producció de més de 90 milions de tones. En els darrers 50 anys aquesta producció s'ha multiplicat per gairebé sis (5.96), mentre que l'increment de superfície únicament ho ha fet 3.49 vegades (Figura 5). Això comporta que el rendiment del cultiu de ceba a nivell mundial ha passat d'aproximadament 11 tn/ha el 1961 fins les 20 tn/ha actuals (tant el rendiment com l'increment en els últims anys són molt similars al del conjunt d'hortalisses) (Figura 5). Tal i com ocorre en moltes altres espècies, el fort augment tant en superfície com en producció ha estat conseqüència de l'increment d'ambdós paràmetres en el continent asiàtic, que actualment representa el 70% del cultiu de ceba mundial amb una tendència de creixement de la producció des del 1961 pràcticament paral·lela a la mundial (Figura 5).

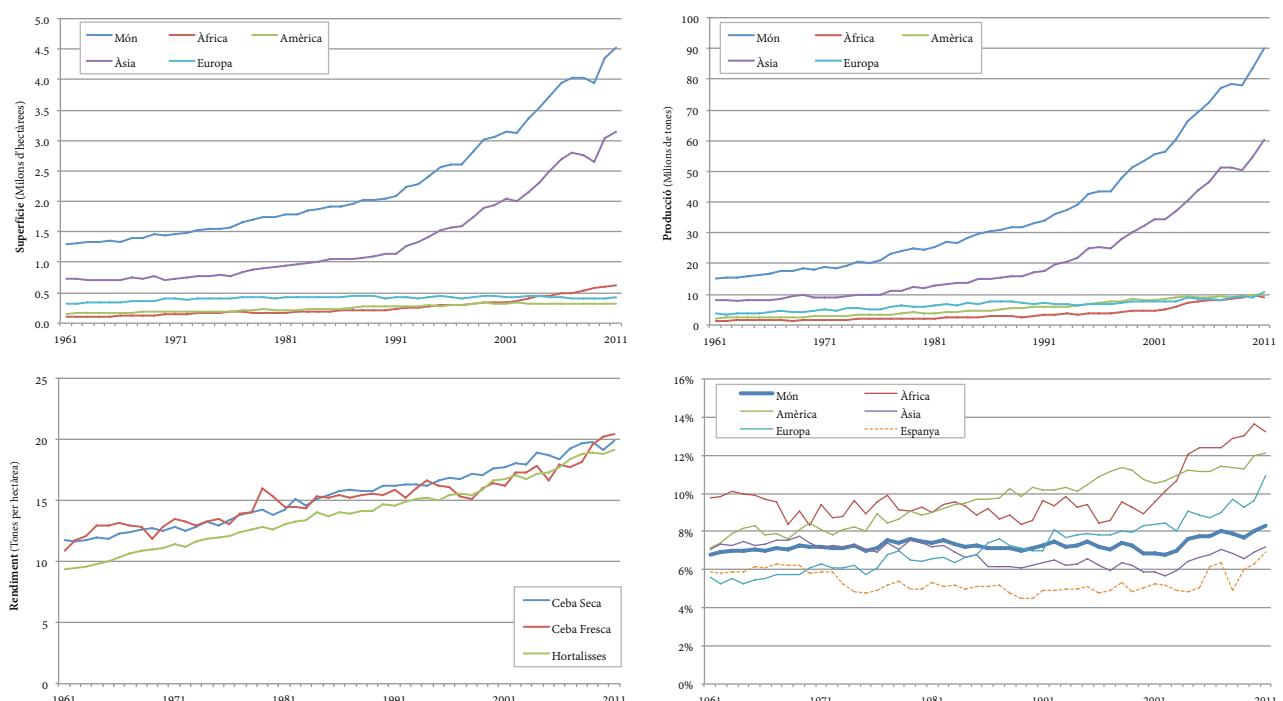


Figura 5. A dalt, evolució de la superfície cultivada i producció de ceba els darrers 50 anys per continents (s'ha agrupat el cultiu de ceba seca i ceba fresca). A baix a l'esquerra, evolució del rendiment a nivell mundial del cultiu de ceba fresca, ceba seca i la mitjana del conjunt de les hortalisses, i a baix a la dreta, evolució del percentatge que representa la producció de ceba respecte a la producció total d'hortalisses per continents i a Espanya. (Font: elaboració pròpria a partir de FAOSTAT (2013))

Pel que fa al pes específic del cultiu de la ceba dins el grup de les hortalisses, s'observa que el percentatge de producció que representa la ceba s'ha mantingut constant al voltant del 7% durant els darrers 50 anys, incrementant fins al 8% en els últims 10. Aquest percentatge varia molt segons el continent, sent Àfrica i Amèrica on la ceba té una major importància (Figura 5).

A nivell de l'Estat Espanyol, segons dades del *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente* (MARM), l'any 2012 l'àrea de cultiu destinada a la ceba va ser de 17,507 ha, sent el tercer cultiu d'hortalisses més important després del meló (*Cucumis melo L.*) i l'all (*Allium sativum L.*) (22,725 i 19,575 ha respectivament). Cal destacar, però, que la patata (*Solanum tuberosum L.*) i el tomàquet (*Solanum lycopersicum L.*) per indústria no estan inclosos dins aquesta categoria. Segons dades de la FAO dels darrers 50 anys (FAOSTAT, 2013), el percentatge de la producció de ceba a nivell de l'Estat Espanyol representa entre el 5% i el 6% sobre la producció total d'hortalisses (Figura 5).

A nivell català, segons dades del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (DAAM), l'any 2011 es van cultivar a Catalunya 981 ha de ceba amb una producció de 32,421 tones (aquestes dades inclouen la producció de ceba i calçot), fet que suposa un rendiment de 33 tn/ha, molt per sobre de les 20 tn/ha que segons la FAO hi ha actualment de mitjana a nivell mundial. Cal destacar que, malgrat en les dades mundials s'observa un increment de la superfície de cultiu, a Catalunya la tendència ha estat a la inversa i s'ha passat de les 1,765 ha el 1,999 fins les 713 ha actuals.

. 22 .

1.4.2 El calçot

Actualment no es disposa de registres oficials d'àrea de cultiu o producció de calçots ja que queden inclosos dins les dades de ceba i, per tant, és impossible destriar les unes de les altres. Les úniques dades existents són les que facilita Mercabarna. En elles s'indiquen els calçots que es venen dins el Mercat Central de Fruites i Hortalisses (MCFH). Per tant aquests són una petita proporció del total de calçots que es produueixen ja que no tots els calçots que es venen a Mercabarna passen pel MCFH i no tots els calçots que es produueixen passen per Mercabarna. La realització de diverses entrevistes amb diferents agents del sector ens ha permès estimar que els calçots que es venen al MCFH representen aproximadament el 25% de la producció total de calçots. Aquestes dades, doncs, ens han de permetre obtenir una visió general de quina ha estat l'evolució del cultiu els darrers anys i quin pes representa el cultiu del calçots dins l'agricultura catalana, ja que malgrat no ser una radiografia completa de la producció de calçots, l'obtenció de les dades els darrers anys s'ha realitzat de la mateixa manera i per tant la comparació entre anys és completament vàlida.

Durant la campanya 2012-2013, es van comercialitzar un total de 12 milions de calçots dins el MCFH, dels quals un 98.07% procedien de Catalunya, majoritàriament de Tarragona i Barcelona (42.15% i 52.10% respectivament). En els últims anys, la producció de calçots s'ha anat incrementant, augmentant dels aproximadament 8 milions la temporada 2006-07 fins els més de 12 milions de la present campanya, amb pics de producció de fins els pràcticament 16 milions la temporada 2010-11 (Figura 6). Així doncs, existeix una tendència clarament a l'alça en la producció de calçots en els darrers anys, amb oscil·lacions molt importants que sovint també impliquen grans variacions en el preu, passant de 7 cèntims d'euro per unitat la campanya 2010-11 (coincident amb el màxim de producció), fins els 14 cèntims la temporada 2008-09

(Figura 6). Malgrat s'ha incrementat lleugerament els darrers tres anys, la producció de calçots fora de Catalunya segueix sent residual, no superant mai el 5% de la producció total.

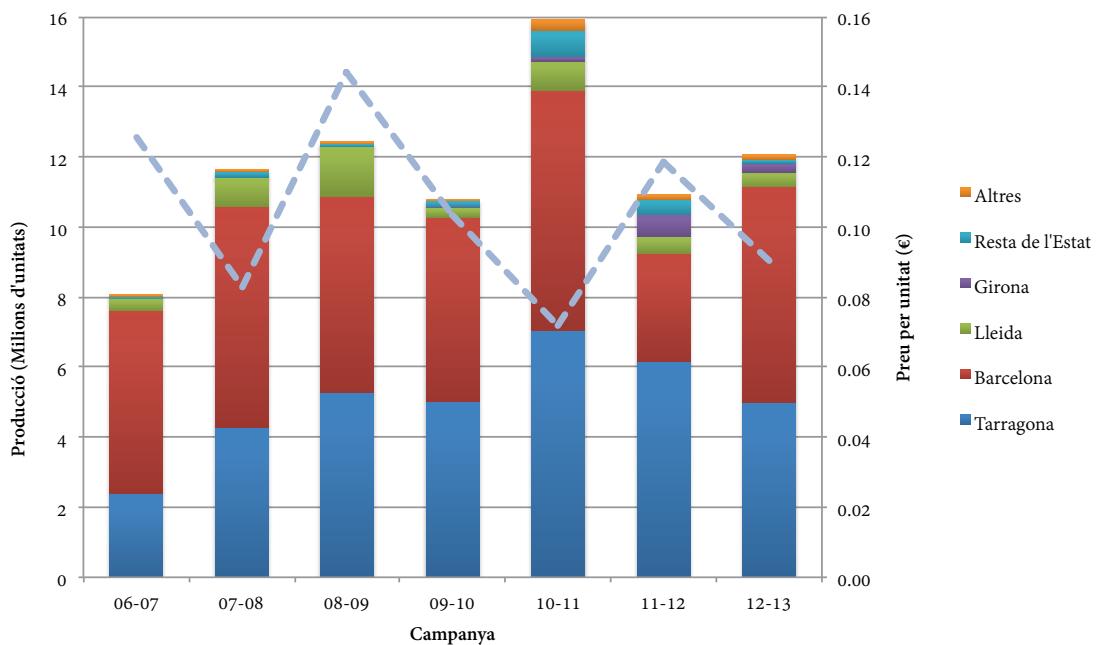


Figura 6. Evolució de la producció (Columnes) i preu de calçots per províncies (Línia) i per temporada de cultiu, d'octubre a maig. (font: elaboració pròpia a partir de dades de Mercabarna (2013))

· 23 ·

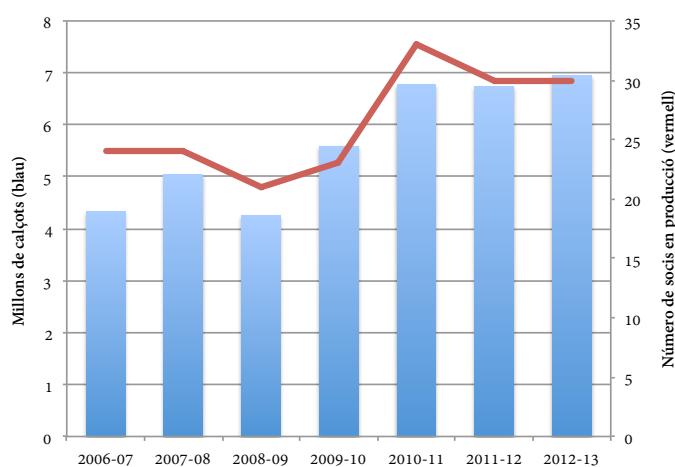
Si posem en context aquests valors s'observa que els calçots, l'any 2012 van representar el 0.5% del volum de comercialització (calculat a partir del volum econòmic que generen) de les hortalisses comercialitzades al MCFH amb una facturació total de practicallyment 1.5 milions d'euros sobre els 290 milions de facturació global. Tenint en compte només la producció a Catalunya, el percentatge augmenta fins el 2.74% situant el calçot com la dotzena hortalissa pel que fa al volum de mercat, sent la patata blanca (12.54%) i la ceba (7.20%) els productes amb valors més grans. La tendència del volum de mercat dels calçots dins l'agricultura catalana en els darrers anys és d'un increment praticament constant, passant de l'1.38% (920,000€) el 2006 fins el 2.74% (1,280,000€) de l'any 2012 (exceptuant el pic del 2009, amb un 3.10% (1,740,000€)). En el cas dels productes provinents de la província de Tarragona, els calçots passen a ser l'hortalissa més important amb un volum de mercat que representa el 13.15% (775,500€) de la producció total d'hortalisses en aquesta província. L'estacionalitat del cultiu fa que les produccions quedin concentrades sobretot els mesos de febrer i març, situant el calçot com el vuitè producte amb més volum de comercialització dins el conjunt de fruites i hortalisses del MCFH al mes de febrer (3.85% respecte el volum total del MCFH) i el cinquè del mes de març (5.09%).

Així doncs, tot i el component estacional del cultiu del calçot, aquest representa un percentatge important pel que fa al valor de mercat dins l'agricultura catalana, i malgrat el calçot no es considera un aliment de primera necessitat, el seu pes a l'agricultura augmenta any rere any.

1.5 LA IGP “EL CALÇOT DE VALLS”

La Indicació geogràfica protegida (IGP), així com la Denominació d’Origen Protegida (DOP), són segells de qualitat creats per la Unió Europea per tal de reconèixer productes agroalimentaris procedents d’una zona geogràfica determinada, els quals mostren característiques especials precisament degudes a aquest origen (Comissió Europea, 2006). A Catalunya hi ha 12 DOPs (2 en procés de reconeixement) i 9 IGPs (1 en procés de reconeixement) que distingeixen una varietat molt gran de productes, com l’oli (Siurana, Terra Alta, Garrigues, Baix Ebre- Montsià o Empordà), la mongeta (Ganxet i Santa Pau), l’Arròs del Delta de l’Ebre, la Pera de Lleida, la Poma de Girona, el Torró d’Agramunt o la Llonganissa de Vic.

Des de l’any 2001 existeix la Indicació Geogràfica Protegida Calçot de Valls, no obstant no és fins el 2009 que es va aprovar el Reglament (DAAR, 2009). Segons aquest reglament, la producció de calçots sota el distintiu de la IGP queda restringida a 4 comarques: Alt Camp, Baix Camp, Tarragonès i Baix Penedès. La única varietat admesa dins la IGP és la Ceba Blanca Tardana de Lleida (CBTL). Els calçots de la IGP es comercialitzen amb feixos de 50 o 25, lligats amb fil blau i amb una etiqueta identificativa i numerada. Per tal que un calçot pugui ser comercialitzat sota el segell de la IGP ha de tenir una llargada de la part blanca d’entre 15 i 25 cm, i un diàmetre d’entre 1.7 i 2.5 cm, mesurat a 5 cm de l’arrel.



La campanya 2012-2013 la IGP Calçot de Valls ha estat formada per 42 socis, nombre molt semblant al dels últims anys. D’aquests socis, una trentena van comercialitzar calçots amb l’etiqueta de la IGP, essent aquest nombre similar al dels últims 3 anys i superior als anteriors (Figura 7). Segons estimacions fetes a partir de les etiquetes venudes la campanya 2012-2013, la IGP Calçot de Valls en va produir pràcticament 7 milions en els

últims 3 anys, mostrant una tendència a l’alça respecte a les anteriors campanyes (Figura 7). Tenint en compte el nombre de calçots produïts i el nombre de socis comercialitzadors, durant la campanya 2012-2013 cada soci va produir de mitjana 231,500 calçots, valor molt similar a la resta de campanyes.

Si es consideren les estimacions de producció de calçots a Catalunya fetes a partir de les dades facilitades per Mercabarna, la temporada 2012-2013 es van produir més de 48 milions de calçots. Per tant la producció de calçots per part de la IGP, amb vora 7 milions, va representar el 14.4% de la producció total de calçots a Catalunya. Des de l’any 2006, aquest valor varia des del 8.57% de la temporada 2008-2009, fins el 15.40% de la campanya 2011-2012, amb una valor mitjà de 12.32%.

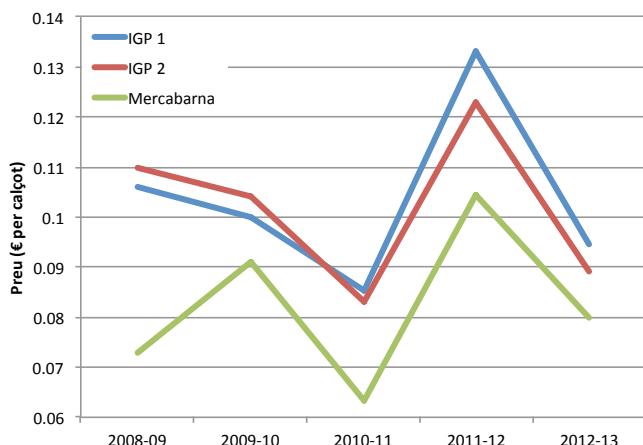


Figura 8. Comparativa dels preus percebuts per l'agricultor, entre calçots etiquetats sota la IGP i la mitjana de preus de Mercabarna.

el 25% de calçots produïts passen per Mercabarna, i la resta es venen a través de venda directa, a particulars o restaurants, a partir de minoristes o directament a les grans cadenes de distribució. És per això que resulta difícil determinar si existeix un guany clar gràcies a la comercialització a partir del segell de la IGP. A partir de dades facilitades per dos agricultors de la IGP i contrastant-ho amb les dades facilitades per Mercabarna, es pot estimar quin és aquest benefici en els calçots comercialitzats a Mercabarna. S'observa com en els últims 5 anys els calçots comercialitzats sota el segell de la IGP han assolit un major preu que la resta de calçots, amb un increment que va des del 10.5% la temporada 2009-2010 fins el 32.5% la temporada 2008-2009, amb una mitjana de pràcticament el 20% (Figura 8).

La comercialització de calçots a través de la IGP comporta sovint una disminució en el rendiment ja que degut a l'estricte barem per tal de considerar un calçot comercial, un elevat nombre de calçots ha de ser descartat. No obstant el fet de comercialitzar sota un segell de qualitat hauria de garantir un major preu percebut per part de l'agricultor. La comercialització dels calçots per part dels productors es realitza a partir de diferents canals. Com hem vist només

SEGONA PART: LA MILLORA DEL CALÇOT

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, el calçot és un dels cultius més importants de Catalunya, el qual ha experimentat, a més, un increment notable de la producció en els darrers anys. Malgrat això, en el moment d'iniciar aquesta tesi doctoral només es disposaven de tres estudis envers aquest cultiu. El treballs, tots ells publicats per un grup de recerca del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) encapçalat pel Dr. Pere Muñoz es centraven en: a) la descripció dels aspectes agronòmics del calçot, centrant-se, entre d'altres, en la idoneïtat de realitzar una pràctica llavors comú en el cultiu com tallar la ceba per la meitat abans de plantar-la (Muñoz *et al.*, 2003), b) la variabilitat dels caràcters productius (nombre de calçots) i qualitatius (morfologia del calçot) en diferents poblacions cultivades (Muñoz *et al.*, 2003, 2006), i c) la resposta d'una població a l'adobat condicions de cultiu ecològic (Muñoz, 2011). Els resultats indicaven que la pràctica tradicional d'escapçar la ceba abans de replantar-la influïa d'una manera pràcticament nul·la en la producció de calçots però, en canvi, podia afavorir la transmissió de malalties entre les cebes (Muñoz *et al.*, 2003). Per altra banda, els estudis realitzats amb diferents poblacions (algunes comercials i d'altres provinents de planteristes que fan les seves pròpies seleccions) mostraven una certa variabilitat en els caràcters productius i de qualitat. Alhora es van detectar importants diferències entre els resultats de les mateixes poblacions en anys diferents (Muñoz *et al.*, 2003, 2006). Un fet similar succeeix en l'estudi sobre calçots en cultiu ecològic, on varen observar una bona adaptació de la varietat a la dosi d'adob subministrada, però els resultats varen ser molt diferents, pel que fa a caràcters productius i de qualitat, entre els dos anys de l'estudi (Muñoz, 2011). Les diferències observades entre les poblacions estudiades així com les diferències detectades entre els diferents anys, posaven de manifest l'existència de variabilitat genètica i d'un fort efecte ambiental.

. 26 .

Per altra banda sabíem, a través dels agricultors, que el germoplasma majoritari usat normalment dins de la IGP els darrers anys, havia experimentat un fort decrement en el nombre de calçots comercials per mota. També coneixíem l'existència d'algunes seleccions fetes per agricultors, així com els diferents materials experimentats per Muñoz i col-laboradors (2003, 2006, 2011).

Existia, doncs, una preocupació per part dels productors referent a la disminució del número de calçots comercials per ceba, i malgrat els resultats aportats per Muñoz i col-laboradors, es desconeixien els factors que podien afectar el cultiu del calçot. Així doncs, per endegar processos eficients de millora calia dur a terme un estudi a fons de diversos aspectes d'aquest cultiu, com ara el nombre idoni de calçots per mota, l'erència d'aquest i d'altres caràcters, l'efecte ambiental en la producció i qualitat, i, en general, la resposta de la planta a la millora genètica i/o ambiental.

A continuació es descriuen alguns dels aspectes que vàrem considerar més importants conèixer per abordar un procés de millora en els calçots i s'explica quin era el coneixement que es disposava sobre cada un d'aquests aspectes a l'hora d'iniciar la tesi.

2.1 ELABORACIÓ D'UN IDIOTIP

El terme idiotip va ser formulat per Donald l'any 1968 en un intent d'incorporar en una sola paraula els dos termes per excel·lència de la genètica: el genotip i el fenotip. Donald va definir la millora per idiotip com

una tercera via a les dos aproximacions bàsiques que existien a la millora fins llavors; la “supressió de defectes” i la “selecció per rendiment”. Aquesta tercera via tenia com a objectiu la reducció de la quantitat d’empirisme usant una aproximació més analítica i així incrementar l’eficiència en l’ús dels recursos i el temps en la selecció de material millorat (Sedgley, 1991).

Actualment, el terme idiotip s’usa d’una manera més àmplia ja que el terme ha transcendit de l’ús inicial que li va donar Donald. D’aquesta manera, l’idiotip d’una varietat o espècie pot ser tant l’òptim fisiològic d’aquesta varietat en unes condicions ambientals concretes, com també les característiques desitjades pels milloradors o agricultors d’una determinada varietat. Així, la recerca de l’idiotip esdevé el primer pas en el procés de millora ja que és la definició d’aquest la que ens marca quines són les característiques a assolir i, per tant, determina quins són els passos a seguir durant el procés de millora.

En ceba, els idiotips s’han basat tradicionalment en els aspectes productius del cultiu, la morfologia (incloent el color) i la pungència de la ceba. Altres aspectes destacats en els programes de millora en cebes són la precocitat en la maduració, l’existència d’un únic centre, la resistència a diferents patologies (sobretot a l’arrel rosada (*Phoma terrestris*) i a la fusariosi (*Fusarium sp.*)), la resposta a l’emmagatzematge i, en menor mesura, els aspectes nutricionals com la presència d’antioxidants i minerals (Cramer, 2000; Osman *et al.*, 2008; Bosch Serra i Currah, 2002; Yoo i Pike, 2001; Yoo *et al.*, 2006).

Pel que fa al calçot cal destacar que, en l’inici d’aquest treball de tesi no existia un idiotip clar per part dels agricultors, i es desconeixia quin nombre de calçots comercials seria desitjable que produís una ceba o quins atributs organolèptics determinen l’acceptació per part dels consumidors.

· 27 ·

2.2 SELECCIÓ EL PRIMER ANY (RELACIÓ CEBA-CALÇOT)

El caràcter biennal del cultiu del calçot esdevé un factor determinant a l’hora de dissenyar programes de millora. La necessitat de realitzar el fenotipat i la selecció durant el segon any, en el cultiu de calçot i no en el de la ceba, fa que els programes de millora esdevinguin llargs i costosos. Per aquest motiu, és molt important cercar correlacions entre paràmetres de la ceba i del calçot, que permetin una millor comprensió del comportament de la planta. Aquesta informació, inexistent a l’iniciar l’estudi, facilitaria i probablement escurçaria el procés de la millora.

2.3 MODELITZACIÓ DEL CREIXEMENT

En agricultura, el coneixement de com de grans es faran les plantes, com de ràpid creixeran o com els processos de creixement interaccionen amb l’ambient, suposa òbvies avantatges econòmiques i de maneig (Ismail *et al.*, 2003). A cada un dels estadis de desenvolupament del cultiu, les variables agronòmiques i pròpies d’aquest varien i, per tant, determinen el comportament del cultiu, ajudant a entendre com el clima influeix en els paràmetres de la collita, com interfereix amb el plantejament agronòmic, i com determina la magnitud fisiològica de l’estrès i els valors finals de productivitat (Simoes *et al.*, 2005). Tot això és especialment important en cultius que no es cullen al final del cicle biològic sinó en fases intermèdies que es consideren les òptimes per a al consum i que s’han d’identificar.

Existeixen dues aproximacions principals per a l'anàlisi de la corba de creixement: l'estadístic i el biològic. La primera és purament empírica, i consisteix en ajustar corbes polinòmiques a les dades mitjançant models univariants o multivariants. La segona busca un model amb bases biològiques i amb paràmetres interpretables biològicament per tal de descriure la corba (Ismail et al., 2003; Richards, 1959). Els models empírics més àmpliament usats pel creixement de les plantes són les funcions logístiques (Pearl i Reed, 1925) i les estretament relacionades funcions de Richards i de Gompertz (Amer i Williams, 1957; Gompertz, 1825, Richards, 1959).

Usant bases biològiques s'han descrit models que prediuen el creixement de diferents cultius com pastures (Barker et al., 2010; Cacho, 1993; Parsons et al., 1988, 2001), canya de sucre (*Saccharum sp.* L.) (Machado, 1981; Muchow et al., 1994; Simoes et al., 2005), tabac (*Nicotiana tabacum* L.) (Ismail et al., 2003) o blat de moro (*Zea mays*) (Ramachandra Prasad et al., 1992). L'any 1996, Tei i col·laboradors publicaven un model que predeia el creixement de les cebes usant les temperatures experimentades durant el cultiu (Tei et al., 1996).

Una de les característiques que fa especial el cultiu del calçot és la collita. La necessitat de collir la mota sencera en el moment de la recol·lecció fa que la homogeneïtat del creixement dels diferents calçots de cada mota sigui de vital importància. És per això que resulta convenient intentar predir el creixement dels calçots, de manera que sigui possible determinar quin és el millor moment per arrancar cada una de les motes. En el moment d'iniciar aquesta tesi no es va trobar cap treball realitzat sobre la modelització del cultiu dels calçots.

· 28 ·

2.4 LA MILLORA AMBIENTAL

Un dels aspectes claus a l'hora de realitzar millora genètica és saber quina part del fenotip ve determinada per aspectes mediambientals i quina ve determinada per la informació genètica. En el cas de la ceba hi ha bastants caràcters on s'ha analitzat quin pes té cada un d'aquests components. Un exemple és la pungència, on diversos autors han determinat que malgrat el contingut de sofre del camp de cultiu té una clara influència sobre el contingut d'àcid pirúvic en el bulb (mesura indirecta de la pungència) (Hamilton et al., 1997, 1998; McCallum et al., 2005), l'efecte genètic és el més determinant en l'expressió del caràcter (Enciso et al., 2009; Lee et al., 2008; Yoo et al., 2006).

Altres aspectes dels quals es té constància que l'ambient hi juga una paper destacat són els requeriments de nitrogen/sofre (Coolong i Randle, 2003; McCallum et al., 2005; Randle, 2000), la competència amb les males herbes (Menges i Tamez, 1981), i les necessitats hídriques (Kumar et al., 2007).

2.5 LA GENÈTICA I LA MILLORA GENÈTICA DE LES CEBES I ELS CALÇOTS

2.5.1 L'herència dels caràcters

L'any 1900 es reeditava una obra escrita l'any 1865, “*Versuche über Pflanzen-hybriden*” (“Experiments d'hibridació en plantes”), escrita per un religiós agustí i naturalista txec, on es describia com es transmetien alguns caràcters de la planta del pèsol d'una generació a l'altra, i esbossava el per què aquests caràcters es transmetien d'aquesta manera. Aquest treball ha passat a ser considerat com una de les principals

aportacions a la genètica, ja que d'ell en deriven les tres lleis més importants d'aquesta ciència i que actualment duen el nom del seu autor, Gregor Mendel, considerat per molts com el pare de la genètica. No obstant, tant Mendel com els seus redescobridors es van cenyir a un determinat tipus de caràcters que podien ser explicats de manera senzilla, seguint les lleis proposades, on les diferents variants de cada caràcter presentaven fenotips molt diferenciats. No obstant, i per desgràcia dels milloradors, molts dels caràcters d'interès agronòmic no es comporten així ja que presenten una variabilitat contínua, complicant la identificació de categories separades. Això va generar dos corrents d'opinió molt marcats entre els partidaris de la teoria de Mendel i els que defensaven que els caràcters als quals es referia Mendel eren meres excepcions. Aquesta diferència d'opinions va produir una de les disputes més fortes de la història de la biologia. No obstant, pocs anys més tard, gràcies entre altres als treballs de Johannsen en mongetes (1911) i de Nilsson-Ehle en blats (1911), es va posar llum a la controvèrsia. Es van corroborar els postulats de Yule, els quals suggerien que no era necessari interpretar com a contradictoris aquests dos tipus d'herència, ja que es podia considerar que els caràcters de variació contínua podien venir donats per l'efecte petit de molts gens. L'any 1916, els experiments d'East van provar d'una manera decisiva que l'herència dels caràcters quantitatius es podia explicar basant-se en la segregació de varis gens amb efectes semblants (Allard, 1960).

Així doncs, la base de la genètica proposada per Mendel és aplicable en els dos casos. En els casos del que s'anomena gens qualitatius, les proporcions esperades a la següent generació són de fàcil estimació, ja que el fet d'haver-hi pocs gens implicats facilita el seguiment i identificació de les combinacions. En canvi, en els casos on hi ha implicats un nombre important de gens, anomenats caràcters quantitatius, l'estimació esdevé molt complicada, sobretot tenint en compte que l'ambient sovint modifica el fenotip final de manera que no només la combinatòria genera un nombre molt elevat de possibles fenotips, sinó que al afegir-hi l'efecte ambiental, aquests queden totalment solapats entre ells. Per tant, a diferència del que passa amb els caràcters qualitatius, on les estimacions es fan basant-se en valors individuals, en la genètica quantitativa es treballa amb els valors mitjans de la població i la seva variació. A la vegada, per descriure com es transmeten els caràcters quantitatius dins d'una població s'han desenvolupat estimadors com ara l'heretabilitat en sentit ampli o en sentit estricto. La primera és el quocient entre la variància genètica i la variància total o fenotípica ($H = V_G/V_F$). La variància genètica es pot descompondre fonamentalment en tres components: l'additiu el dominant i el degut a les interaccions epistàtiques ($V_G = V_A + V_D + V_I$). D'aquestes tres únicament la component additiva contribueix a la semblança entre individus emparentats, per això la heretabilitat en sentit estricto definida com a el quocient entre la variància genètica additiva i la variància fenotípica ($h^2 = V_A/V_F$), és molt més informativa sobre l'herència dels caràcters i es prefereix a la heretabilitat en sentit ampli. En ceba, com en la resta d'espècies, trobem caràcters dels dos tipus. No obstant, destaca la poca presència de gens qualitatius en el control de caràcters d'interès agronòmic o comercial. Alguns exemples en són la resistència a un fong o la determinació del color. En el primer cas, malgrat ser encara un mecanisme desconegut, la resistència a la podridura basal per *Fusarium* (FBR) es postula com un caràcter governat per pocs gens. Bacher (1989) en proposa dos *Foc1* i *Foc2*, en canvi Tsutsui (1991) proposa que seria l'efecte d'un sol gen dominant el que controlaria la resistència a *Fusarium*. En el cas de la determinació del color del bulb, els estudis genètics de l'herència del color del bulb realitzats des dels anys 30, han determinat que les diferències qualitatives en el color venen donades per 5 loci majors, juntament amb un seguit de relacions epistàtiques entre ells (Clarke *et al.*, 1944; Davis i El-Shafie, 1967; Reiman 1931). Aquestes interaccions

epistàtiques entre els diferents gens impliquen que els cinc gens poden actuar seqüencialment al llarg de la via metabòlica de la síntesis del color. El gen *I* inhibeix el color en dominància, fent que la ceba esdevinguï blanca. El gen *C* és el que permet la presència de color, sent les plantes homozigòtiques recessives (*cc*) blanques. El *G*, per la seva banda, és el responsable del fenotip *chartreuse* (variant del groc) en l'homozigot recessiu, sent grogues les cebes amb els genotips restants. Finalment, els darrers dos gens són complementaris i necessaris per la producció del color vermell (Davis, 1967). Estudis posteriors han corroborat aquesta via, identificant un mutant en els gen codificant per la *xalcona isomerasa* (CHI) com a responsable de l'al·lel *g*, i que determina el color *chartreuse* o daurat, tal i com posteriorment s'ha batejat (Khar *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004). No obstant, segurament el gen qualitatiu més important en el cultiu de la ceba és el que causa androesterilitat, ja que les plantes que tenen l'al·lel mutat són incapaces de produir pol·len i, per tant, són incapaces d'autopolinitzar-se. Aquest caràcter és d'elevada importància ja que aquesta propietat ha estat usada per a la producció de noves varietats d'híbrids F1, que es detalla en el punt 2.5.5.

Tal i com s'ha mencionat, en els caràcters quantitatius és difícil determinar quins gens hi ha implicats i sovint els estudis es limiten a calcular com s'hereten. Alguns exemples poden ser caràcters com la pungència que mostra heretabilitats entre 0.4 - 0.75 (Galmarini *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 1995; Mallor *et al.*, 2011; Mallor i Sales, 2012; Simon, 1995; Wall *et al.*, 1996). Altres, com el contingut en sòlids solubles, mostren heretabilitats lleugerament superiors amb un rang entre 0.6 - 0.8 (Kadams i Nwasike, 1986; Lin *et al.*, 1995; McCollum, 1968; Wall i Corgan, 1999). Caràcters com la floració prematura mostren heretabilitats molt baixes que oscil·len entre 0 – 0.50 (Cramer, 2004, 2006). El percentatge de bulbs amb un sol centre també presenta una heretabilitat baixa 0.17 – 0.37 (Cramer, 2006; Wall *et al.*, 1996), i encara més la resistència a trips amb heretabilitats d'entre 0.04 i 0.08 (Hamilton *et al.*, 1999).

. 30 .

En resum, en ceba, s'han pogut identificar gens responsables d'alguns dels caràcters importants com el color o la resistència a patologies. També s'han realitzat alguns estudis en diverses poblacions sobre l'heretabilitat d'alguns caràcters quantitatius com la pungència, la dolçor, alguna resistència, la floració prematura i el percentatge de cebes amb un centre únic. Aquest últim caràcter sembla el més interessant a l'hora de treballar en calçots, doncs el nombre de calçots podria estar inversament relacionat amb aquesta característica.

Gràcies a la biotecnologia, l'estudi dels caràcters qualitatius i quantitatius ha pogut anar una mica més enllà, permetent la seqüenciació dels gens implicats en el primer cas, i en el cas dels caràcters quantitatius, determinant zones del genoma, que sense estar formades per un únic gen, estan implicades en la determinació d'alguns caràcters: són els anomenats *Quantitative Trait Loci* (QTLs). Galmarini i col·laboradors (2001) van mapejar QTLs relacionats amb la pungència avaluada a través d'anàlisis d'àcid pirúvic als grups de lligament B (30 dies post-collita) i E (90 dies post-collita), que posteriorment van ser assignats als cromosomes 2 i 5, respectivament (Martin *et al.*, 2005). Per la seva banda, McCullum i col·laboradors (2007) van identificar 3 QTLs relacionats amb la pungència, en els cromosomes 3 i 5, basats en anàlisis de l'àcid pirúvic i el factor lacrimogen (LF). Gràcies a aquests estudis, també van poder localitzar gens relacionats amb l'assimilació del sofre, la plastídic ferrodoxin sulfat-reductasa (SiR), i la plastídic adenosina trifosfat (ATP) sulfurlasa (ATPS), situats estretament lligats a un dels QTLs de pungència al cromosoma 3 (McCullum *et al.*, 2007).

2.5.2 Variabilitat genètica

Quan Vavilov va descriure els grans centres de domesticació ho va fer tenint en compte el que aleshores es va anomenar variació (Vavilov, 1951). Malgrat inicialment es va entendre com variació en els sentit ampli de la paraula, després s'ha vist que es referia a variació en plantes endèmiques. Per que una regió fos considerada com un centre d'origen d'una espècie, aquesta havia de presentar múltiples variants pròpies de la zona i no presents en altres. Les zones que presentaven un gran nombre de varietats però no eren exclusives d'aquella zona, les va anomenar centres secundaris de domesticació (Cubero, 2003). La Península Ibèrica està considerada com una centre secundari de variació de la ceba i és, per tant, una regió molt rica en variabilitat intra-específica (Mallor *et al.*, 2011).

La complexitat de la gestió dels recursos fitogenètics conservats *ex-situ* sovint comporta un important ball de números, ja que una de les principals complicacions és la presència de duplicats, ja sigui una mateixa entrada en bancs diferents, com una mateixa entrada amb noms diferents dins el mateix banc. D'aquesta manera, fer estimacions del nombre d'entrades diferents de ceba disponibles arreu del món és molt complex. Una aproximació són les 13.000 entrades d'*Allium cepa* L. conservades en bancs de germoplasma d'arreu del món que va estimar Kik (2008). A la Península Ibèrica, els tres principals bancs on es conserven materials d'*Allium cepa* L., el Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), el Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas de Zaragoza (CITA) i el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), tenen unes 1400 entrades amb un elevat grau de duplicitat consensuada per precaució (CRF unes 500, CITA unes 600 i COMAV unes 300). La majoria de les entrades existents han estat recol·lectades a la Península, conformant una possible font immillorable de variabilitat i alhora reforçant la idea de la Península Ibèrica com a centre secundari de variabilitat.

. 31 .

2.5.3 Del Fenotipat d'ADN al Genotipat

Des de que l'any 1953, Watson i Crick, descobriren l'estructura de l'ADN, i l'any 1973 Cohen i Boyer desenvoluparen la tecnologia de l'ADN recombinant, el desenvolupament de tècniques relacionades amb l'estructura de l'ADN ha estat enorme. Poc a poc els marcadors morfològics i bioquímics han deixat pas a un ventall molt gran i diversos de marcadors d'ADN fins arribar a les tècniques de seqüenciació completa dels genomes. Així doncs aquest tipus de marcadors s'han anat imposant tant en els estudis evolutius, com de variabilitat genètica, per a realitzar programes de millora dirigida o en la construcció de mapes genètics (Klaas i Friesen, 2002).

L'ús de marcadors basats en l'ADN, a diferència dels marcadors bioquímics i morfològics, eviten els problemes de detecció desigual, permeten desenvolupar un nombre pràcticament il·limitat de marcadors, així com permeten una conservació més llarga dels material a analitzar (Klaas i Friesen, 2002).

Restriction Frangment Length Polimorphism (RFLP)

Exceptuant alguns experiments realitzats amb hibridació directe d'ADNs de diferents espècies, la tècnica dels RFLPs va ser la primera desenvolupada pel que fa a marcadors d'ADN. Es basa en la digestió de l'ADN mitjançant endonucleases, que el tallen en fragments de diferent mida, depenent del nombre i localització de seqüències reconegudes per les endonucleases. Amb una posterior separació mitjançant electroforesi s'obtindrà un patró de bandes específic de cada individu. Aquesta tècnica detectarà aquelles variants que generin un canvi en una de les regions de reconeixement de l'endonucleasa, ja que aquesta variarà la mida del fragment obtingut. Un cop separades les bandes, la hibridació, si és el cas, amb una seqüència coneguda, ens permet detectar la presència d'aquesta seqüència en l'individu analitzat. Al ser una tècnica que no inclou l'amplificació requereix d'una quantitat molt gran d'ADN. En ceba, com en altres espècies, els primers treballs es van realitzar amb aquesta tècnica (Bradeen i Havey, 1995; King *et al.*, 1998), que poc a poc ha estat substituïda per altres tècniques basades en la PCR i per tant amb amplificació de l'ADN.

Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)

La teoria que hi ha darrera d'aquesta tècnica és la mateixa que la dels RFLPs, ja que es basa en l'ús d'enzims de restricció per tal de digerir l'ADN i que d'aquesta acció en resultin fragments de diferent mida, que ens permeten detectar diferències entre individus. En aquest cas, però, enlloc de fer servir la seqüència d'ADN sencera, el primer pas és amplificar mitjançant encebadors específics una regió susceptible de contenir polimorfismes. Un cop amplificada, i com passava en els RFLPs, l'ADN és digerit mitjançant endonucleases. En aquest cas al tractar-se d'una seqüència curta i amplificada, es pot recórrer a la seqüenciació per tal de determinar els possibles polimorfismes. Aquesta tècnica pot ser usada com a indicador de la presència de certs factors citoplasmàtics (Havey, 1995) o complementàriament a altres tipus de marcadors pel mapatge de QTLs (McCallum *et al.*, 2007).

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

A diferència de les tècniques anteriors, l'ús dels RAPDs no requereix d'un coneixement previ del genoma investigat i per tant permet ser usat en diferents espècies de manera senzilla (Williams *et al.*, 1990).

Un únic encebador (usualment d'unes 10 bases) és usat en el genoma sencer de la planta. Si dues seqüències homòlogues i complementàries de l'encebador es troben a una distància inferior a unes 2 kb, s'amplificarà el fragment situat entre elles. L'aleatorietat en la situació de les seqüències homòlogues dins el genoma, farà que al finalitzar el procés d'amplificació trobem fragments de diferents mides. Aquest mètode permet un ràpid i barat anàlisi per a la detecció de petites diferències genètiques. No obstant, aquesta tècnica presenta problemes en la reproductibilitat i en la possible manca de polimorfisme degut a l'escàs nombre de fragments obtinguts. Els RAPDs, degut al seu caràcter dominant, en espècies amb un genoma tant complex com el de la ceba, i on sovint les poblacions presenten un elevat grau d'heterozigosi, veuen molt limitada la seva capacitat de discriminació (Bradeen i Havey, 1995). Malgrat aquestes limitacions s'han dut a terme alguns estudis en ceba usant RAPDs combinats amb marcadors morfològics (D'Ennequin *et al.*, 1997), per a l'anàlisi de la diversitat genètica en cebes adaptades al clima tropical (dos Santos *et al.*, 2012) i per a l'estudi de cultivars a Brasil (Leite i Anthonisen, 2009) o al Japó (Tanikawa *et al.*, 2002).

Single Sequence Repeat (SSR/Microsatèl-lits)

Els Microsatèl-lits han estat àmpliament usats en genètica vegetal ja que són altament informatius, co-dominants, basats en la PCR, específics de locus i àmpliament distribuïts (Powell *et al.*, 1996).

La tècnica dels Microsatèl-lits es basa en l'amplificació de regions, mitjançant encebadors predissenyats. Aquestes regions es caracteritzen per contenir repetides seqüències de mida reduïda (de 2 a 4 pb). El polimorfisme d'aquest tipus de marcador es basa en el nombre de còpies d'aquestes seqüències. La mutació en el nombre de còpies ocorre amb una freqüència varia amb ordres de magnitud més elevada que les substitucions de nucleòtids (Aquadro, 1997) i per tant és útil a nivell de poblacions. La complexitat d'aquesta tècnica recau en la recerca de les regions que continguin les seqüències repetides i el posterior disseny dels encebadors. Els microsatèl-lits han estat els marcadors més usats en els estudis genètics de la ceba, tant per realitzar estudis de diversitat genètica (Araki *et al.*, 2010; Baldwin *et al.*, 2012; Fischer i Bachmann, 2000; Jakse *et al.*, 2005; Khar *et al.*, 2011; McCallum *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010), com per mapejar gens d'interès (McCallum *et al.*, 2006, 2007).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Combina característiques dels RFLPs i dels RAPDs, ja que amplifica selectivament mitjançant PCR fragments obtinguts mitjançant una digestió amb endonucleases. Aquesta digestió es realitza amb pocs enzims de restricció (normalment 2). Els fragments obtinguts es lliguen a adaptadors de seqüència coneguda d'uns 20 pb i s'amplifica per PCR; l'elevadíssim nombre de fragments, obliga a tornar a lligar amb encebadors que són els adaptadors anteriors amb un o dos nucleòtids més en posició 3', el que permet una nova amplificació selectiva d'un nombre més reduït de fragments, que finalment es separen per electroforesis en gel. Com en el cas dels RAPDs, es tracta de marcadors dominants, i no requereixen d'un coneixement previ de la seqüència. Els AFLP no han estat tant àmpliament usats en ceba com els microsatèl-lits, tot i que s'han emprat per la discriminació de cultivars (Araki *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2011), la realització de mapes genètics (Havey *et al.*, 2001; van Heusden *et al.*, 2000a, 2000b) o el mapeig del gen *Ms* (Gökçe *et al.*, 2002).

. 33 .

Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)

Com diu el seu nom, són polimorfismes deguts al canvi d'un sol nucleòtid. Perquè un canvi d'un sol nucleòtid es pugui considerar un polimorfisme i no simplement una mutació, aquest canvi ha d'aparèixer en com a mínim el 1% de la població. Els mecanismes per detectar la presència d'SNPs són variats, sent la re-seqüenciació massiva el més habitual. Cal destacar que espècies com la ceba, amb un nivell elevat d'heterozigositat, presenten un grau de dificultat afegit en el desenvolupament d'aquest tipus de marcadors. No cal dir que el nombre de SNP presents en un genoma és pràcticament il-limitat i que per tant el que caldrà és identificar-los. Per les dificultats descrites, fins al moment existeixen pocs treballs amb SNPs en ceba. Jakse i col-laboradors (2005) descriuen 327 SNPs, juntament amb 34 indels i 37 SSR, per al control de qualitat entre encreuaments, híbrids i varietats de pol-linització oberta. Khar i col-laboradors (2008), descriuen varis SNPs lligats a la determinació del color. El mateix any, McCallum i col-laboradors (2008) descriuen 22 SNPs més, a partir de seqüències EST-SSR, per l'ús en testos de pureza entre encreuaments, entre altres. Actualment, al banc del NCBI (National Center of Biotechnology Information), només hi ha

descrits 45 SNPs, enfront per exemple, als més de 6,300,000 descrits en soja (*Glycine max* L.), els 7,200,000 en blat de moro o els prop de 74,000,000 descrits en humans (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5.4 Fenotipat de caràcters comercialment importants en les cebes i els calçots. Els atributs sensorials

S'ha esmentat al llarg d'aquesta introducció que hi ha diversos caràcters agromorfològics d'interès comercial en els calçots (gruix, alçada, nombre de calçots comercials per mota, precocitat, resistència a patologies, etc). La seva mesura és convencional i es descriurà en cada un dels assajos. Associades a aquestes característiques morfològiques i productives hi ha, en tractar-se d'un producte destinat al consum humà, un altre aspecte fortament rellevant per al seu èxit comercial. Es tracta de l'anomenat valor sensorial.

Les dues principals característiques que defineixen la percepció sensorial d'una ceba són la pungència i la dolçor. La pungència de la ceba es produeix amb el trencament de les cèl·lules que comporta l'alliberament de l'enzim alliinassa, que normalment es troba confinat als vacúols. A l'alliberar-se l'enzim al citoplasma reacciona amb uns precursores de la pungència, els S-alk(en)yl-cysteine sulfòxids (ACSOs), produint una gran varietat de compostos volàtils de sofre, conjuntament amb àcid pirúvic i amoni. El factor lacrimogen, thiopropanal S-òxid, és el principal compost responsable de la pungència de la ceba, encara que molts dels altres compostos volàtils de sofre també hi contribueixen (Lancaster i Boland, 1990).

L'altra principal característica sensorial de la ceba és la dolçor. Els carbohidrats no estructurals i els carbohidrats solubles formen una part substancial de la matèria seca de la ceba (65%), principalment els monosacàrids (glucosa, fructosa i sucrosa) i els fructooligosacàrids (FOS). Aquests últims probablement no contribueixen gaire a la percepció de la dolçor però tenen un paper rellevant en el nivell de sòlids solubles durant la postcollita (Darbyshire i Henry, 1978, 1979; Darbyshire i Steer, 1990). Les cebes amb una elevada pungència, malgrat puguin tenir un elevat nivell de sucres, acostumen a ser percebudes com a no dolces, ja que la percepció de la pungència es sobreposa a la de la dolçor. La millor manera de determinar la dolçor és passat un procés de cocció, ja que aquest vaporitza els compostos volàtils de sofre i inhibeix qualsevol acció enzimàtica posterior, degut a la termolabilitat dels enzims. No obstant la percepció de la pungència dependrà del temps de cocció, així com la temperatura o el fet d'haver tallat la ceba abans o després de cuore-la (Cavagnaro *et al.*, 2007).

La mesura dels nivells dels compostos precursores del gust o directament un dels seus productes (normalment el piruvat) és freqüentment usat com a mesura equivalent del sabor o la pungència de les cebes (Coolong i Randle, 2003; Randle, 1992; Schwimmer i Weston, 1961). No obstant, es disposa de poca informació sobre la correlació entre els paràmetres bioquímics i la percepció sensorial. Existeixen dos treballs en ceba crua, on es posa de manifest una bona correlació entre la determinació de l'àcid pirúvic amb la percepció de la pungència (Schwimmer i Guadagni, 1962; Wall i Corgan, 1992). Un estudi realitzat més recentment també ha demostrat una bona correlació entre l'àcid pirúvic i la pungència, en aquest cas tant en ceba crua com en ceba cuita (Cavagnaro *et al.*, 2007). Són estudis realitzats amb panelistes semi-entrenats, on cada panelista tasta de manera aleatòria i per duplicat cada mostra i on la determinació de la pungència es realitza amb la següent escala: 1, extremadament suau; 2, suau; 3, lleugerament pungent; 4, pungent; 5 extremadament pungent (Wall i Corgan, 1992). L'estudi més complet, però, és el realitzat per Crowther i

col·laboradors (2005), on mitjançant quatre panels de tast formats per directius i personal de quatre companyies subministradores de ceba del Regne Unit, demostren en ceba crua la correlació entre la percepció de la pungència i els nivells de piruvat i la correlació inversa entre la percepció de la dolçor i el contingut en piruvat. Tot i aquestes bones correlacions, els tast entrenats són els que ofereixen millors valoracions ja que en la percepció del sabor intervenen altres factors com el contingut en aigua, la textura o el contingut en volàtils.

No hi ha informació sobre les característiques sensorials més rellevants dels calçots. Donat que el seu consum es fa després de coure, la pungència com a tal queda descartada i per tant dels dos aspectes sensorials més importants en la ceba ens queden la dolçor i els possibles gustos que romanen després de la desaparició de la pungència com a candidats per descriure el valor sensorial d'aquest producte. Tampoc s'ha investigat en quina mesura la textura del calçot és considerada pels consumidors com un element de preferència.

2.5.5 Estratègies de millora en cebes

La ceba és una espècie al·lògama, diploide ($2n = 16$) i de pol·linització majoritàriament entomòfila. Com totes les espècies al·lògames el fet que la fecundació sigui creuada determina que les poblacions siguin fortament heterozigotes i que, per tant, pateixin una forta depressió consanguïnia amb un descens molt gran de la fertilitat passades dos o més generacions d'autofecundació (Jones i Davis, 1944). Això ha fet que històricament la millora de la ceba s'hagi basat en la generació de varietats de pol·linització oberta (OP) a través de selecció massal (Dowker, 1990). Darrerament, i gràcies a l'obtenció de línies amb androesterilitat citoplasmàtica, les varietats comercials més usades són els híbrids, els quals presenten sovint una major producció i una elevada homogeneïtat. Així doncs, existeixen dos grans tipus de varietats en ceba: les varietats de pol·linització oberta, incloent les varietats sintètiques (mantenint certa variabilitat interna d'una manera similar al que passa a la natura), i els híbrids, sovint resultat d'un encreuament de dues línies pures i que, a diferència de les OP, presenten una gran homogeneïtat intra-varietal.

Varietats de pol·linització oberta

Les poblacions naturals d'espècies al·lògames es caracteritzen per una elevada heterogeneïtat intra-poblacional, sovint associada a una elevada heterozigosi dels individus. Això s'explica pel fet que la pol·linització es realitza entre individus diferents i, per tant, la fixació en homozigosi d'un locus de manera permanent és pràcticament impossible. D'aquesta manera, si al fet de que un nombre molt elevat de loci estan en heterozigosi se li suma el fet que cada planta pot enkreuar-se amb qualsevol de les plantes veïnes, s'obté una gran variabilitat intra-poblacional i inter-generacional.

Per tal d'obtenir la següent generació usant el mètode de la selecció massal es seleccionen les plantes desitjades pel seu fenotip, es deixen enkreuar entre elles i es recull la llavor de manera col·lectiva, sense realitzar proves de la descendència. Aquest és el mètode històricament més usat en al·lògames, donada la seva senzillesa. La seva efectivitat, però, dependrà de la variabilitat de la població inicial (esperable en plantes al·lògames), del nombre de gens implicats en la determinació del caràcter desitjat i de l'heretabilitat del caràcter a seleccionar (Allard, 1960). Aquest sistema de selecció ha resultat efectiu durant la història de

l'agricultura per tal d'augmentar les freqüències dels al·lels favorables de les poblacions en caràcters que es poden mesurar de manera senzilla i que estan governats per pocs gens. Un exemple relativament recent i documentat és el cas de la selecció en ceba realitzada a Etiòpia per Currah (1985), on l'objectiu de millora era eliminar els bulbs dobles, primis, petits o amb colors no desitjats partint de poblacions heterogènies de bulbs vermells, marrons i blancs. Després de cinc cicles de selecció van obtenir una varietat millorada apte per a la producció de bulbs amb la suficient qualitat com per ser exportats. No obstant, el mètode de selecció massal ha resultat insuficient per tal de desenvolupar varietats modernes amb elevats rendiments (Allard, 1960).

Varietats sintètiques

El terme varietat sintètica s'usa per designar una varietat obtinguda a partir de la hibridació de totes les combinacions entre un nombre de genotips seleccionats, la qual es manté a través de llavor obtinguda per pol·linització oberta. Aquests genotips seleccionats tant poden ser línies pures, clons poblacions on s'hi ha realitzat selecció massal o altres materials. Fins ara aquesta definició no es diferencia gaire de les varietats obtingudes per selecció massal. La diferència entre els dos mètodes de millora està en que, en les varietats sintètiques, s'ha assajat prèviament l'aptitud combinatòria dels genotips seleccionats per tal de formar la nova generació. És a dir només aquells genotips que combinin bé entre si en totes les combinacions possibles passaran a formar part de la varietat sintètica. Existeixen diferents tipus d'assajos per tal de determinar l'aptitud combinatòria (ordenats de menor a major feina necessària per a l'obtenció de la llavor híbrida): a) assaig de la descendència de varietats de pol·linització oberta, b) assaig *top-cross*, c) assaig de poliencreuament i d) assaig d'híbrid simple (Allard, 1960).

· 36 ·

Híbrids

S'entén com a híbrid la F1 o primera generació resultant d'un encreuament entre clons, varietats de pol·linització oberta, línies pures o altres poblacions genèticament diferents (Allard, 1960). L'objectiu principal de l'ús de la primera generació de l'encreuament entre dues poblacions diferents és aprofitar al màxim l'heterosi i és per aquesta raó que majoritàriament la producció d'híbrids es basa quasi sempre en l'encreuament entre dues línies pures. De manera general doncs, quan es parla d'híbrids es fa referència als individus resultants d'aquest tipus d'encreuament.

En el cas de les al·lògames, la dificultat rau precisament en l'obtenció de línies pures, ja que sovint presenten mecanismes per tal d'evitar l'autofecundació així com una forta depressió consanguïnia. A més, la ceba presenta un condicionant afegit a l'hora d'aconseguir híbrids: la dificultat de castrar les flors manualment. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, cada umbella pot estar formada per unes 400 – 600 flors, de manera que la castració manual de totes i cada una de les flors esdevé pràcticament impossible. D'altra banda, la possibilitat de treballar amb un nombre menor de flors (eliminant la resta) minva enormement la quantitat de llavor produïda. Així doncs, en ceba (com en moltes altres espècies) s'ha optat per treballar amb plantes androestèrils com a receptores del pol·len. Això presenta certes dificultats ja que, en primer lloc, obliga a identificar mutacions citoplasmàtiques que confereixin androesterilitat, en segon lloc, implica el laboriós manteniment d'unes línies maternes sense capacitat per autofecundar-se i, finalment, suposa transferir l'androesterilitat a la varietat i condicions ambientals amb les quals es treballa.

L'esterilitat masculina en cebes ve donada bàsicament per la combinació de dos factors: l'efecte d'un gen nuclear i l'efecte d'un factor citoplasmàtic. En el cas del gen, només l'homozigot recessiu presentarà esterilitat (*msms*), sempre i quan l'òvul porti el factor citoplasmàtic S. Si el factor citoplasmàtic és N, encara que sigui homozigot recessiu pel gen *Ms*, la planta serà fèrtil. Per tant, si s'encreua una planta androestèril per tal d'obtenir una descendència també androestèril, la única possibilitat és realitzar l'encreuament amb una planta *Nmsms*, anomenades línies de manteniment (Figura 9).

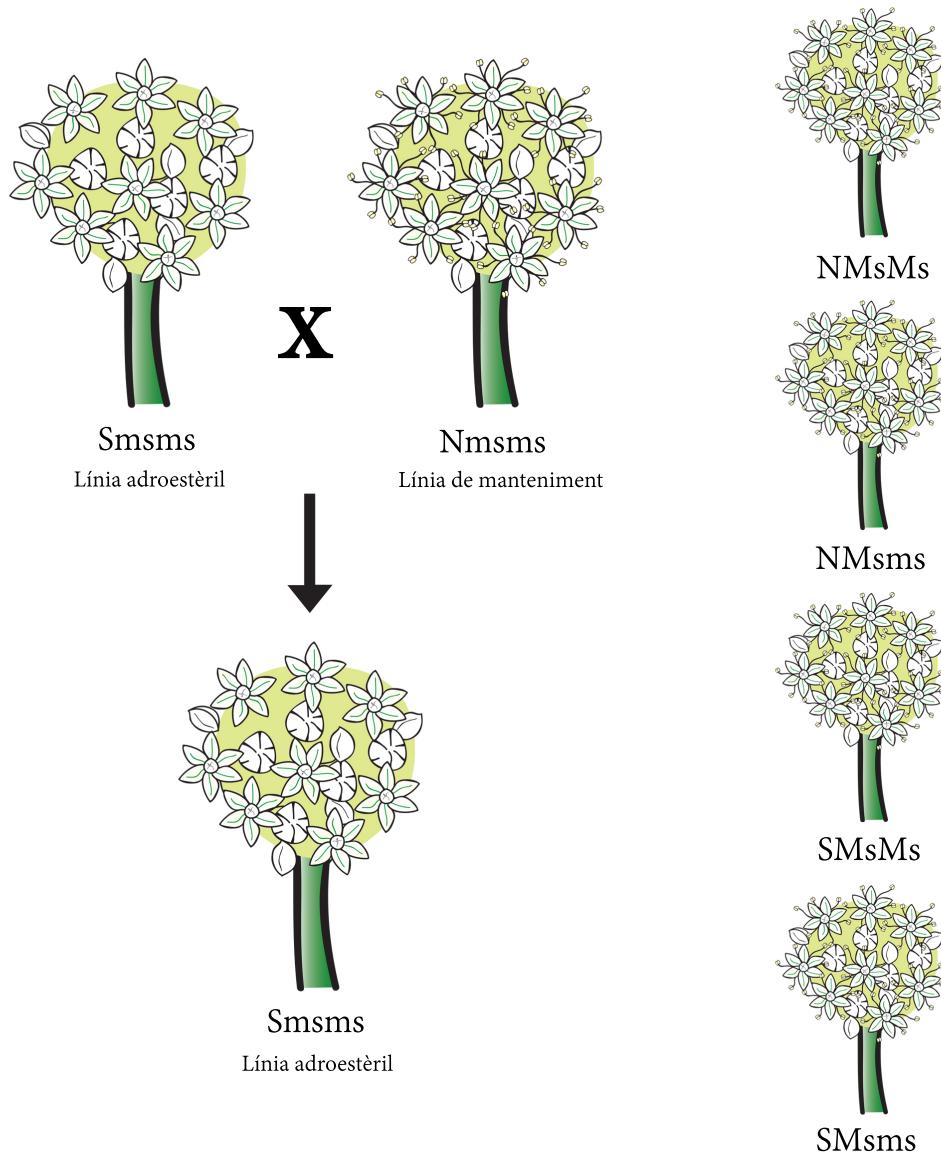


Figura 9. Diferents combinacions possibles entre el factor citoplasmàtic S/N i el gen *Ms*, donadors de l'androesterilitat masculina. L'encreuament entre *Smsms* i *Nmsms* és l'únic que permet el manteniment de les línies androestèrils (*Smsms*, representades sense estams).

Una altra font d'esterilitat citoplasmàtica masculina és l'anomenat citoplasma T, descobert a França l'any 2008 i actualment el mètode usat per produir alguns híbrids europeus i japonesos. Plantes amb el citoplasma T són fèrtils si tenen l'al·lel dominant de la recuperació de la fertilitat A, o tenen en dominància

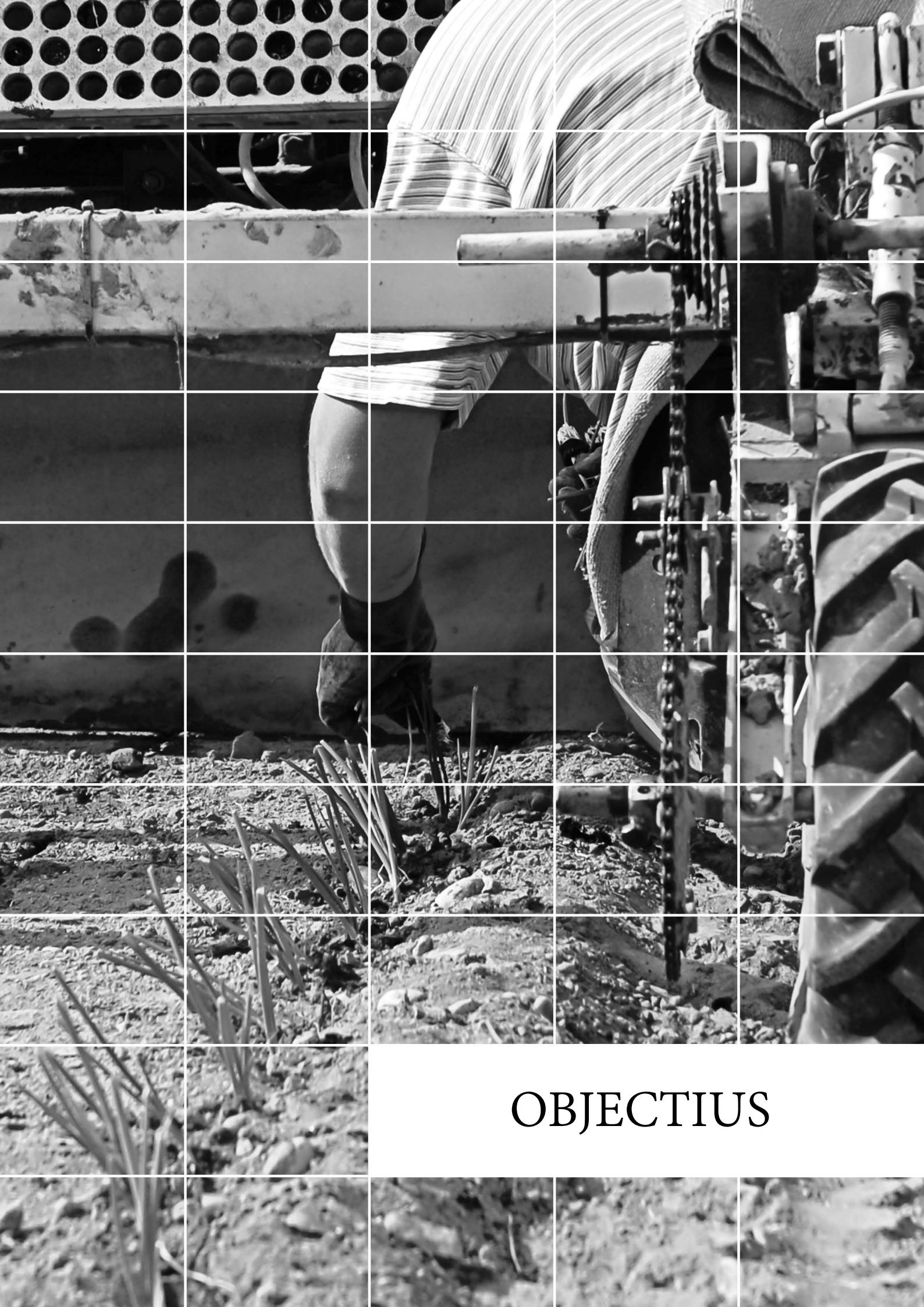
els al·lels C i D (dos gens complementaris que actuen conjuntament en el restabliment de la fertilitat), mentre que en la resta de casos són estèrils (Brewster, 2008).

Cal tenir present que per tal d'assolir un híbrid comercialment valorat s'han de realitzar un nombre molt elevat d'encreuaments. Molts dels programes de millora en ceba basats en el desenvolupament d'híbrids poden allargar-se fins els 15-20 anys degut al caràcter biennal del cultiu.

Un dels problemes per a l'obtenció de les línies pures és que, malgrat ser dèbils per la consanguinitat, han de ser capaces de produir llavor a través de l'encreuament, i les dues línies han de florir a la vegada. Tal i com s'ha esmentat, el resultat d'un encreuament d'una línia estèril amb una de manteniment genera un híbrid estèril, el qual pot tornar-se a creuar amb una altre línia pura (triple híbrid), fet que solucionaria en part el problema de la producció de llavor, però la uniformitat assumida en un híbrid es veuria afectada.

Recentment, per tal de suprir un dels problemes derivats de la consanguinitat en cebes com és el fet que només és puguin autofecundar dos o tres vegades i, per tant, no esdevinguin totalment uniformes (cada generació la homozigosi s'incrementa en un 50%, de la heterozigosi, de manera que a la F2 és del 75% i a la F3 del 87,5%), és la utilització de doble haploides. Aquests s'aconsegueixen a partir del cultiu *in vitro* del teixit ovàric de les flors sense obrir, i permeten obtenir homozigots perfectes sense la necessitat de realitzar un elevat nombre d'autofecundacions (Bohanec, 2002). Estudis comparatius entre els diferents tipus d'híbrids han demostrat que els híbrids procedents de doble-haploides són més uniformes però també més petits (Kim *et al.*, 2007).

Malgrat totes aquestes complicacions i limitacions, i possiblement degut a un augment molt important en el nombre d'híbrids disponibles, hi ha hagut un augment en l'ús d'aquest tipus de cultivars en detriment de les varietats de pol-linització oberta (OP) (Havey, 1999). Les avantatges per les companyies de llavors són òbviament que mantenen el control sobre les línies parentals disminuint així els riscs de pirateig de les varietats. A tall d'exemple, a Israel, el canvi cap a l'ús d'híbrids ha comportat doblar les produccions de 20-50 fins a 50-100 t ha^{-1} en ceba fresca, i un augment de 8 a 15 t ha^{-1} en ceba seca. Aquest increment de la producció es deu tant a la millora dels genotips com a la millora del maneig del cultiu (Bosch Serra i Currah, 2002).



OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi és desenvolupar eines que permetin estudiar la variabilitat de les poblacions de calçots i modelitzar el seu creixement. A la vegada es pretén dissenyar i dur a terme un programa de millora genètica pel desenvolupament de noves varietats que responguin a les demandes dels productors i consumidors.

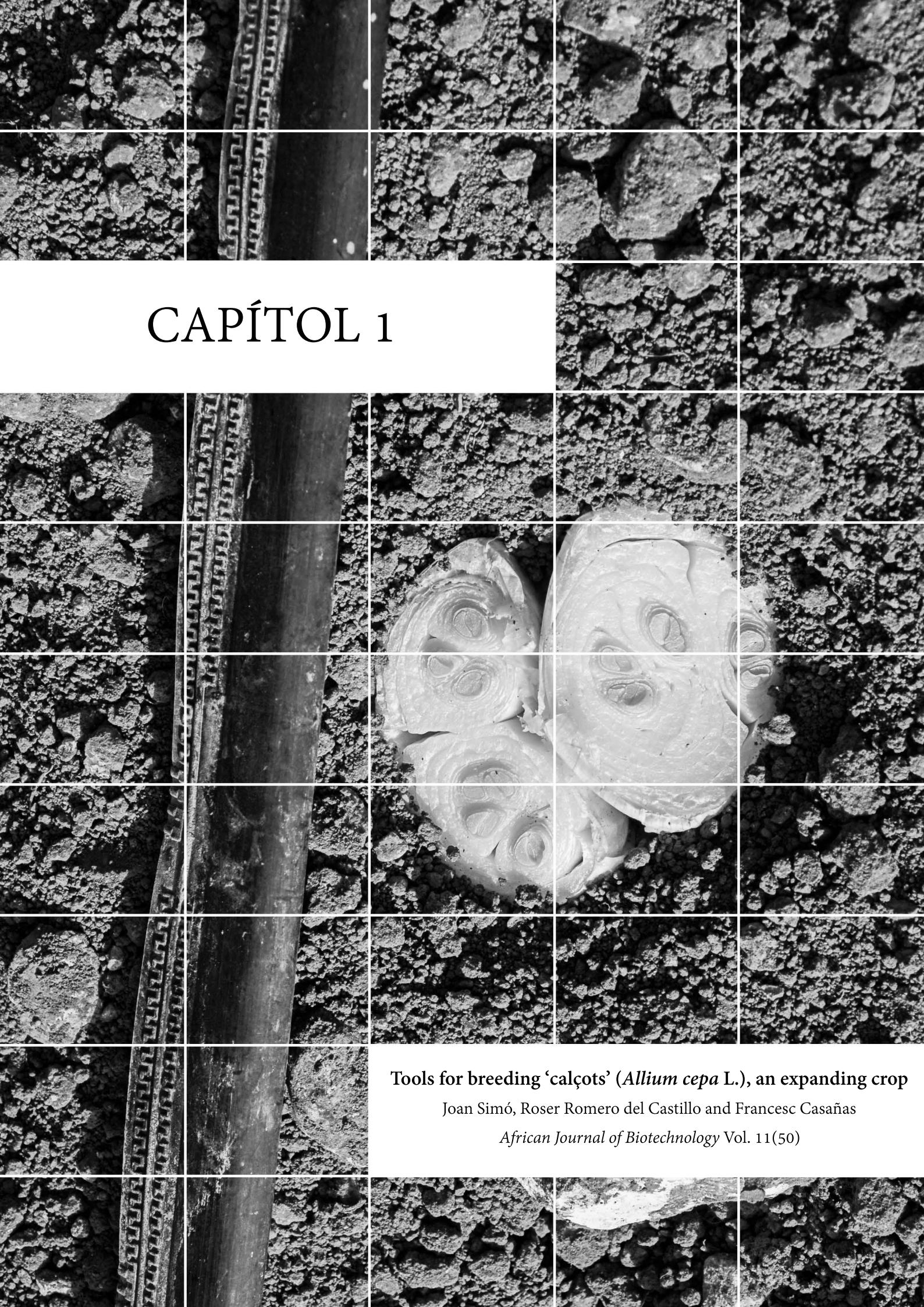
OBJECTIUS ESPECÍFICS

Per assolir aquest objectiu general s'han formulat diferents objectius específics, agrupats en els cinc articles que componen el cos d'aquesta tesi doctoral:

1. Elaborar un idiotip sensorial representatiu de les preferències dels consumidors. Dissenyar un protocol de preparació de mostres i entrenar un panel de tast per tal que sigui capaç d'avaluar-les. Usar el panel de tast per tal de caracteritzar sensorialment els calçots derivats de varietats tradicionals de ceba espanyoles de prestigi, com a possibles integrants de futurs programes de millora.
2. Modelitzar matemàticament el ritme de creixement dels calçots dins d'una població per tal de poder fer comparacions entre poblacions i predir el moment òptim de collita.
3. Caracteritzar tant a nivell agromorfològic com de fons genètic, diverses varietats tradicionals de ceba espanyoles de prestigi i analitzar les implicacions que els resultats puguin tenir en el disseny de programes de millora genètica del calçot.
4. Estudiar les relacions existents entre la fase de ceba i el posterior desenvolupament dels calçots per tal de facilitar la selecció de primer any. A la vegada determinar els principals paràmetres genètics en poblacions sotmeses a selecció.
5. Obtenir dues noves varietats de calçots atenent a l'idiotip agromorfològic proposat pels agricultors.



RESULTATS



CAPÍTOL 1

Tools for breeding 'calçots' (*Allium cepa* L.), an expanding crop

Joan Simó, Roser Romero del Castillo and Francesc Casañas

African Journal of Biotechnology Vol. 11(50)

Full Length Research Paper

Tools for breeding ‘calçots’ (*Allium cepa L.*), an expanding crop

Joan Simó*, Roser Romero del Castillo and Francesc Casañas

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC, ESAB, Campus del Baix Llobregat, Carrer Esteve Terrades 8. 08860 Castelldefels, Spain.

Accepted 4 June, 2012

‘Calçots’, the floral stems of second-year onion resprouts of the ‘Ceba Blanca Tardana de Lleida’ landrace, have a growing market. Different constraints have prevented the inclusion of sensory attributes in ‘calçot’ breeding programs. Thus, we aimed to: (i) elaborate a sensory ideotype representing consumers’ preferences for ‘calçots’, (ii) design an easy protocol for preparing samples and training a sensory panel to evaluate them, and (iii) describe the sensory attributes of ‘calçots’ derived from the main Spanish landraces of onion to point out possible strategies for breeding for sensory quality. A selected group of consumers determined that the sensory ideotype of ‘calçots’ should have high sweetness, low fiber perception, and no off flavors. Samples of 50 ‘calçots’ from a single accession, roasted in the oven at 270°C for 18 min, stripped of their two external leaves, cut off at a height of 20 cm, and puréed, proved adequate for sensory panel evaluation even after being frozen and defrosted. A panel was trained until it was good at distinguishing between accessions (when neither the panelist effect nor the interaction panelist × accession was significant). This trained panel found many significant differences in sensory traits among the ‘calçots’ from Spanish landraces of onion. Although, none of these landraces was as close to the ideotype as the ‘Ceba Blanca Tardana de Lleida’ landrace traditionally used for ‘calçots’, crosses with some of these varieties would probably lead to heterotic base populations for breeding. The genotypic correlations found suggested that agromorphologic and sensory advances are compatible, so the information given should promote the inclusion of sensory quality as a new breeding objective.

Key words: Ideotype, ‘Calçot’, onion, sensory attributes, genetic variability, sample preparation, spanish landraces, panel training.

INTRODUCTION

‘Calçots’ are the floral stems of second-year onion resprouts of the ‘Ceba Blanca Tardana de Lleida’ landrace. These resprouts are harvested in winter when they reach the optimum size for consumption: about 2 cm in diameter with a compact white edible base about 20 cm long. Each onion yields between 1 and 20 ‘calçots’ (Figures 1 and 2), but their thickness is negatively correlated with the number of ‘calçots’ per onion. The ‘calçot’ is a typical product of Catalonia (northeast Spain), where they are usually grilled or roasted and accompanied with ‘romesco’, a sauce made from

hazelnuts, almonds, dried round sweet peppers (‘nyores’), grilled tomatoes, olive oil, vinegar, and mild paprika. This tradition dates from the 1930s and has recently started to spread to other regions of Spain and other countries; the current market volume is about 20 million euros. Thus, ‘calçots’ are emerging as a new product in the Spanish and international markets, but no scientific information about the characteristics of ‘calçots’ and few specific tools for breeding them are available.

Farmers have elaborated an agronomic ideotype consisting of plants with 12 marketable ‘calçots’ that can be harvested simultaneously (that is, that reach the commercial stage described above simultaneously), and some breeding programs are underway to achieve this ideotype. However, no ideotype has been defined for the

*Corresponding autor. Email: joan.simo@upc.edu.

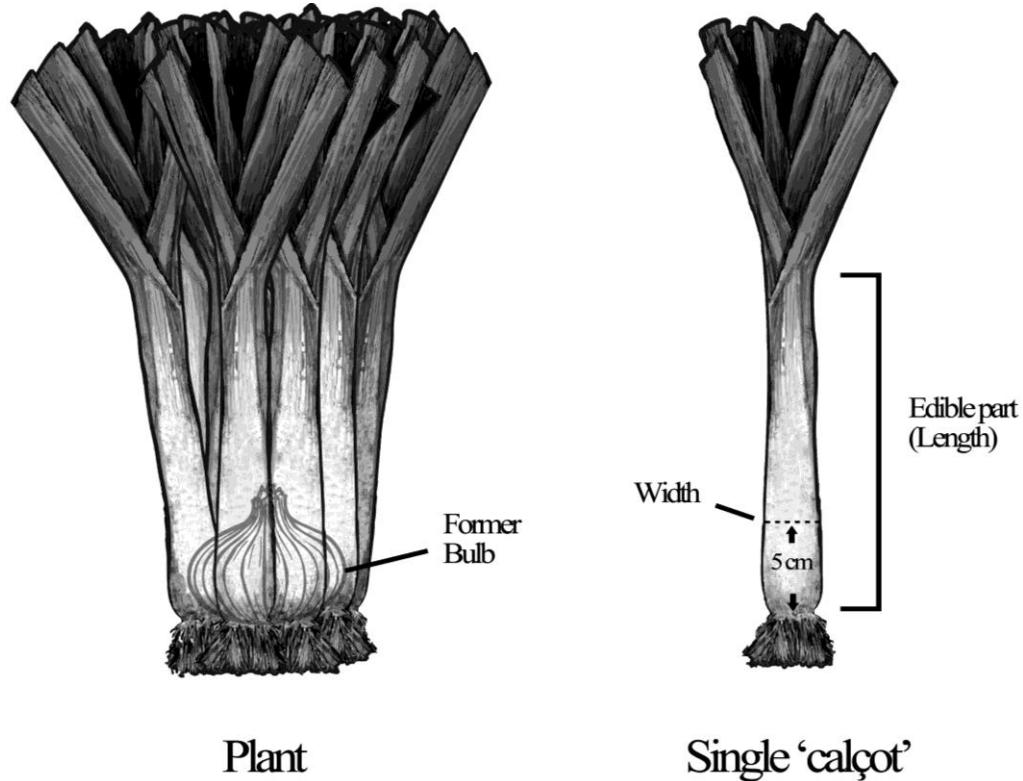


Figure 1. Schematic drawing of a 'calçots' plant derived from one onion, and a single 'calçot' with morphological characteristics labeled.



Figure 2. Photograph of the typical commercial presentation of 'calçots'.

optimum sensory traits for this product, although it has the European label of Protected Geographical Indication (PGI). Sensory analysis requires a strict normalized working methodology, careful experimental design, and appropriate statistical tools (Lawless and Heyman, 1998; Meilgaard et al., 1999). Although methods have been developed for the sensory analysis of some food products of great economic importance, such as wine (Amerine and Roessler, 1976; Gerbi et al., 1997), cheese (Bérodier et al., 1997; FIL, 1997; Lavanchy et al., 1993) and olive oil (Guerrero et al., 1996; IOOC, 1996), methods to evaluate the sensory quality of many other foods, such as cooked onions, remain to be developed. The lack of a sensory ideotype and methods to evaluate the sensory qualities of 'calçots' has discouraged breeders from including sensory traits in breeding programs and precluded regulating authorities efforts at quality control. On the other hand, it is unknown whether calçots' obtained from other varieties of onions would have sensory attributes similar to those valued in the calçots obtained from the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida'. Moreover, it remains to be determined whether the agronomical ideotype established by farmers is compatible with the sensory ideotype. This information is very important for improving the agronomic, morphologic and sensory quality of 'calçots', to help expand the market, and to disseminate this particular way of consuming onions.

To favor the inclusion of sensory traits as an objective target in 'calçot' breeding, complementing the agromorphologic traits, we aimed to: (i) elaborate a sensory ideotype representing consumers' preferences for 'calçots', (ii) design a simple protocol for preparing samples and training a sensory panel to evaluate them, and (iii) describe the sensory attributes of 'calçots' derived from the main Spanish landraces of onion to evaluate their possible role in breeding 'calçots'.

MATERIALS AND METHODS

Elaborating an ideotype

Samples

We used five accessions (different populations) of the landrace 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' coming from diverse locations throughout Catalonia with different soil types and climates (Lleida, Tarragona, La Masó, Cabrils, and Tordera) and cultivated in their place of origin. As the genetic differences between populations were unknown (the accessions corresponded to local populations but they had not been characterized), we reasoned that differences in genetic and environmental factors would provide enough phenotypic variability to enable us to elaborate a sensory ideotype.

'Calçots' are typically grilled over an open flame, but their popularity has led to easier culinary elaborations like oven roasting. As open flame preparation makes it impossible to ensure uniform cooking conditions, we decided to roast the 'calçots' in an oven. After several tests, we determined that the optimum roasting conditions were 18 min at 270°C. As commercial 'calçots' all have similar thickness and length, using a set cooking time yielded

homogeneous culinary results despite the variety of entries. Following the typical practice employed by consumers, we removed the two most external leaves from the 'calçots' so that only the internal, edible part remained. We cut the lower 20 cm of the 'calçots' (Figure 1) lengthwise into four parts, and then we cut these parts transversally into 5 cm-long pieces to present to the tasters (thus 16 sensory samples were obtained from each 'calçot').

Advisory group

We formed a focus group (Lawless and Heyman, 1998) to define consumers' preferences for the sensory traits of 'calçots'. The group consisted of a) 18 people with ties to the production, commercialization, and culinary preparation of 'calçots', all of whom had extensive knowledge about consumers' sensory preferences through their professional activities, and b) seven people randomly chosen from our laboratory, all of whom had also eaten 'calçots' before.

Protocol for evaluation by the advisory group

We presented the advisory group with samples of the five accessions as described above. Group members were asked to consider whether the roasted 'calçots' differed substantially from those grilled on an open flame. Furthermore, group members were asked to decide whether they noticed differences in sensory qualities between the samples. If members noticed sensory differences, they were asked to define the attributes that differed and whether they preferred high or low values for these attributes. Finally, members were asked to describe a sensory ideotype for the 'calçot'. The five accessions were evaluated in duplicate; at the end of the second session, a joint discussion of the results was held to reach a consensus about the sensory ideotype of the 'calçot'.

Fine tuning the method of sample preparation

An analysis based on the variability of degrees Brix among 'calçots' from the same onion and among 'calçots' from different onions in the same population revealed that there was wide variability not only between 'calçots' from different onions (coefficients of variation > 15%), but also between 'calçots' from the same onion (coefficients of variation 5 to 10%). This high variability in a trait related, together with titratable acidity, to consumers' preferences of vegetables (Harker et al., 2002; Vangdal, 1985) led us to suspect that the sampling method used before was inefficient because it could not provide a good estimate of the mean phenotypic value of the accession (unless very many 'calçots' were evaluated for each accession). Furthermore, the samples cooled off very quickly, distorting the evaluation. To overcome these problems, we decided to use a puréed mixture of 50 peeled 'calçots' from the same accession proceeding from many different onions; this approach increased the representativeness of the sample considerably. We also performed tests to determine whether the sensory attributes of the purée remained unchanged after freezing to enable us to prolong the period of sensory analyses beyond the harvest season (from December to March).

To fine-tune the method we randomly chose 50 onions from an accession of 'calçots'. As each onion produces several 'calçots', we designed a sensory test that consisted of:

- Randomly selecting one commercial-size 'calçot' from 10 of the 50 plants, preparing them according to the protocol described above, and presenting samples to the panel for evaluation.
- Randomly choosing one commercial-size 'calçot' from each plant, preparing the 50 'calçots' according to the protocol described

above, peeling them, and puréeing them with a mixer (Taurus BAPI 850) to homogenize them. Half of the purée obtained was presented to the panel and the other half was frozen at -20°C.

This approach was used five times in two accessions; thus, at the end of the trial, the panel had evaluated 10 samples of freshly elaborated purée, 10 samples of the same purée defrosted one month after freezing, and 10 samples consisting of fragments of 10 'calçots' from some of the onions used to prepare the purées.

Training a specialized panel

The panel consisted of 14 tasters previously trained in the sensory analysis of beans (Romero Del Castillo et al., 2008). The panel was now trained to discriminate each of the three attributes defined by the preliminary advisory group (sweetness, fiber perception, and off flavors) in a total of six training sessions (two sessions per attribute). To validate the panel, three additional sessions were held in which the panelists evaluated in duplicate the five accessions used previously.

Attributes were measured on semi-structured visual scales labeled from 0 to 10 (Romero Del Castillo et al., 2008). In the training process, diverse products were used as references for the extremes of the scales and for some intermediate points.

Sweetness

To train the panel in this attribute, we used two onion purées (the sweet landrace 'Cebolla de Fuentes' and the less sweet landrace 'Cebolla Grano de Oro') and two 'calçot' purées with different degrees of sweetness (one unadulterated 'calçot' purée and the same 'calçot' purée after adding 20 g sucrose per 200 g sample).

Fiber perception

To train the panel in this attribute, we used four purées: leek and celery (the reference for the maximum perception of fiber), leek alone, 'calçot', and spinach (the reference for the minimum perception of fiber).

Off flavors

To represent the extreme typical flavor of 'calçots', we used the accession that the advisory group of consumers had scored highest for this attribute. The other extreme of the scale represented any intense flavor that was clearly different from that of 'calçots' (regardless of whether these flavors coexisted with the typical 'calçot' flavor). We used purées of leek, spinach, onion, and moldy onion as reference points for different degrees of off flavors.

To elaborate the purées of 'calçots' and of leeks, we followed the protocol described above. We used the same protocol to prepare the onion purées, but we adjusted the cooking time because the optimum varied with the size of the onion. Celery and spinach were boiled for 15 min and then puréed in the same way as the 'calçots'. Each sample presented to the panelists consisted of approximately 8 g of purée served at 60°C on a small plate identified by three randomly chosen numbers.

Study of variability

Plant material

In addition to the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' landrace, we

used 14 Spanish onion landraces selected for their gastronomic prestige (Carravedo and Mallor, 2007) (Table 1); all materials were supplied by the germplasm bank of the *Instituto para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana*. All entries were cultivated at La Masó (41°3'47"N, 01°13'12"E), located in the center of the Protected Geographical Indication 'Calçot de Valls' and having soil and climate representative of this area. Onions developed during the spring and harvested in July, were replanted in August in 15 cm-deep furrows at a density of 8000 plants per hectare. The resprouts arising in the autumn were covered with land two or three times (as is traditional in the cultivation of 'calçots') to increase the length of the white edible part. The plants were harvested individually from December to March, when they reached the commercial standard.

Sensory analysis

Purées of 'calçots' from the different landraces were prepared and served as described previously and the trained panelists evaluated each accession twice in eight sessions; in each session, panelists evaluated four samples for the attributes sweetness, fiber and off flavors.

All tests were carried out in a room designed for sensory tests that fulfilled the standards set out by the International Organization for Standardization (ISO 8589, 2007).

Morphological analysis

'Calçot' weight, length of the edible part, and width (diameter measured 5 cm from the beginning of the root) were recorded in the same 50 'calçots' used to prepare the puree for each variety. These traits were chosen because they are key aspects in the PGI labeling.

Statistical analysis

We performed ANOVA using R statistic software (Team, 2009). The linear model $x_{ijk} = \mu + a_i + p_j + a^*p_{ij} + e_{ijk}$ enabled us to calculate the accession effect (a), the panelist effect (p), and the interaction between panelists and accession. Significance for the factors was considered at a $P \leq 0.05$ level. We used the same R statistic software to perform the least significant difference test for multiple comparisons (Mendiburu, 2009). Modifications of this model were used to compare the different preparations described.

RESULTS

Sensory ideotype of the 'calçot'

The focus group found no significant differences between oven-roasted 'calçots' and those grilled over an open fire in the traditional manner. They pointed out that the flavor of the samples roasted in the oven was unaffected by burnt and smoky flavors present in samples prepared in the traditional manner.

During the tasting sessions, diverse attributes were proposed for the sensory classification of 'calçots', but in the final meeting the group reached the consensus that 'calçots' should be characterized by pronounced sweetness, low fiber perception, and the absence of off flavors.

Table 1. Accessions of onions used in the study.

Accession	Source	Variety name
BGV001392	Inca (Balearic Islands)	Ceba Mallorquina
BGV001624	Manresa (Barcelona)	Ceba de Figueres
BGV003277	Bembirbe (León)	Cebolla de Villafranca del Bierzo
BGV004701	Massamagrell (Valencia)	Cebolla Babosa (a)
BGV004724	Crevillente (Alicante)	Cebolla Babosa (b)
BGV010676	Grazalema (Cádiz)	Cebolla del Terreno Blanca
BGV010701	Nerja (Málaga)	Cebolla de Nerja
BGV010702	Ibarra (Guipúzcoa)	Cebolla Amarilla de Ibarra
BGV010827	Logrosan (Cáceres)	Cebolla Blanca del Golosa
BGV010832	Coron (Pontevedra)	Cebolla Longa de Corón
BGV010834	Souto (La Coruña)	Cebolla de Betanzos
BGV011045	Amposta (Tarragona)	Ceba Morada d'Amposta
BGV011504	Santa Fe (Granada)	Cebolla Recas
BGV011932	Pintanos (Zaragoza)	Cebolla Chata de Pintanos

Table 2. Results of sensory analyses for different accessions and preparation in the process of fine-tuning the method of 'calçot' sample preparation.

Population	Preparation	Sweetness	Fiber	Off flavour
1	Fragments	5.95 ± 0.39	1.08 ± 0.32	1.38 ± 0.44
	Purée	6.00 ± 0.13	1.13 ± 0.11	1.28 ± 0.11
	Defrosted purée	5.95 ± 0.09	1.18 ± 0.10	1.31 ± 0.14
	LSD	0.52	0.43	0.47
	Mean	5.97 ^b	1.13 ^b	1.32 ^b
2	Fragments	8.05 ± 0.38	2.70 ± 0.44	2.48 ± 0.42
	Purée	8.00 ± 0.09	2.79 ± 0.08	2.55 ± 0.11
	Defrosted purée	8.03 ± 0.07	2.76 ± 0.11	2.52 ± 0.08
	LSD	0.49	0.60	0.57
	Mean	8.03 ^a	2.75 ^a	2.52 ^a

Values are mean ± standard deviation. Means of population in a column sharing the same letter are significantly different by least significant difference (LSD) ($P \leq 0.05$).

Fine-tuning the method of sample preparation

The panel's scores for the sensory attributes of the two accessions studied did not differ significantly when the samples were presented as fresh 'calçot' fragments, freshly elaborated purée, and frozen and defrosted purée (Table 2). However, when samples were presented as fragments, the values for the three attributes were much more widely dispersed (Table 2).

Training and validation of a specialized panel

In the trials carried out during the training sessions for the discrimination of the attributes sweetness, fiber and off flavors, only the factor accession was significant. Values for all three of the attributes were significantly different among the four purées used in the training sessions (Table 3). As expected the reference purées chosen for

the extreme values for each of the three attributes scored near the extremes of the scale (0 and 10) (Table 3).

In the sessions carried out to validate the panel, neither the factor panelist nor the interaction panelist x accession were significant. For the attribute sweetness, panelists' evaluations established three statistically different groups: 'calçots' from Tarragona, Lleida, and La Masó were the sweetest, followed by those from Tordera and those from Cabrils were the least sweet (Table 4). For the attribute fiber, evaluations also established three statistically different groups, although the second group, 'calçots' from La Masó, overlaps with the 'calçots' from two locations comprising the group with the most fiber (Table 4). Fiber perception was highest in 'calçots' from Cabrils and from Lleida, followed by those from La Masó and Tarragona, and was lowest in those from Tordera (Table 4). Finally, two clearly different groups were established for the presence of off flavors: 'calçots' from

Table 3. Results of sensory analyses for each group of reference material used to establish the evaluation scales.

Accession	Fiber	Accession	Sweetness	Accession	Off flavour
Leek and celery	8.24 ± 0.44	Calçot + sugar	9.12 ± 0.21	Moldy onion	9.68 ± 0.19
Leek	5.20 ± 0.44	Sweet onion	6.54 ± 0.31	Spinach	5.34 ± 0.33
Calçot	4.90 ± 0.26	Calçot	3.74 ± 0.28	Calçot	0.85 ± 0.21
Spinach	1.14 ± 0.30	No sweet onion	1.51 ± 0.22	Leek	8.54 ± 0.24
LSD	0.56	LSD	0.61	LSD	0.64
P	*		*		*

Values are mean ± standard deviation; LSD, least significant difference ($P \leq 0.05$). *Significant at $P < 0.001$.

Table 4. Results of sensory analysis in the three attributes for 5 accessions of 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' onion landrace cultivated in their locations of origin.

Accession	Sweetness	Fibre	Off Flavour
La Masó	7.13 ± 0.25	6.35 ± 0.39	1.22 ± 0.30
Lleida	7.04 ± 0.28	6.61 ± 0.23	6.00 ± 0.31
Tarragona	6.78 ± 0.27	5.39 ± 0.32	1.48 ± 0.26
Tordera	5.25 ± 0.29	3.83 ± 0.24	1.75 ± 0.33
Cabrils	3.22 ± 0.30	7.22 ± 0.39	5.83 ± 0.28
LSD	0.88	0.96	0.87
P	*	*	*

Values are mean ± standard deviation; LSD, least significant difference ($P \leq 0.05$). *Significant at $P < 0.001$.

Cabrils and those from Lleida had intermediate values for this attribute, whereas the remaining accessions had very low values (Table 4).

Study of the variability

Whereas the landrace effect was significant for all three sensory attributes, the interaction panelist x landrace was not significant for any attribute. The panelist effect was significant for the attributes sweetness and off flavors.

We found up to seven statistically different groups for the attribute sweetness (Table 5), although some groups overlap with others. 'Calçots' from the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' landrace (the landrace used in the PGI for 'calçots') have the highest values for sweetness (Table 5), together with the 'Ceba Morada d'Amposta', the 'Cebolla Babosa 2', and the 'Cebolla de Nerja'. The lowest values for sweetness corresponded to the landraces 'Cebolla Longa de Corón', 'Cebolla Blanca del Golosa', 'Cebolla de Betanzos', and 'Ceba de Figueres'.

'Calçots' from the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' landrace had the lowest scores for fiber perception. For this attribute, they were grouped with the landraces 'Cebolla de Nerja', 'Ceba Mallorquina', 'Ceba Morada d'Amposta', 'Cebolla de Betanzos', and 'Cebolla Amarilla de Ibarra'. The accessions with the highest scores for fiber perception were 'Cebolla Blanca del Goloso' and 'Cebolla del Terreno Blanca' (Table 5).

We found up to six statistically different groups for the attribute off flavors (Table 5), although given the overlapping these could be considered two large groups

(those with values of three or four and the rest with higher values). 'Calçots' from the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' landrace have the second lowest scores for this attribute, and as in the other two attributes, these 'calçots' are near the ideotype elaborated by the preliminary advisory group.

We used the mean values of the agronomic, morphologic, and sensory traits of the varieties to calculate the genotypic correlations between traits (Table 6); the most significant correlations were weight with width (0.84), number of 'calçots' with length (0.72), and off flavors with fiber (0.83) (Table 6).

DISCUSSION

Sensory traits are often disregarded in breeding programs for various reasons. Before a breeding program aiming to improve sensory traits can be developed, it is necessary to define desirable attributes and develop strategies to overcome the difficulties involved in sampling and measuring these attributes as well as to explore the possibilities by the genetic variability and compatibility with important agromorphic traits. We sought to lay the groundwork for breeding programs to improve the sensory quality of 'calçots' by defining an ideotype to serve as a target, developing a simple and feasible method for measuring the traits defined in the ideotype, and exploring the genetic variability within the landrace defined in the protected geographical indication and in other Spanish landraces that might be suitable for cross-breeding.

Table 5. Results of sensory, morphological, and chemical analyses for 'calçots' obtained from prestigious Spanish landraces of onion.

Accession	Sweetness	Fiber	Off flavor	Width (cm)	Length (cm)	Weight (g)	Calçots
Ceba Blanca Tardana de Lleida	6.78 ± 0.35	1.38 ± 0.19	3.32 ± 0.64	22.82 ± 0.50	18.29 ± 0.15	100.41 ± 3.25	9.94 ± 1.07
Ceba Moradà d'Amposta	6.76 ± 0.42	2.53 ± 0.38	4.49 ± 0.62	15.95 ± 0.75	13.50 ± 0.45	68.48 ± 6.59	2.94 ± 0.36
Ceba de Figueres	6.34 ± 0.49	2.85 ± 0.59	5.09 ± 0.58	16.28 ± 0.94	12.96 ± 0.24	67.61 ± 7.79	3.00 ± 0.47
Cebolla Babosa(b)	5.99 ± 0.57	3.70 ± 0.49	3.50 ± 0.67	16.33 ± 0.54	14.38 ± 0.26	75.37 ± 6.46	3.41 ± 0.67
Ceba de Nerja	5.61 ± 0.57	2.69 ± 0.53	3.07 ± 0.63	15.60 ± 0.68	17.85 ± 0.27	72.00 ± 4.65	8.21 ± 1.60
Ceba Mallorquina	4.58 ± 0.44	2.41 ± 0.26	4.34 ± 0.78	16.21 ± 0.60	13.33 ± 0.14	89.18 ± 5.88	5.57 ± 0.61
Cebolla Babosa (a)	4.52 ± 0.78	4.57 ± 0.64	5.86 ± 0.93	17.45 ± 0.51	14.21 ± 0.18	87.25 ± 4.87	4.85 ± 0.44
Cebolla Recas	4.45 ± 0.53	3.28 ± 0.57	4.54 ± 0.90	26.02 ± 1.11	15.50 ± 0.64	165.43 ± 17.02	3.58 ± 0.45
Cebolla de Villafranca del Bierzo	4.40 ± 0.41	4.25 ± 0.50	4.20 ± 0.77	20.19 ± 1.70	12.34 ± 0.32	50.25 ± 4.16	3.10 ± 0.69
Cebolla del TerrenoBlanca	4.25 ± 0.56	6.37 ± 0.49	6.54 ± 0.49	23.85 ± 0.76	14.10 ± 0.19	144.21 ± 8.35	2.57 ± 0.36
Cebolla Amarilla de Ibarra	4.05 ± 0.57	2.08 ± 0.41	3.65 ± 0.61	19.45 ± 0.39	15.05 ± 0.18	93.72 ± 3.96	8.57 ± 1.21
Cebolla Chata de Pintanos	3.65 ± 0.60	5.16 ± 0.33	5.65 ± 0.93	21.62 ± 1.35	15.36 ± 0.45	119.68 ± 16.4	3.30 ± 0.59
Cebolla de Betanzos	3.07 ± 0.47	2.57 ± 0.59	3.45 ± 0.94	16.73 ± 0.74	12.86 ± 0.18	59.32 ± 5.50	3.36 ± 0.41
Cebolla Blanca del Goloso	2.82 ± 0.47	7.24 ± 0.36	7.15 ± 0.47	21.40 ± 0.92	13.80 ± 0.37	124.08 ± 9.25	6.72 ± 0.81
Cebolla Longa de Coron	1.94 ± 0.36	3.04 ± 0.61	4.09 ± 0.71	16.69 ± 0.77	13.19 ± 0.27	64.26 ± 5.85	3.28 ± 0.52
LSD	1.5	1.14	1.69	3.81	0.81	20.81	2.41
P	*	*	*	*	*	*	*

Values are mean±standard deviation. LSD, Least significant difference ($p \leq 0.05$). *Significant at $P < 0.001$.

Sensory ideotype of the 'calçot'

Although, many traits were considered, the advisory group proposed high sweetness, low fiber perception, and low perception of off flavors to represent the ideal 'calçot'. This simple sensory ideotype complemented the agronomic (12 'calçots' per onion) and morphological (2 cm in diameter and 20 cm length of the edible part) ideotypes, providing a clear full target for breeding and agronomic management.

Fine-tuning the method of sample preparation

The mean values for the attributes measured in 'calçot' fragments did not differ from those measured in purées, and the dispersion of the values was much lower for the purées (Table 2). Therefore, we decided that puréeing was the best method of sample preparation because using 'calçot' fragments would require a much larger

number of samples to be evaluated to enable a good estimate of the mean phenotypic value. The lack of significant differences between the freshly prepared purées and the frozen purées in the attributes evaluated (Table 2) enables greater flexibility in scheduling tasting sessions, making it possible to distribute the panel's work more conveniently. Furthermore, using frozen samples opens the possibility of comparing materials harvested at different times during a season or even during different seasons. Finally, puréeing is also suitable for sampling for chemical analysis, making it possible to perform both sensory and chemical analyses on the same sample. This method promises to be useful for evaluating the sensory and chemical characteristics of boiled or roasted onions as well as 'calçots'.

Training and validation of a specialized panel

No significant panelist effect or panelist \times

accession interaction was observed during the formal training process or during validation (Tables 4 and 5). These findings confirm that the panel was well trained, that the panelists had assimilated the scales, and that they had a clear idea of the attributes. Although differences between the samples of 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' were expected to be minor, the panelists were able to establish statistically significant groups in all the evaluated attributes (Table 4). It is important to note that the values for the different accessions do not represent the general traits of 'calçots' from each area; in fact, we sought out very different fields to ensure phenotypic variation for each sensory attribute. The aim of this trial was to develop a sampling method and to train a panel, rather than to study the effects of specific genetic and/or environmental factors on the sensory value of the 'calçot'.

Table 6. Genotypic correlations between traits.

	Fiber	Off flavor	Width	Length	Weight	Calçots
Sweetness	-0.43	-0.31	-0.15	0.38	-0.15	0.18
Fiber		0.87***	0.38	-0.26	0.45	-0.32
Off flavors			0.38	-0.30	0.52*	-0.30
Width				0.31	0.84***	0.07
Length					0.34	0.72**
Weight						0.06

*, Significant at P<0.05; **, Significant at P<0.01; ***, Significant at P<0.001.

Study of the variability

The group of prestigious Spanish landraces had considerable variability for the three sensory attributes; however, the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' onion, the landrace traditionally used for the production of 'calçots', scored closest to the ideotype (Table 5). Nevertheless, the onion is an allogamous plant, and heterosis is expected when genetically distant varieties are crossed. Considering sensory, morphologic, and agronomic traits, 'Cebolla de Nerja' and 'Cebolla Amarilla de Ibarra' (Table 5) seem good candidates to be crossed with 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' to generate a base population for breeding. Anyway, populations of allogamous plants are very heterogeneous, so studying the internal variability of the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' landrace and developing intravarietal breeding programs is likely to yield good results.

The lack of negative genotypic correlations (Table 6) suggests that breeding to reach agronomic, morphological, and sensory ideotypes is feasible. Furthermore, breeding for low fiber perception should also decrease off flavors as both traits have a high and significant positive correlation (Table 6).

The panelist effect was significant in this experiment. Though this effect did not prevent the panel from distinguishing between entries, it indicates that panelists' assimilation of the scales was insufficient when the variability of the attributes was increased (in the trial performed to validate the panel, in which only 'calçots' from 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' onions were used, neither the panelist nor the interaction panelist x entry effect was significant for any attribute). This means that the panelists would need further training in the extremes of the scales if they were to continue to work with 'calçots' from onions with characteristics different from those typical of 'calçots' from 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' onions.

Conclusion

The advisory group considered that the ideal 'calçot' should have a high level of sweetness, low fiber perception, and no off flavors. We propose a simple and

standardized protocol for the preparation of samples: roasting samples of 50 commercial-size 'calçots' per entry at 270°C for 18 min, removing the two external leaves, cutting the 'calçots' to a length of 20 cm, and puréeing them for 2 min. This purée can be frozen at -20°C for further sensory analyses. The same method could be used to prepare samples of roasted or boiled onions.

Our investigations into the quality attributes of 'calçots' have yielded a simple ideotype and an easy, reproducible methods for preparing samples and training panels that will encourage breeders to include sensory attributes in their objectives. Our results suggest that breeding for improvements in sensory attributes is compatible with the agromorphologic ideotype, providing breeders with a clear full target.

We observed marked differences in all the traits studied between 'calçots' obtained from prestigious Spanish landraces of onion. Although none of the landraces clearly surpassed the 'Ceba Blanca Tardana de Lleida' onion, crosses between varieties could be useful to generate heterotic base populations for breeding. Given the variability among 'calçots' from different onions within 'Ceba Blanca Tardana de Lleida', selection within this population also seems to be an efficient approach to achieve the ideotype.

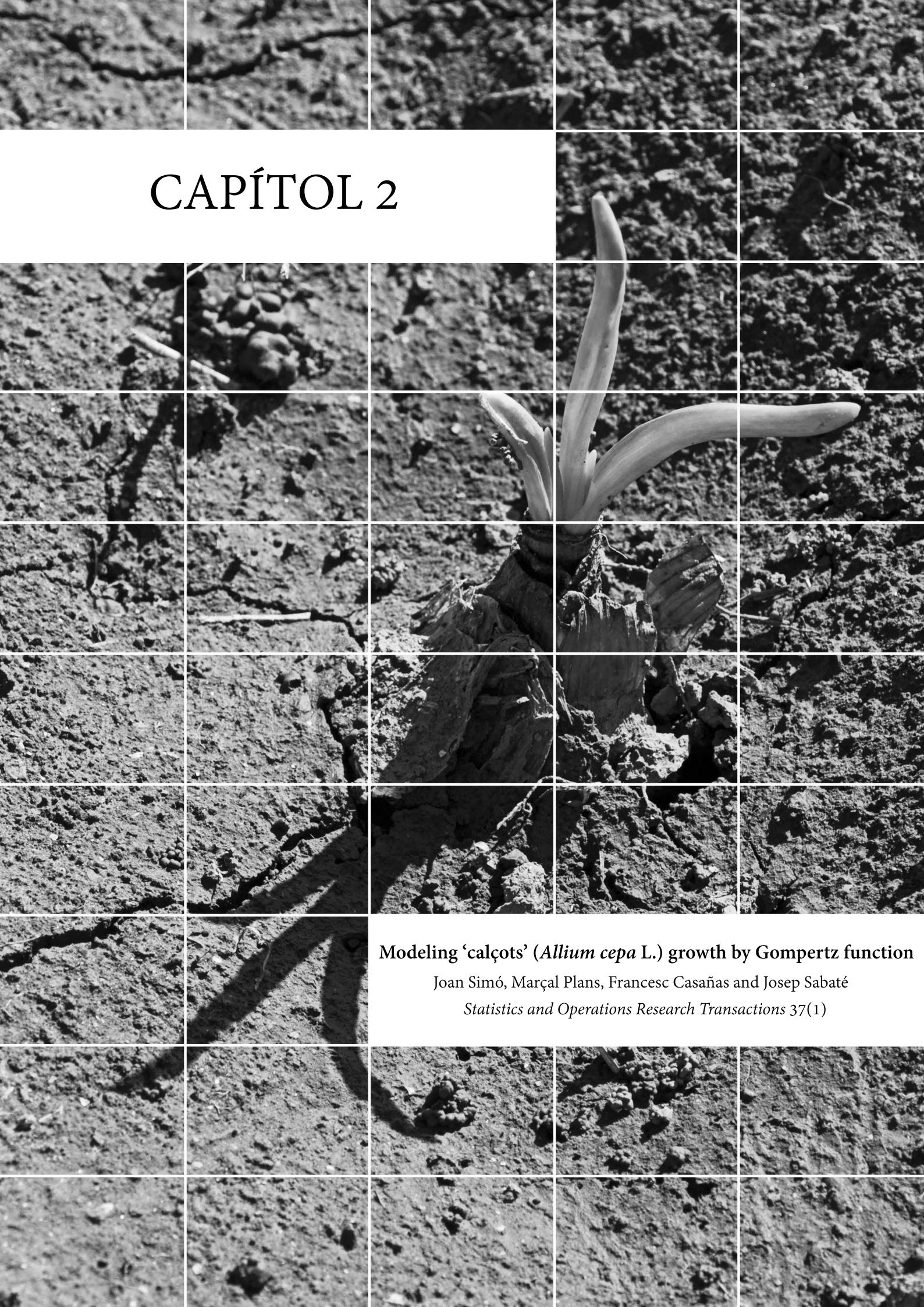
ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the Department of Agriculture of the Autonomous Government of Catalonia. We thank the members of the advisory group and of the trained panel for their disinterested work and the *Instituto para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana* for supplying the seeds of the Spanish landraces of onion.

REFERENCES

- Amerine MA, Roessler EB (1976) Wines: their sensory evaluation. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- Bérodier F, Lavanchy P, Zannoni M, Casals J, Herrero L, Adamo C (1997) Guide d'Évaluation Olfacto-Gustative des Fromages à Pâte Dure et Semi-dure. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 30(7): 653-664.

- Carravedo M, Mallor C (2007) Variedades autóctonas de cebollas españolas. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Zaragoza.
- FIL GdE (1997) Evaluation sensorielle des produits laitiers par cotation: Méthode de référence. International Dairy Federation, pp. 1-16.
- Gerbi V, Zeppa G, Antonelli A, Carnacini A (1997) Sensory characterisation of wine vinegars. *Food Qual. Prefer.*, 8(1): 27-34.
- Guerrero L, Romero A, Tous J (1996) El panel de cata de aceites de oliva virgen de Cataluña. Dossier Oleo 2º trimester, pp. 40-43.
- Harker FR, Marsh KB, Young H, Murray SH, Gunson FA, Walker SB (2002) Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 24(3): 241-250.
- IOOC (1996) General Methodology for sensory analysis of olive oil. IOOC/T20 Doc no. Rev., 13: 1.
- ISO 8589 (2007) Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Lavanchy P, Bérodier F, Zannoni M, Noël Y, Adamo C, Squella J, Herrero L (1993) L'Evaluation Sensorielle de la Texture des Fromages à Pâte Dure ou Semi-dure. Etude Interlaboratoires. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 26(1):59-68.
- Lawless HT, Heyman H (1998). *Sensory Evaluation of Food*. Springer, New York.
- Meilgaard M, Civille GV, Carr BT (1999). *Sensory evaluation techniques*. CRC Press, New York.
- Mendiburu F (2009). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 10-8: <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Romero Del Castillo RR, Valero J, Casanas F, Costell E (2008) Training, validation and maintenance of a panel to evaluate the texture of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sens. Stud.*, 23(3): 303-319.
- Team RDC (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: <http://www.R-project.org>.
- Vangdal E (1985). Quality criteria for fruit for fresh consumption. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 35(1): 41-47.



CAPÍTOL 2

Modeling 'calçots' (*Allium cepa* L.) growth by Gompertz function

Joan Simó, Marçal Plans, Francesc Casañas and Josep Sabaté

Statistics and Operations Research Transactions 37(1)

Modelling “calçots” (*Allium cepa* L.) growth by the Gompertz function

Joan Simó, Marçal Plans, Francesc Casañas and Jose Sabaté*

Abstract

“Calçots” are the second-year resprouts of the “Ceba Blanca Tardana de Lleida” landrace of onions. The evolution of three “calçots” populations has been modeled to help farmers to plan the optimal time to harvest. Four different models that essentially differ in the type of distribution of the fitting Gompertz function parameters (lag time, maximum growth rate and the maximum attainable number of commercial size “calçots”) have been tested. The model that considers a multinomial distribution of the fitting parameters showed the best agreement with the experimental data.

MSC: MSC2000 classification of the American Mathematical Society: 92D25

Keywords: “Calçots”, onion, crop modeling, Gompertz, simulation.

1. Introduction

“Calçots” are the second-year resprouts of the “Ceba Blanca Tardana de Lleida” landrace of onions. In the production of “calçots”, all the resprouts from an onion are harvested at the same time, when $\geq 50\%$ reach commercial size (1.7 cm–2.5 cm in diameter and 20 cm in length, as specified in the regulations for the “Calçot de Valls” (Protected Geographical Indication). Each onion yields between 1 and 20 “calçots”, but their thickness is negatively correlated with the number of “calçots” per onion, so in the most productive onions many “calçots” never fulfill the commercial requirements for size. Production lasts from mid-November to the end of April, and a more or less constant release of marketable product is needed during this period. Farmers exploit genetic variability in earliness, using combinations of genotypes and/or sowing dates to adjust the production to consumer demand, but these combinations are haphazard and

*Dept. d’Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, UPC, ESAB, Campus del Baix Llobregat, Carrer Esteve Terradas 8, 08860 Castelldefels, Barcelona. joan.simo@upc.edu

Received: March 2012

Accepted: October 2012

inefficient. Thus, it would be interesting to develop a methodology that would enable farmers to predict crop evolution and help them plan the optimal time to harvest.

The data recorded in our experimental crops suggest that the evolution of the number of commercial “calçots” through the growing season can be described by a sigmoidal pattern: an initial period where no commercial “calçots” are observed is followed by a second stage of rapid expansion and a final phase where the number of “calçots” asymptotically tends to a maximum value. Sigmoidal curves have been widely reported in biology, particularly in the growth of microorganisms under specific physical and chemical conditions (Rodriguez-Gonzalez et al., 2011; Zwietering et al., 1990), in the microorganisms inactivation (Gil et al., 2011), in the seasonal growth of fish (Singhi, 2011), and in the growth and development of field crops (Barker et al., 2010; Tei, Aikman and Scaife, 1996).

One of the most popular models to explain sigmoidal curves is based on the Gompertz function, which can be expressed in several forms, such as the following one, which involves three biologically meaningful parameters.

$$N = N_m e^{\frac{\mu_m e}{N_m} ((\lambda - t) + 1)}, \quad (1)$$

where N and t are the measured number of individuals and time, respectively. N_m is the maximum N that can be reached at infinite time, μ_m is the maximum growth rate, and λ is the lag time.

The Gompertz model for microorganisms’ growth has been used to predict the safety and shelf life of foods (Gil et al., 2011; Rodriguez-Gonzalez et al., 2011; Zwietering et al., 1990). The Gompertz function has been fitted to lettuce growth, although onions and red beets have expolinear growth (Tei et al., 1996). The Gompertz model has also been fitted to herbage mass and herbage accumulation (Barker et al., 2010); growth of tobacco leaves, stems, and roots (Ismail, Khamis and Jaafar, 2003); total biomass, leaf area index, number of plants per meter, and productivity of sugarcane (Simoes, Rocha and Lamparelli, 2005); and dry matter production and cob weight in maize cultivars (Ramachandra Prasad, Krishnamurthy and Kailasam, 1992).

We aim to i) use parameters based on the Gompertz function to discriminate among different populations and ii) use the same parameters to model the growth of “calçots” to enable the evolution of the crop to be predicted and the optimal harvest time to be planned.

2. Materials and methods

In a single location, we cultivated 100 onions from three populations ($P1$, $P2$, and $P3$) corresponding to three different genotypes. We scored the number of commercial “calçots” (N) in each viable plant every two weeks over a seven-month period.

First, the three Gompertz function parameters ($\lambda_{i,j}$, $\mu_{i,j}$ and $N_{m,i,j}$) were estimated for any plant i of the population j , by nonlinear least squares using the Gauss-Newton

algorithm. The goodness of fit was tested for each plant through the R^2 , the root mean square error (RMSE) and the residuals distribution. All these data were used to compare the behaviour of the three populations and to develop a simulation process aimed at predicting the evolution of the three crops.

2.1. Comparison of the three populations

Multivariate ANOVA of the Gompertz parameters was performed following $\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \mathbf{E}$ where \mathbf{Y} is the parameters matrix distributed as a $N_p \sim (\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\Sigma})$, \mathbf{X} is the design matrix, \mathbf{B} is the unknown parameters matrix (μ_{ip} , α_{ip}), and \mathbf{E} is the error matrix. The distribution of error matrix was supposed $N_p \sim (0, \boldsymbol{\Sigma} \boldsymbol{\varepsilon})$, Wilks' statistic was used to test the significance of MANOVA. Comparisons of several multivariate means were analyzed using simultaneous confidence intervals (CI) with Bonferroni correction (Johnson and Witchern, 2007; Chung et al., 2009).

2.2. Simulations

Simulations were performed independently for each genotype. Viable plants of each genotype (n_j) were randomly split in 2 groups: the “calibration” and the “validation” groups, composed of $n_{c,j}$ and $n_{v,j}$ plants respectively, being $n_{c,j} \approx 2n_{v,j}$ and $n_j = n_{c,j} + n_{v,j}$. Gompertz parameters achieved from the calibration set were used to generate a simulated set of $n_{v,j}$ plants.

The simulated set was generated according to four different models that essentially differ in the type of distribution of the fitting parameters of the Gompertz function. Model 1 only considers the average value of λ , μ_m and N_m . Then all the simulated plants evolved with the same rate for this model. Model 2 takes the average value of λ , μ_m and N_m and their variance-covariance matrix into account considering a normal multivariate distribution (Ripley, 1987) following the Equation (2):

$$f_{\mathbf{x}}(x_1, \dots, x_k) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{k}{2}} |\boldsymbol{\Sigma}|^{\frac{1}{2}}} \left(-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu})^\top \boldsymbol{\Sigma}^{-1} (\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}) \right), \quad (2)$$

where k is the numbers of random variables, $\boldsymbol{\Sigma}$ is the Variance-Covariance matrix between variables and $\boldsymbol{\mu}$ is the mean vector of these variables. Model 3 is similar to Model 2 but uses the transformed parameters obtained from the Box-Cox method (Box and Cox, 1964; Ripley, 1987). Model 4 considers a univariate Weibull distribution of λ , μ_m and N_m independently (Johnson et al., 1994). The probability density function of a random variable x is described by Equation (3):

$$f(x; k, \lambda) = \begin{cases} \frac{k}{\lambda} \left(\frac{x}{\lambda} \right)^{k-1} e^{-(\frac{x}{\lambda})^k} & \text{if } x \geq 0, \\ 0 & \text{if } x > 0, \end{cases} \quad (3)$$

where k is the shape parameter and λ is the scale parameter. Then, the shape and scale parameters were obtained by maximum likelihood estimation and were subsequently used to generate the simulated set (Johnson et al., 1994).

For each model and each genotype, the simulation was repeated 100 times from the first step (i.e., from the random selection of the calibration and validation sets). The suitability of the simulations for predicting the evolution of the crop was evaluated by comparing each simulated set with its corresponding validation set. Comparisons were carried out in three ways: first, by applying the chi-square test on the total number of commercial “calçots” of any population, N_t along the 14 scoring dates, second with a parametric model survival analysis in which the target success was the time (t_X) when a plant produces a given fraction (X) of “calçots” meeting the commercial specifications, and third using a one-way ANOVA performed on the maximum number of commercial “calçots”, N_m in which scores at the latest time (count 14) were taken for the N_m of validation plants.

All calculations were done with the R-program (www.R-project.org), using packages *agricolae* (Mendiburu, 2010), *doBy* (Højsgaard and Halekoh, 2011), *fitdistrplus* (Delignette-Muller et al., 2010), *CAR* (Fox and Weisberg, 2011), *MASS* (Venables and Ripley, 2002) and *survival* (Therneau and Lumley, 2011).

3. Results

The evolution of commercial “calçots” number for a typical plant of any population is shown in Figure 1. The experimental vs. fitted values of $N_{i,j}$ for each plant with the modified Gompertz equation yielded average R^2 values of 0.901, 0.915, and 0.906, with their corresponding standard deviations of 0.078, 0.051, and 0.066 for the populations $P1$, $P2$ and $P3$, respectively. The average values of RMSE were 0.41, 0.39 and 0.22, which can be considered low compared with the number of “calçots” expected to

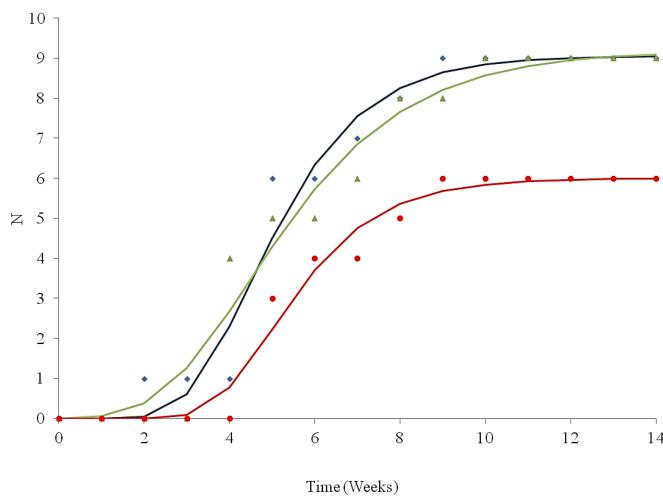


Figure 1: Evolution of commercial “calçots” number for some typical plants: \diamond $P1$, \triangle $P2$ and \circ $P3$.

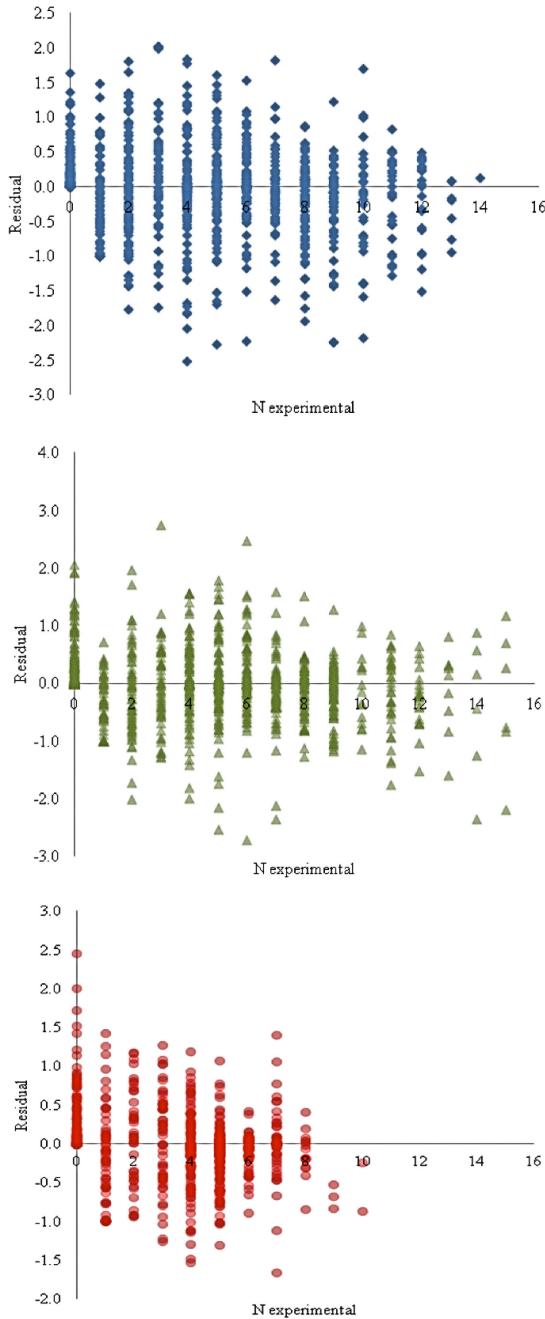


Figure 2: Residuals vs experimental number of commercial “calçots”. a) \diamond *P1*, b) \triangle *P2* and c) \circ *P3*.

harvest, 6 to 9. The residuals for all the plants of any population, plotted in Figure 2, are nearly symmetrically distributed around the X axis for all the values of N . The only exception to this trend is observed for $N = 0$, as the predicted value of N should always

be positive according to Equation (1). All these data together support the suitability of the fitting.

3.1. Comparison of the three populations

First of all, the Shapiro-Wilks test shows that the set of estimates values of λ , μ_m and N_m of the individual plants for each population do not mainly follow a normal distribution, so they were transformed using the Box-Cox method and checked again (Box and Cox, 1964; Royston, 1982). Although conversion by the Box-Cox method resulted in transformed λ and μ_m values with a normal distribution, the transformed N_m ($P = 0.033$) still does not pass the test (Table 1). The Box-Cox parameter values for λ , μ_m and N_m were 0.7, -0.2, and -0.4, respectively. The p -values using Wilks tests were < 0.001 for both raw and transformed parameters. MANOVA with Bonferroni simultaneous *CI* test for multiple means comparisons (Table 2) indicates that the λ_2 mean value is smaller than λ_1 and λ_3 and μ_{m3} is smaller than μ_{m1} and μ_{m2} for both raw and transformed data. When the raw parameters are compared, the N_{m2} mean value is larger than N_{m1} and N_{m3} ; however, when the transformed parameters are compared the N_m mean values of the three populations show significant differences.

3.2. Simulations

Mean parameters values and their coefficients of variation for simulation and variation sets can be seen in Table 3. Although a rigorous comparison was not performed, it can be seen that, generally, mean parameter values for the simulation sets are close to those corresponding to the validation sets. Further, the coefficients of variation indicate that fitting parameters are more scattered for simulation sets than for validation samples.

Table 1: *P*-values for Shapiro-Wilks test of normality.

	Raw parameters	Transformed parameters
λ	6.4×10^{-3}	0.215
μ_m	6.89×10^{-16}	0.146
N_m	2.75×10^{-13}	0.033

Table 2: Comparison of parameters mean values with simultaneous *CI* for treatments' difference using Bonferroni correction in multiple comparison.

	λ		μ_m		N_m	
	Raw	Transformed	Raw	Transformed	Raw	Transformed
<i>P1</i>	6.25 a	6.09 a	2.78 a	2.07 a	7.89 b	7.19 b
<i>P2</i>	4.84 b	4.66 b	2.51 a	1.93 a	9.40 a	8.25 a
<i>P3</i>	5.99 a	5.75 a	2.21 b	1.74 b	6.91 b	6.40 c

Table 3: Mean values and coefficients of variation (CV) for simulation and validation sets.

Set	Factor	Population	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
			Mean	CV (%)						
Simulation	λ	$P1$	6.51	9.37	6.48	8.90	6.43	8.58	6.42	9.92
		$P2$	5.13	9.17	5.17	8.71	4.69	10.56	4.78	10.17
		$P3$	6.21	7.22	6.28	8.48	5.90	10.87	5.91	11.37
	μ_m	$P1$	3.20	14.75	3.16	13.99	2.89	20.56	2.90	14.06
		$P2$	2.69	10.56	2.69	10.17	2.89	19.27	2.60	13.18
		$P3$	2.37	12.53	2.46	12.93	2.25	16.54	2.24	14.19
	N_m	$P1$	8.48	7.92	8.44	6.93	6.94	5.57	8.42	7.77
		$P2$	10.19	7.14	9.99	7.76	7.35	5.68	10.32	8.00
		$P3$	7.47	6.25	7.52	6.27	6.53	5.83	7.53	7.04
Validation	λ	$P1$	6.25	7.28	6.21	8.23	6.18	6.14	6.18	7.06
		$P2$	4.83	6.40	4.80	6.88	4.88	7.38	4.80	7.51
		$P3$	5.96	8.33	5.98	6.94	6.05	7.20	5.95	7.75
	μ_m	$P1$	2.80	13.76	2.76	13.33	2.79	13.97	2.72	13.76
		$P2$	2.55	10.97	2.49	10.66	2.55	11.12	2.48	11.48
		$P3$	2.24	11.79	2.21	11.64	2.20	12.82	2.21	10.68
	N_m	$P1$	7.87	6.79	7.89	5.69	7.97	6.73	7.95	5.89
		$P2$	9.38	6.55	9.52	6.60	9.37	6.75	9.39	7.68
		$P3$	6.94	6.34	6.84	5.39	6.86	6.01	6.90	6.15

That can be understood because fitting parameters of validation set are estimated in one step. Nevertheless, the fitting parameters of simulations sets are estimated after two previous processes, the parameters estimation of calibration samples and the generation of a validation set with a limited number of samples. Additionally, for simulation sets, the parameters of Model 3 tend to be slightly lower than those of other models. Although the mean parameter values of the validation sets will not be used in future computations, comparing them to the corresponding simulation sets gives a first rough view of the goodness of the simulation.

Table 4: Percentage of simulations that pass the chi-square test without reaching significance.

	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
$P1$	0	28	32	22
$P2$	0	29	23	16
$P3$	0	27	27	18
All	0	5	10	10

First, the chi-square test was performed on the total number of commercial “calçots” in a given population. The percentage of simulations that accomplish the chi-square without significance ($p \leq 0.01$) is very low: about 20% for Model 4 and about 30% for Models 2 and 3 (Table 4). No simulations of Model 1 pass the test, which indicates that a

given distribution of λ , μ_m and N_m , and not only their mean values, has to be considered in order to make reasonable predictions of the evolution of the crop.

To analyze the reason for the failures of the chi-square test, the residuals between the predicted and experimental values of N vs. time were plotted (Figure 3). As expected, Model 1 gave the highest residual values throughout the growing season. Models 2 and 3 show a similar tendency for any population and two smaller peaks are observed at counts 4 and 9. Model 4 follows a particular trend for any population, peaks are observed at count 4 for population 1 but peaks at counts 4 and 8 appear for population 3.

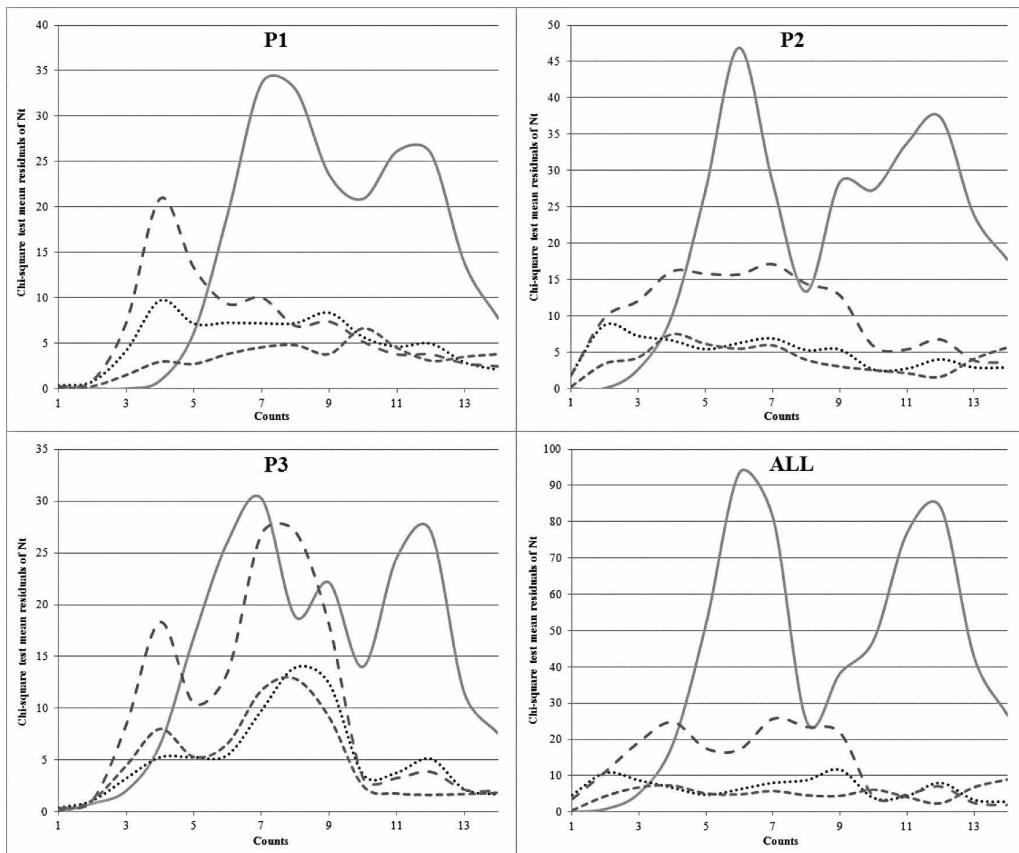


Figure 3: Chi-square test mean residuals of N_t between validation and simulation sets for 100 simulations.

As a second method to check the suitability of the simulations, a survival analysis was performed at the four times when 25%, 50%, 75%, and 90% of the “calçots” of one plant achieved the commercial size. In agreement with the results of the chi-square test, Model 1 fails for the three populations at all times. The other models behave differently depending on the percentage considered. When 25% of the “calçots” of a plant attained the commercial size (t_{25}), the number of successful simulations was visibly lower than

those corresponding to t_{50} , t_{75} , and t_{90} , for which more than 90% of the simulations were successful (Table 5).

Table 5: Percentage of simulations that fulfill the survival analysis without reaching significance ($p \leq 0.01$).

	t_{25}				t_{50}				t_{75}				t_{90}			
	$P1$	$P2$	$P3$	ALL												
Model 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Model 2	54	86	69	92	90	94	96	98	100	95	98	100	83	97	94	98
Model 3	73	86	87	95	99	94	97	100	99	97	97	99	99	98	100	100
Model 4	70	84	74	96	94	93	97	98	96	98	98	100	76	93	93	99

The third way to evaluate the simulation was a one-way ANOVA performed on the maximum number of commercial “calçots”, N_m . Again, the results showed that model 1 did not work (Table 6). Models 2 and 4 lead to more than 90% of simulations with the ANOVA test non-significant, whereas the suitability of Model 3 is clearly lower and varies greatly depending on the population.

Table 6: Percentage of simulations that fulfill the ANOVA for N_m .

	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
$P1$	4	99	32	100
$P2$	55	100	86	98
$P3$	17	94	65	99
All	55	100	93	97

A global comparison of the different models can be seen in Figure 4, where the total number of commercial “calçots” of any population, N , is represented. Points for the hundred simulations of any count are included. As stated above, the points of Model 1 are farthest from the target line, where experimental and calculated values of N would match. Models 2 and 4 tend to overestimate the production of “calçots”. For the last stages of the culture, when N_t approaches its maximum value, the points of Model 3 move away from the bisector, in agreement with the ANOVA test for N_m . Globally, the best predictions were achieved by Model 2.

4. Conclusions

The modified Gompertz function allowed us to compare several populations with different genotypes throughout the growing season instead of making the comparison at peak times when scoring is carried out.

The multinomial distribution of fitting parameters of the Gompertz function used in Model 2 was the best distribution to model the growth of “calçots”, predict the evolution of the crop, and decide the optimal harvest time.

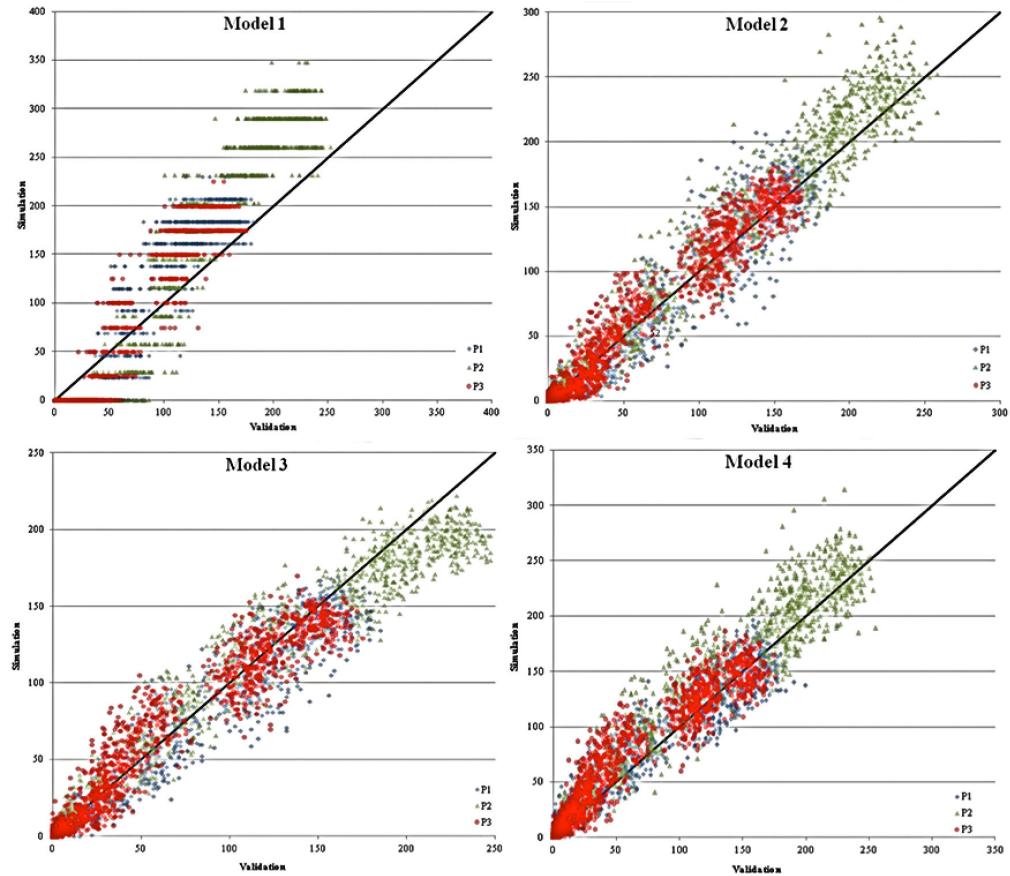


Figure 4: Simulation vs. validation of total number of commercial “calçots”. Symbols: \diamond P1, \triangle P2 and \circ P3.

Model 1 yielded the worst results for all the tests used. Thus, models that consider a given distribution of the Gompertz fitting parameters (λ , μ_m and N_m) are much more suitable to explain the growth of “calçots” than those that consider only mean values.

Studies of the effects of the environment and genotypes on crop growth are needed to understand the different behaviour of each population so that better models can be constructed for the entire growing season.

References

- Barker, D. J., Ferraro, F. P., Nave, R. L., Sulc, R. M., Lopes, F. and Albrecht, K. A. (2010). Analysis of herbage mass and herbage accumulation rate using Gompertz equations. *Agronomy Journal*, 102, 849–857.
- Box, G. E. P. and Cox, D. R. (1964) An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 26, 211–252.

- Chung, C., Du, H., Su, Y. and Zhang, X. (2009). *The R project for Comparisons of Several Multivariate Means*. In http://www.divms.uiowa.edu/kcowles/s166_2009/ChungS166projectreport.pdf (September 2012).
- Delignette-Muller, M. L., Pouillot, R., Denis J.-B. and Dutang C. (2010). fitdistrplus: help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data. <http://www.R-project.org>
- Fox, J., and Weisberg, S. (2011). *An R Companion to Applied Regression*. SAGE Publications, Thousand Oaks, Calif.
- Gil, M. M., Miller, F. A., Brandao, T. R. S. and Silva, C. L. M. (2011). On the use of the Gompertz model to predict microbial thermal inactivation under isothermal and non-isothermal conditions. *Food Engineering Reviews*, 3, 17–25.
- Højsgaard, S. and Halekoh, U. (2011). doBy: groupwise summary statistics, general linear contrasts, LSMEANS (least-squares-means), and other utilities. <http://www.R-project.org>
- Ismail, Z., Khamis, A. and Jaafar, Y. (2003). Fitting nonlinear Gompertz curve to tobacco growth data. *Pakistan Journal of Agronomy*, 2, 223–236.
- Johnson, R. A. and Wichern, D. W. (2007). *Applied Multivariate Statistical Analysis (6th Ed.)*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall. Chapter 6.
- Johnson, N. L., Kotz, S. and Balakrishnan, N. (1994). *Continuous Univariate Distributions*, volume 1, chapter 21. Wiley, New York.
- Mendiburu, F. (2010). agricolae: statistical procedures for agricultural research. <http://www.R-project.org>
- Royston, P. (1982). An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. *Applied Statistics*, 31, 115–124.
- Ramachandra Prasad, T. V., Krishnamurthy, K. and Kailasam, C. (1992). Functional crop and Cob growth models of maize (*Zea mays L.*) cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 168, 208–212.
- Ripley, B. D. (1987). *Stochastic Simulation*. Wiley. Page 98.
- Rodriguez-Gonzalez, O., Walkling-Ribeiro, M., Jayaram, S. and Griffiths, M. W. (2011). Cross-protective effects of temperature, pH, and osmotic and starvation stresses in *Escherichia coli* O157:H7 subjected to pulsed electric fields in milk. *International Dairy Journal*, 21, 953–962.
- Simoes, M. d. S., Rocha, J. V. and Lamparelli, R. A. C. (2005). Growth indices and productivity in sugarcane. *Scientia Agricola*, 62, 23–30.
- Singhi, N. O., Paul, A. K., Singh, N. G., Singh, P. and Alam, W. (2011). Modeling seasonal growth of fish using modified Gompertz model with sine wave function. *Indian Journal of Animal Sciences*, 81(6), 648–650.
- Tei, F., Aikman, D. P. and Scaife, A. (1996). Growth of lettuce, onion and red beet. 2. Growth modelling. *Annals of Botany*, 78, 645–652.
- Therneau, T. and Lumley, T. (2011). survival: survival analysis, including penalised likelihood. <http://www.R-project.org>
- Venables, W. N. and Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. and Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial-growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875–1881.



CAPÍTOL 3

Spanish onion landraces (*Allium cepa* L.) as sources of germoplasm for breeding calçots: a morphological and molecular survey

Joan Simó, Laura Pascual, Joaquín Cañizares and Francesc Casañas
Euphytica

Spanish onion landraces (*Allium cepa* L.) as sources of germplasm for breeding calçots: a morphological and molecular survey

J. Simó · L. Pascual · J. Cañizares · F. Casañas

Received: 10 July 2013 / Accepted: 26 August 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Calçots are the immature floral stems of second-year resprouts of the ‘Blanca Tardana de Lleida’ (BTL) onion landrace, and to date, breeding has used only a few populations. So, we aimed to increase our knowledge of the variability of BTL and to explore its characteristics and genetic dissimilarity with other varieties that might be used in calçot breeding programs. We analyzed the agronomic and morphological traits of four populations of BTL, two synthetic varieties of BTL, 20 prestigious Spanish landraces, and 4 exotic onion landraces. Furthermore, we used three combinations of AFLP primers and seven microsatellites to analyze their genetic background. The Spanish landraces (including BTL) shared a large part of their genetic background, which showed considerable variability (heterozygosity

around 0.5). Morphological traits also had high variability, so multiple breeding strategies can be used, ranging from intravarietal selection to crossings between populations to take advantage of the heterosis, both for the bulb and for the calçot improvement.

Keywords Calçots · Onions · AFLP-SSR · Spanish landraces · Breeding · Germplasm

Introduction

Calçots are the immature floral stems of second-year onion resprouts of the ‘Ceba Blanca Tardana de Lleida’ (BTL) landrace. The use of onions to produce calçots is recent: the first references to the use of these resprouts for grilling or roasting to be served with a typical sauce date from the late nineteenth century and professional production did not begin until the 1960s. Despite their short history, calçots have become an important crop in Catalonia (northeast Spain), reaching a market volume of about 20 million euros and expanding to other regions. Growing demand has revealed the need for more detailed information about the agronomic traits and availability of appropriate germplasm. In this context, our group recently developed tools for improving yields and sensory characteristics in calçots, obtaining two new varieties that enable farmers to extend the growing season and increase yields (Simó et al. 2012a, b, 2013).

J. Simó (✉) · F. Casañas
Departament d'Enginyeria Agroalimentària i
Biotecnologia, Escola Superior d'Agricultura, Universitat
Politècnica de Catalunya/Fundació Miquel Agustí,
Campus del Baix Llobregat, Carrer Josep Terrades 8,
08860 Castelldefels, Spain
e-mail: joan.simo@upc.edu

L. Pascual
Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et
Légumes, UR1052, INRA, 84143 Avignon, France

L. Pascual · J. Cañizares
Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrobiodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de
Valencia, Camino de la Vera 14, 46022 Valencia, Spain

Onions of the BTL landrace are nearly round (6.8 cm in width × 6 cm in height) and weigh about 145 g. With few exceptions, this is currently the only variety used for producing calçots. The resprouts are harvested in the winter when more than half the calçots from a single bulb reach the commercial size; during harvesting, the entire plant is uprooted and calçots not

fulfilling the requirements for commercial size are discarded. To be considered commercial size, as specified by the protected geographic indication (PGI) Calçot de Valls since 2006, calçots must be between 1.7 and 2.5 cm in diameter measured 5 cm above the root collar and the white, edible part must be between 15 and 25 cm in length (Fig. 1).



Fig. 1 Appearance of a few entries, showing the morphological variability in the bulb and calçot phases

To date, breeding programs have used the variability within the landrace, taking into account the allogamous nature of *Allium cepa* L. (Simó et al. 2012a, b). However, the knowledge about the variability in BTL and the ability of other varieties of onions to produce calçots will allow their use to improve agronomic and sensory traits in calçots. Likewise, it is important to know whether there are genetically differentiated groups within the genetic resources of onions that would make it possible to generate heterosis by crossing (synthetic varieties and hybrids).

Genetic background studies have used molecular markers to characterize the variability inside germplasm collections (Joshi et al. 1999). In onions, various markers have been employed, including random amplification of polymorphic DNA (Tanikawa et al. 2002; dos Santos et al. 2012), restriction fragment length polymorphism (Havey 1991; Bradeen and Havey 1995), simple sequence repeats (SSR) (Fischer and Bachmann 2000; Jakse et al. 2005; McCallum et al. 2006; Khar et al. 2008; Araki et al. 2010; Santos et al. 2010; Khar et al. 2011), and single nucleotide polymorphisms (Jakse et al. 2005; Khar et al. 2008; McCallum et al. 2008). However, microsatellites are the most widely used type of marker as, they are highly polymorphic and co-dominant. Thanks to the work of Fischer and Bachmann (Fischer and Bachmann 2000) and Masuzaki et al. (2006), a set of markers has been developed for *A. cepa*. The use of AFLP in onions is less common (van Heusden et al. 2000; Santos et al. 2011), and although they are dominant, they enable dozens of markers to be studied simultaneously.

Onions have probably been cultivated on the Iberian Peninsula for more than 2000 years, and many landraces have been documented (Castell and Diez 2000; Carravedo and Mallor 2007). These landraces' photoperiods and environmental adaptation make them appropriate candidates to use in calçot breeding programs. So, the aim of this study has been to: (i) characterize diverse populations of the BTL landrace and of the main Spanish landraces of onions with respect to their agronomic and morphological traits and their genetic background, and (ii) discuss their potential use in calçot breeding programs.

Materials and methods

Plant materials

We studied a total of 30 *A. cepa* L. accessions: 6 accessions of the BTL landrace, 20 accessions of other prestigious Spanish landraces, and 4 accessions of onions from other parts of the world (exotic landraces), which were used for anchorage in the molecular studies (Table 1). Of the six BTL entries, four were collected in the calçot production area and two were obtained after a cycle of selection. The remaining accessions were supplied by the germplasm bank of the Institute for the Conservation and Improvement of Valentian Agrodiversity (COMAV). During cultivation, the 4 exotic landraces developed severe problems that precluded their inclusion in the agronomic and morphological analyses.

Phenotypic characterization

Bulbs

The field trials were performed in La Masó in northeast Spain ($41^{\circ}13'47''N$, $01^{\circ}13'12''E$). Located in the middle of the Calçot de Valls PGI, the climate and soil of La Masó are representative of the whole area. In February 2009, the accessions were transplanted in plots of 25 individuals in a randomized three-block design at a density of 100,000 plants per hectare. In July, the bulbs were harvested and the diameter (cm), height (cm), and weight (g) were measured. The color of the flesh and skin according to qualitative scales were also recorded.

Calçots

In August, the bulbs were replanted in 15 cm deep furrows at a density of 8,000 plants per hectare, following the same randomized block design used for the bulbs. The resprouts arising in the autumn were covered with earth two or three times to increase the length of the edible white part according to the traditional practice in the PGI. The plants were harvested individually between December and March when at least 50 % of the calçots in a plant reached the commercial size specified by the PGI, and the diameter, length, weight, total number of calçots,

Table 1 Onion accessions used in this study

Accession	Variety name	Geographic origin
Spanish landraces		
1392	Ceba Blanca Mallorquina	Porreres (Balearic islands)
1624	Ceba de Figueres	Vilamalla (Girona)
2406	Cebolla de Lanzarote	Lanzarote (Canary islands)
3277	Cebolla del Bierzo	Bembibre (León)
4724	Cebolla Babosa	Crevillent (Alacant)
10606	Cebolla del Belorao	Burgo de Osma (Soria)
10677	Cebolla de Colomera	Colomera (Granada)
10701	Cebolla de Nerja	Nerja (Málaga)
10702	Cebolla Amarilla de Ibarra	Ibarra (Guipúzcoa)
10827	Cebolla del Goloso Blanca	Logrosán (Cáceres)
10832	Cebola Longa	Coron (Pontevedra)
10834	Cebola de Betanzos	Souto (A Coruña)
10836	Cebolla del Terreno	Hervás (Cáceres)
11045	Ceba Morada d'Amposta	Amposta (Tarragona)
11047	Cebolla del Horcal	Herrera de Pisuerga (Palencia)
11103	Cebolla de Fuentes	Fuentes de Ebro (Zaragoza)
11227	Cebolla Bedoya	Esanos (Cantabria)
11594	Cebolla Recas	Santa fe (Granada)
11922	Cebolla del Monjero	Torres de Alcanadre (Huesca)
11932	Cebolla Chata de Pintano	Pintanos (Zaragoza)
World landraces		
159	Onion	Meskala (Morocco)
162	Onion	Oulad Abdallah Tadla (Morocco)
6028	Onion	Pelileo (Cuba)
12360	Onion	Chilas (Pakistan)
BTL landraces		
A	Ceba Blanca Tardana	Valls (Tarragona)
B	Ceba Blanca Tardana	Valls (Tarragona)
C	Ceba Blanca Tardana	Valls (Tarragona)
E	Ceba Blanca Tardana	Valls (Tarragona)
BTL breeding varieties		
B102	Ceba Blanca Tardana	Breeding program
B171	Ceba Blanca Tardana	Breeding program

The variety name and the geographic origin are indicated

and number of commercial calçots were recorded (Fig. 1).

Molecular characterization

Isolation of genomic DNA

Total genomic DNA was isolated individually from fresh young leaves of 20- to 30-day-old seedlings of six single plants per accession, as described by Dellaporta et al. (1983). DNA quality was checked

by agarose gel, quantified using Nanodrop, normalized to a concentration of 50 ng/μl, and stored at -20 °C until used.

AFLP analysis of variability

A sample of 100 ng DNA of each plant was digested with the enzyme combination *Eco*RI and *Mse*I at 37 °C for 2 h. Ligation was performed with the AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's instructions. After

ligation, the reaction mixture was diluted 1:10 in Tris 10 mM pH 8. For the preselective amplification, a 5 µl aliquot from the DNA dilution was added to a 25 µl solution containing 2.5 µl of 10× buffer, 0.5 µl of primer *EcoA* (10 µmol/l), 0.5 µl of primer *MseC* (10 µmol/l), 1 µl of dNTPs (10 mmol/l), and 0.8 U of Taq polymerase (Roche, Basel, Switzerland). After preamplification, DNA was diluted again 1:10 in Tris 10 mM pH 8. The selective amplification was performed on 2 µl aliquots using 3 combinations of primers. DNA fragments were separated in an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster city, California, USA). In order to build a binary matrix, the AFLP fragments of all accessions were scored for presence or absence with the Genographer software (v 2.1.4) (Benham et al. 1999).

Microsatellite analysis of variability

For microsatellite analysis, we tested all the microsatellite primer sets from Fischer and Bachmann (2000) and then we selected the seven primers more informative to realize the analysis (AMS 08, AMS 10, AMS 12, AMS 14, AMS 16, AMS 25, AMS 30). PCR reactions were performed according to the procedure reported by these authors and products were separated using an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. The allele lengths for the SSRs were determined using Peak Scanner™ software v1.0 (Applied Biosystems, Woolston, UK).

Data analysis

Agronomic and morphological data were analyzed using an ANOVA including the effects for accession, block, and the interaction accession x block. For comparison of means, the least significant difference with a level of significance of $p \leq 0.05$ was used. To simplify the results presentation and facilitate their interpretation, we performed principal components analyses (PCA) using the agricolae package (Mendiburu 2010) from R program version 2.13.0 (<http://www.r-project.org>) for the morphological characteristics, and we performed principal coordinate analysis (PCoA) using Ginkgo (Bouxin 2005) for AFLPs, and Genetix software (v.4.05) (Belkhir et al. 1996–2004) for SSR. To calculate the genetic distances, we used the Mahalanobis distance for morphological traits and Nei's distance (Nei 1978) for microsatellites and AFLPs. We used Genetix to compare different distance

matrices with Mantel's test. Finally, the polymorphism information content (PIC) was calculated, according to Weir (1996), to estimate the discriminatory ability and informativeness of microsatellite markers.

Results

Agronomic and morphological variability

The ANOVA showed significant ($p < 0.0001$) differences between means for all traits studied (Table 2 and 3). The only trait that differentiated BTL from the remaining accessions was the number of commercial calçots, as all the BTL accessions yielded significantly more commercial calçots than the other accessions. For the variable total number of calçots (commercial + noncommercial calçots), some varieties (10701, 10702, and 10827) had high values that did not differ significantly from those of BTL; however, most varieties had significantly lower values for this variable (Table 3).

Only BTL and accession 1392 have white skin, and only BTL and 1392, 1624, 3277, 4724, and 11932 have white flesh (Table 2). For the rest of the traits of both the bulbs and calçots, all the accessions had wide variation and no clear clusters were evident.

In the PCA of agronomic and morphological characters the two first axes explain 64.71 % of the variability (Fig. 2). Adding a third axis increases the variability explained to 82.13 %. The traits that contribute most strongly with the first axis are bulb weight ($r = -0.4$) and bulb and calçot diameters ($r = -0.32$). The traits that contribute most strongly with the second axis are number of commercial calçots ($r = 0.65$), calçot diameter ($r = -0.35$), and bulb diameter ($r = 0.32$). In the graphic representation over the first two axes (Fig. 2), no clear group is detected. BTL and the improved versions of BTL are relatively close to one another, but are not separated from the other accessions. Accession 10827 is very close to the unimproved BTL accessions, coinciding with them in calçot size and high total number of calçots.

AFLP analysis

A total of 201 bands were identified; 74 (36.82 %) of these were polymorphic (Table 4). None was specific to BTL or to any of the other landraces.

Table 2 Mean values and variation coefficient (CV) for all entries and average of groups, in the agronomic and morphologic traits of the onions bulbs

Accession	Onion											
	Largest diameter (cm)		Smallest diameter (cm)		Medium diameter (cm)		Height (cm)		Weight (cm)		Skin color	Flesh color
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
Spanish landraces group												
1392	95.36	0.14	91.04	0.12	93.20	0.12	79.45	0.09	347.81	0.25	White	White
1624	86.17	0.15	82.13	0.15	84.15	0.15	59.09	0.10	225.00	0.47	Red-grey	White
2406	49.40	0.12	48.39	0.12	48.90	0.12	34.85	0.12	44.63	0.32	Orange-grey	Yellow
3277	69.92	0.18	67.72	0.18	68.82	0.18	50.15	0.11	132.08	0.55	Orange-grey	White
4724	83.06	0.12	78.88	0.13	80.97	0.13	66.46	0.07	222.46	0.30	White-green	White
10606	72.38	0.20	67.14	0.21	69.76	0.21	83.31	0.20	213.08	0.44	Orange-grey	Yellow
10677	89.89	0.14	84.70	0.07	87.30	0.10	78.35	0.09	309.55	0.26	Orange-grey	Yellow
10701	62.31	0.17	58.40	0.18	60.35	0.17	44.14	0.13	83.10	0.44	Red-purple	Red-purple
10702	90.18	0.15	82.03	0.14	86.10	0.14	61.55	0.13	203.18	0.40	Orange	Yellow
10827	69.01	0.13	65.92	0.12	67.47	0.12	49.45	0.12	118.36	0.35	Orange-grey	Yellow
10832	79.61	0.14	75.48	0.12	77.54	0.12	60.16	0.14	194.00	0.36	Orange-grey	Yellow
10834	70.22	0.18	66.96	0.17	68.59	0.17	47.49	0.20	122.00	0.52	Orange-grey	White-green
10836	74.73	0.14	73.57	0.13	74.15	0.14	61.84	0.08	182.17	0.30	Orange-grey	Yellow
11045	88.27	0.12	85.16	0.13	86.72	0.12	67.07	0.08	251.00	0.35	Purple-grey	Purple-grey
11047	81.65	0.14	77.86	0.13	79.75	0.14	57.25	0.16	196.86	0.40	Orange-grey	Yellow
11103	88.78	0.35	82.05	0.20	85.41	0.21	81.63	0.16	352.67	0.48	White-green	Yellow
11227	76.84	0.10	73.40	0.14	75.12	0.12	52.97	0.11	148.80	0.32	Orange-grey	Yellow
11594	64.68	0.17	63.05	0.20	63.87	0.19	70.23	0.13	159.20	0.39	Purple-grey	Yellow
11922	59.32	0.14	57.97	0.13	58.65	0.13	111.52	0.15	171.55	0.27	Orange-grey	Yellow
11932	87.23	0.12	82.57	0.12	84.90	0.12	47.94	0.10	189.14	0.27	Yellow	White
Mean	76.95	0.33	73.22	0.24	75.09	0.22	63.25	0.28	193.33	0.24		
BTL entries group												
A	76.13	0.19	61.91	0.17	69.02	0.17	60.34	0.10	141.65	0.32	White	White
B	63.45	0.16	54.11	0.15	58.78	0.14	54.88	0.09	93.56	0.37	White	White
C	74.51	0.25	62.55	0.18	68.53	0.21	62.41	0.17	163.69	0.52	White	White
E	80.12	0.21	63.15	0.14	71.54	0.17	65.21	0.12	158.34	0.31	White	White
Mean	73.55	0.17	60.43	0.11	66.97	0.15	60.71	0.26	139.31	0.22		
Improved BTL entries group												
B102	77.22	0.24	66.18	0.20	71.70	0.22	63.75	0.19	176.92	0.50	White	White
B171	78.44	0.11	67.86	0.10	73.15	0.08	57.57	0.11	155.86	0.36	White	White
Mean	77.83	0.37	67.02	0.32	72.42	0.45	60.66	0.25	166.39	0.16		
LSD ($p \leq 0.05$)	11.40		9.15		10.14		6.96		62.25			

We performed PCoA to investigate possible similarities in the genetic backgrounds of the plants from the diverse accessions. The first plane of the principal component analysis, which explains 9.63 % of the total variation, shows that plants from the same accession are clustered, but there is a large overlap

between accessions (Fig. 3). Besides, selection within BTL has separated the new varieties, which are concentrated in the extreme right of the first plane. By contrast, the unimproved BTL accessions overlap with representatives of many other landraces (Fig. 3).

Table 3 Mean values and variation coefficient (CV) for all entries and average of groups, in the agronomic and morphological traits of the calçots

Accession	Calçots													
	Largest diameter (cm)		Smallest diameter (cm)		Medium diameter		Length (cm)		Weight (cm)		Total calçots		Commercial calçots	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Spanish landraces group														
1392	20.84	0.27	17.58	0.27	19.21	0.26	13.33	0.15	89.18	0.56	5.57	0.40	1.14	1.47
1624	17.51	0.40	15.06	0.44	16.28	0.41	12.96	0.13	67.61	0.81	3.00	0.69	0.35	2.26
2406	19.94	0.20	17.88	0.21	18.91	0.20	18.82	0.14	97.14	0.42	6.57	0.24	0.36	2.51
3277	24.65	0.31	15.72	0.29	20.19	0.29	12.34	0.17	50.25	0.54	3.10	0.67	0.00	0.00
4724	17.84	0.21	14.81	0.22	16.33	0.21	14.38	0.12	75.38	0.54	3.42	0.66	0.25	2.38
10606	21.66	0.37	19.43	0.41	20.54	0.39	15.00	0.13	114.80	0.68	2.57	0.69	0.43	1.55
10677	27.99	0.10	25.80	0.14	26.90	0.11	14.14	0.09	181.57	0.39	4.69	0.64	1.31	0.97
10701	17.53	0.32	13.68	0.37	15.60	0.34	17.85	0.12	72.00	0.50	8.21	0.71	2.21	1.20
10702	21.23	0.22	17.67	0.24	19.45	0.22	15.06	0.14	93.72	0.47	8.58	0.60	1.58	1.17
10827	22.06	0.28	18.49	0.30	20.28	0.29	15.95	0.33	108.26	0.55	6.72	0.50	0.67	1.66
10832	17.96	0.30	15.42	0.31	16.69	0.30	13.19	0.13	64.26	0.59	3.29	0.58	0.64	2.00
10834	18.08	0.31	15.37	0.31	16.73	0.31	12.86	0.10	59.32	0.65	3.36	0.39	0.64	1.81
10836	24.19	0.18	21.74	0.22	22.97	0.20	14.56	0.11	138.44	0.33	2.73	0.54	0.73	1.36
11045	20.98	0.23	18.20	0.23	19.59	0.22	16.05	0.11	101.78	0.41	2.94	0.50	0.41	3.01
11047	17.33	0.30	14.57	0.35	15.95	0.32	13.50	0.22	68.48	0.65	3.33	0.60	0.56	2.01
11103	27.63	0.16	22.49	0.16	25.06	0.15	10.18	0.23	144.79	0.29	2.67	0.18	0.00	0.00
11227	17.32	0.26	14.53	0.24	15.93	0.25	8.91	0.13	76.18	0.25	3.58	0.39	1.42	0.79
11594	27.65	0.18	24.40	0.21	26.02	0.19	15.52	0.18	165.43	0.46	3.58	0.42	0.67	1.77
11922	21.98	0.21	17.48	0.22	19.73	0.22	14.00	0.13	91.42	0.41	2.82	0.36	0.27	2.26
11932	24.17	0.28	19.06	0.35	21.62	0.30	15.36	0.14	119.68	0.67	3.30	0.54	1.00	1.10
Mean	21.43	0.28	17.97	0.28	19.70	0.28	14.20	0.37	98.98	0.28	4.20	0.29	0.73	0.49
BTL entries group														
A	19.68	0.16	15.92	0.19	17.80	0.17	14.55	0.10	69.59	0.32	8.94	0.38	5.08	0.86
B	21.59	0.08	19.03	0.09	20.31	0.08	9.35	0.21	105.60	0.10	9.91	0.35	5.12	0.68
C	22.70	0.16	17.60	0.16	20.15	0.14	11.90	0.22	103.20	0.10	9.91	0.46	4.30	0.59
E	16.79	0.10	14.02	0.10	15.40	0.07	16.10	0.12	84.20	0.04	9.88	0.33	3.06	1.19
Mean	20.19	0.27	16.64	0.31	18.41	0.35	12.97	0.33	90.65	0.76	9.66	0.13	4.39	0.28
Improved BTL entries group														
B102	22.07	0.10	19.83	0.12	20.95	0.10	15.00	0.18	118.10	0.12	14.40	0.46	5.79	0.97
B171	23.00	0.15	19.62	0.21	21.31	0.17	16.05	0.14	114.90	0.15	15.11	0.35	5.98	0.90
Mean	22.53	0.23	19.72	0.28	21.13	0.27	15.53	0.12	116.50	0.13	14.76	0.14	5.89	0.04
LSD (<i>p</i> < 0.05)	3.13		1.53		2.14		2.10		24.14		3.36		2.84	

The accessions differ in the dispersion of their individual plants, that is, in their intravarietal variability. Accession 162 is a good example of low intravarietal variability and BTL is a good example of high intravarietal variability (Fig. 3). The exotic landraces are in the same rank of variation as the rest of the varieties, overlapping in with many of them (Fig. 3).

Microsatellite analysis

For the seven set of primers used for the analysis we identified 71 alleles (mean 10.14 alleles per primer, range 8–14); 14 of these alleles were accession-specific, and one specific of a BTL accession. Values of PIC, ranged from 0.57 to 0.87 (Table 5).

Fig. 2 First plane of the principal coordinate analysis (64.7 % of total variation) from the morphological and agronomic data

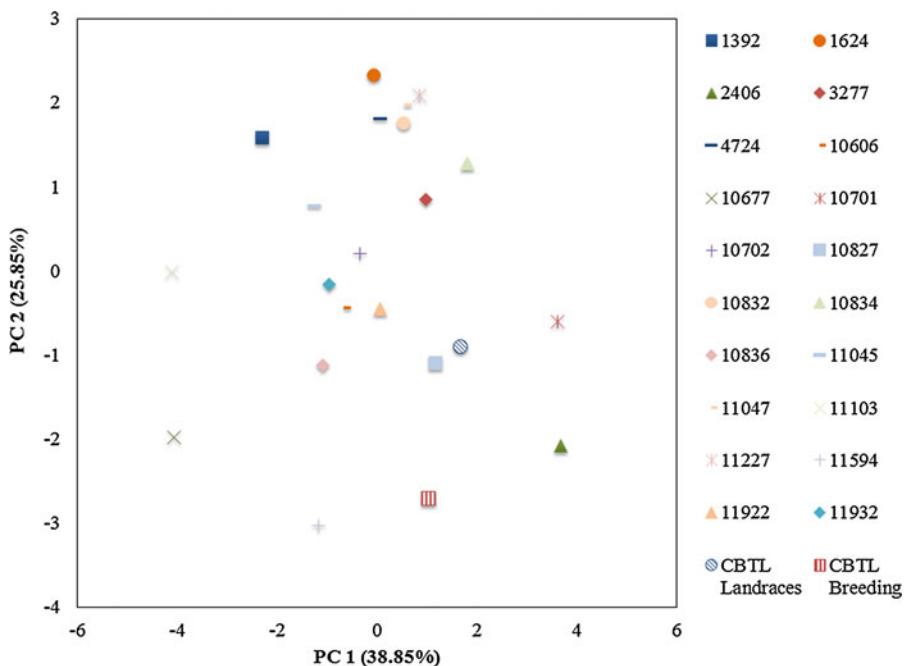


Table 4 Oligonucleotide adaptors and primers used, total fragments amplified, polymorphic bands obtained, and percentage of polymorphism in each combination of primers

EcoRI	Msel	Total fragments	Polymorphic bands	% Polymorphism
ACC	CAA	101	45	44.60
ACG	CAC	54	22	40.70
AGG	CAC	46	7	15.20
Total		201	74	36.82
Average		67	24.70	

Heterozygosity values were around 50 % in most cases (Table 6), except accessions 11922 and 11932, which had lower values. No significant differences ($p \leq 0.05$) in heterozygosity were found between improved and unimproved populations of BTL (Table 6).

As in the other approaches, we performed PCoA to analyze the relations among the accessions and within accession. In this case, the first plane explains 8.17 % of the variability. One of the exotic landraces (12360) was considerably far from the other accessions and was excluded of the Figure to better show the distribution of the remaining accessions. Although plants from the same accession were distributed in limited areas, there is a considerable overlapping among accessions.

Comparison of analyses

We used Mantel's test to examine the relationships between the matrices of distance obtained from the different approaches. The matrix from the analysis of agronomic and morphological markers did not correlate with matrices from the analyses of the genetic background. A low ($r = 0.254$) but significant ($p < 0.05$) relation was found between the matrices from the AFLP and microsatellite analyses.

Discussion

Characterization of agronomic and morphological traits

Bulbs

The overlap among the populations seen in the multivariate analysis (Fig. 2) is enhanced by the variability within the populations (Tables 2 and 3). For instance, the bulb's weight ranges from 44 to 352 g in the Spanish landraces and from 93 to 158 g in the BTL landrace. In spite of these important differences in the means between accessions, which become larger as the group studied becomes larger, the

Fig. 3 First plane of the principal coordinate analysis (9.62 % of total variation) from the AFLP data. Each symbol represents a plant within an accession

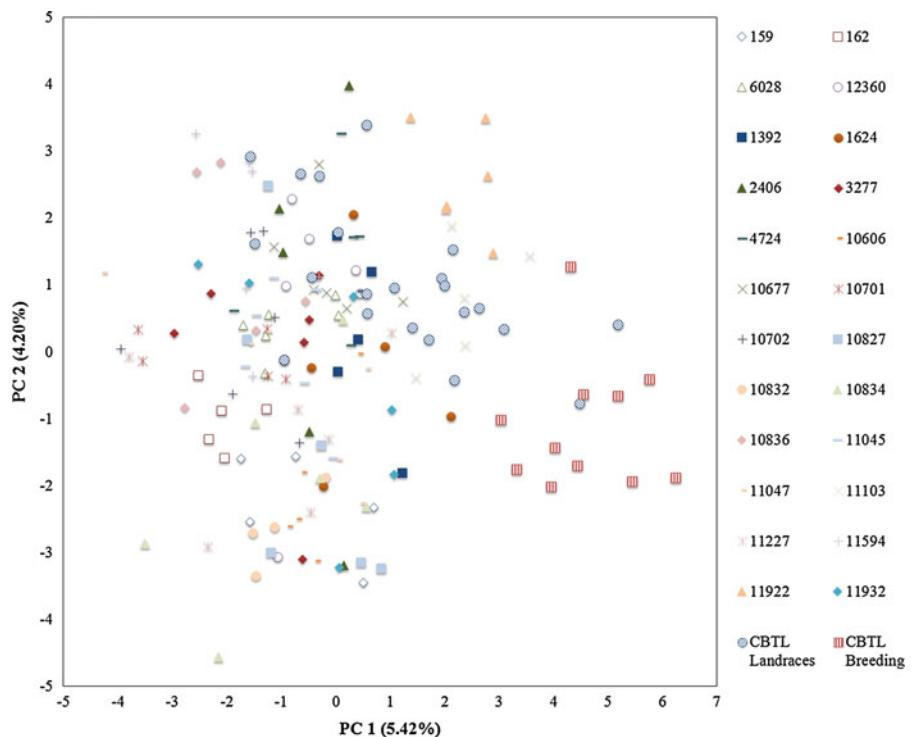


Table 5 Markers, alleles size obtained and polymorphic information content (PIC)

Marker	Alleles (bp)	PIC
AMS 08	178, 180, 182, 184, 208, 216, 218, 234, 238	0.57
AMS 10	160, 162, 164, 176, 178, 180, 182, 184	0.73
AMS 12	275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295,	0.87
AMS 14	170, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198	0.87
AMS 16	270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284	0.84
AMS 25	256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272	0.68
AMS 30	238, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268	0.85

analysis of the coefficients of variation reveals that the variability within accessions is very large. Thus, within the group of Spanish landraces the coefficients of variation range from 0.25 to 0.55, within the BTL group they range from 0.31 to 0.52, and within the improved BTL they range from 0.36 to 0.50.

Although part of the variability estimated through the coefficients of variation is environmental, the significant differences between means for different accessions also show that there is considerable genetic variability that can be exploited to generate new varieties of onions. Similar behavior is observed for the diameters, height, and color of the skin and flesh. So, the Spanish landraces comprise an extremely rich genetic pool for morphological traits (Table 2) with

considerable overlap (Fig. 1 and Table 2). The variability among BTL accessions suggests that a significant part of the variability detected within BTL accessions is genetic (Table 2).

Calçots

The results of the study of the calçot stage are similar to those of the study of the bulb stage, but as expected, the BTL landrace excelled in the traits related to the use of onions as calçots. The mean number of commercial calçots in the Spanish landraces ranged from 0 to 2.21 compared to 3–5.12 in the unimproved BTL accessions and 5.79–5.98 in the improved BTL accessions

Table 6 Estimations of heterozygosity for each accession

Accession	Heterozygosity (SE)	Accession	Heterozygosity (SE)
Spanish landraces		World landraces	
1392	0.58 (0.11)	159	0.54 (0.08)
1624	0.62 (0.05)	162	0.34 (0.11)
2406	0.63 (0.02)	6028	0.50 (0.11)
3277	0.66 (0.04)	12360	0.51 (0.05)
4724	0.46 (0.11)		
10606	0.49 (0.10)	BTL landraces	0.65 (0.08)
10677	0.58 (0.05)	A	0.35 (0.10)
10701	0.37 (0.10)	B	0.48 (0.08)
10702	0.54 (0.11)	C	0.37 (0.09)
10827	0.51 (0.05)	E	0.56 (0.11)
10832	0.60 (0.07)		
10834	0.45 (0.09)	BTL breeding var.	0.52 (0.09)
10836	0.55 (0.07)	B102	0.55 (0.09)
11045	0.66 (0.03)	B171	0.55 (0.05)
11047	0.49 (0.07)		
11103	0.47 (0.11)		
11227	0.55 (0.11)		
11594	0.57 (0.04)		
11922	0.20 (0.01)		
11932	0.15 (0.11)		

(Table 3). We cannot know whether BTL has always yielded a higher number of calçots than other Spanish landraces, but it clearly surpasses them in this trait now, possibly as a consequence of selection for calçot production. This idea is reinforced by the higher number of commercial calçots in the improved varieties of BTL (Table 3).

As the remaining Spanish landraces have never undergone selection for the number of commercial calçots, it is interesting to analyze the variability in the total number of calçots and in the characteristics of the calçots that would enable selection to obtain commercial calçots. As mentioned, commercial calçots are defined by the width and height of the edible part of the plant.

The mean largest diameter ranges from 17 cm to 27 cm in calçots produced by the Spanish landraces (coefficient of variation ranging from 0.16 to 0.40), from 16 to 21 cm in the unimproved BTL group (coefficient of variation ranging from 0.08 to 0.16), and from 22 to 23 cm in the improved BTL group

(coefficient of variation ranging from 0.10 to 0.15) (Table 3). As in the bulb stage, there is considerable overlap between accessions, even though the coefficients of variation within the BTL populations are lower, probably due to the selection pressure over the last century.

The mean length of the white edible part of the calçot ranged from 8.91 to 18.82 in the group of Spanish landraces (coefficient of variation ranging from 0.09 to 0.33), with many overlapping groups of significance, and from 9.35 to 16.10 in the BTL group (coefficient of variation ranging from 0.10 to 0.22 within the unimproved BTL accessions and from 0.14 to 0.18 within the improved BTL varieties) (Table 3).

The mean total number of calçots ranged from 2.57 to 8.58 in the Spanish landraces (coefficient of variation ranging from 0.18 to 0.71). No significant differences were found among the unimproved BTL accessions, where the means were about 9.5 (coefficient of variation ranging from 0.33 to 0.46), or among the improved BTL accessions, where the means were about 14.5 (coefficient of variation ranging from 0.35 to 0.46) (Table 3).

Molecular characterization

The AFLP analysis reveals nearly continuous variation in Spanish onion populations and even in the larger group including the exotic landraces used as references. The variability within some populations is low, for example, the accessions 162 from Morocco and 6028 from Cuba, and Spanish landrace 3277. The low variability of these populations suggests they might be derived from few plants and developed in considerable isolation. On the other hand, some populations, notably 10834, have wide variability (Fig. 3). The unimproved BTL accessions tend to have medium high values in the first two axes of the PCoA analysis, whereas the improved BTL accessions tend to have very high values in the first axis and medium values in the second axis (Fig. 3). It seems that the process of selection within BTL has generated populations that are fairly separated from the rest. Although it is unlikely, the high number of commercial calçots (the criterion for selection) could be linked to one or more of the AFLP markers used.

With few exceptions (perhaps 10834, mentioned above), plants from a single accession tend to lie in the same zone of the plane defined by the first two axes,

but the plot suggests considerable, permanent gene flux between varieties that makes it difficult to separate them with this kind of marker (Fig. 3).

The mean of 10 alleles per SSR identified in the set of accessions reveals considerable variability in the set of varieties and populations studied. (Sanchez et al. 2007; Pérez-Vega et al. 2009; Soengas et al. 2011; Formisano et al. 2012; Yao et al. 2012).

As regards the clustering of plants from the same accession, the two first components of the multivariate analysis show that the plants from accession 12360 from Pakistan are relatively clustered and separated from the rest of the accessions. Another accession that tends to lie on the periphery of main group is Spanish landrace 11922 (Fig. 4). The remaining accessions tend to concentrate in a small space in the plane defined by the first two components. Despite the overlap among varieties, the trend is for plants proceeding from the same accession to cluster in small areas of the plane (Fig. 4). This suggests the existence of real groups (the varieties) with considerable gene flux between varieties. Apparently, the selection process in BTL has resulted in a loss of genetic diversity, as the improved BTL plants are less widely dispersed than the unimproved BTL plants.

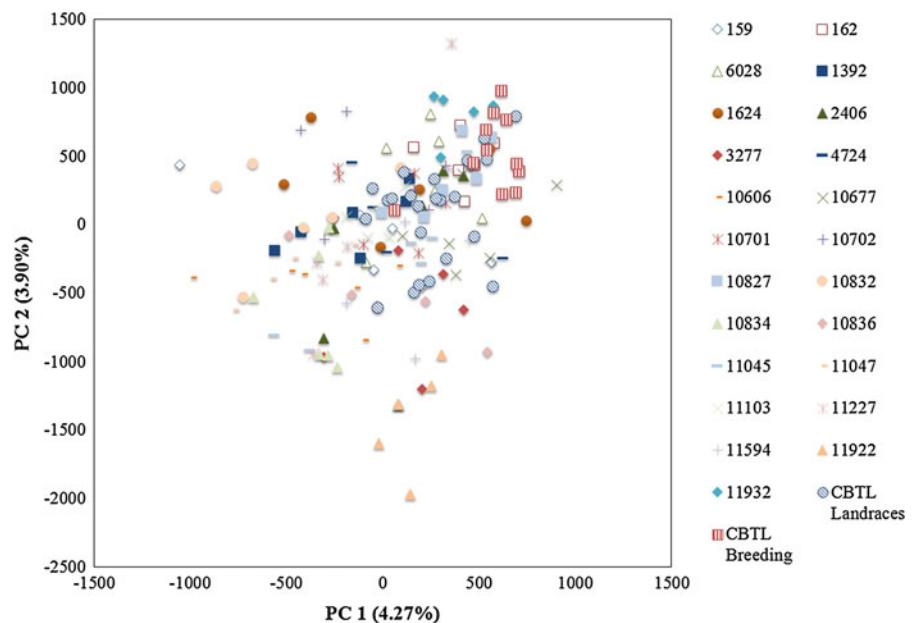
Concerning the exotic accessions, the distributions of the two from Morocco and the one from Cuba overlap with those of some Spanish landraces and in particular with the distribution of the plants of both the improved

and unimproved BTL accessions. This genetic proximity could be explained by the history of cultural exchange between Spain and these countries. On the other hand, the only variety that was really isolated from the others genetically was the one from Pakistan.

The most difficult case to understand is that of Spanish landrace 11922, whose plants tend to segregate from the area where most of the accessions are found. Although the lack of information about this population makes it impossible to know the reasons for its singularity, it seems likely that exotic material plays a role.

The SSR study enables us to estimate the degree of heterozygosity of the populations (Table 6). The values of about 50 % estimated for most of the accessions correspond to a situation of Hardy–Weinberg equilibrium with alleles with similar frequencies that have thus probably not undergone selection. The most important deviations are on the low end of the heterozygosity scale (accessions 11922 and 11932). As the estimations were made with supposedly neutral markers, the low heterozygosity in these two populations is probably due to consanguinity processes, perhaps to bottlenecks in the multiplication of the population. The selection process within BTL has not significantly modified the degree of heterozygosity (Table 6), which is important when interpreting possible problems of consanguinity in the selected populations.

Fig. 4 First plane of the principal coordinate analysis (8.17 % of total variation) from the microsatellite data. Each symbol represents a plant within an accession



The morphological and molecular variability global approach to the genetic structure of Spanish onion population

The Mantel test found no significant correlation between the agronomic and morphological results and the molecular results. Diverse factors might explain this situation, which is common in all species (Sarikamis et al. 2010; Zhang et al. 2010; Belaj et al. 2011; Casals et al. 2012). On the one hand, there is extensive overlapping both at the agromorphological and molecular levels. On the other hand, agromorphological differentiation between landraces is normally coded by few genes that affect a few easily identifiable morphological traits and it is difficult to link one of the molecular markers used to these genes. Moreover, the low but significant correlation revealed by Mantel's test between the AFLP approach and the microsatellite approach ($r = 0.254$, $p \leq 0.05$) seems to indicate that the two approaches are complementary and could help us confirm distant materials if we want to explore combinations to produce heterosis. The fact that one of the markers is dominant and the other is codominant explains the low (but significant) value on Mantel's test.

All the data suggest that the Spanish onion landraces are a set of populations that can be differentiated by the combination of morphological traits of the bulb (they can rarely be differentiated by a single distinctive trait, Tables 2 and 3). This overlap at the morphological level of the bulb and also at the calçot level corresponds to a wide variability and overlap at the molecular level that was detected by both AFLP and SSR. Onions are an allogamous species and probably there has been a permanent flux of genes among these landraces that has been greater between varieties growing in geographically close locations. Farmers have maintained these traits within the landraces by selecting for a few differential traits, but these morphological traits do not correspond to the molecular markers we have used and do not seem to be linked to them, as the molecular approach showed extensive overlap among populations.

This situation is similar to that reported in other species, where it is very difficult to differentiate among varieties at the level of the genetic background because they are separated by only a few morphological traits that sometimes even overlap. This has been reported in Spain for allogamous species like *Brassica*

(Soengas et al. 2011) and in autogamous species like tomatoes (Casals et al. 2011; Casals et al. 2012) or beans (Sanchez et al. 2007).

Implications for calçot breeding programs

For our purposes the most important trait analyzed in this study is the number of commercial calçots per bulb. Apparently, the only landrace that has variability that can be exploited for this trait is BTL, as the mean number of commercial calçots in the other landraces is significantly lower (Table 1). The gains in this trait from selection within BTL are evidence of this variability, as is shown by the results of the improved varieties (Table 1).

If we assume that this difference is due to selection processes, that the number of commercial calçots can be increased in all varieties, and that the number of commercial calçots is related to the total number of calçots, some landraces could contribute to the improvement of BTL. The best candidates seem to be 10701, 10702, and 1393, whose mean number of calçots ranges from 5.5 to 8.5 and whose mean number of commercial calçots ranges from 1.14 to 2.21 (Table 1).

In any case, the results present us with an open situation in which it would be able to select within varieties and continue the selection process (the variability within BTL is high and apparently not exhausted). This open situation would also permit new populations to be created by crossing BTL populations with others to carry out selection to obtain synthetic varieties from the new gene pools created, and third to think about obtaining hybrids by taking advantage of the landraces that have potentially good characteristics and the maximum distances in the genetic background to try to take profit of the heterosis.

Conclusions

The morphology of the Spanish landraces overlaps and a combination of characteristics are necessary to differentiate among them. The considerable variability within landraces makes differentiation at the bulb level even more difficult.

The BTL landrace yields the highest number of commercial calçots. It is unknown whether this superiority existed before the landrace was used for

calçot production or whether it results from relatively recent selection processes applied in its use for calçot production.

The genetic background at both the AFLP and SSR levels shows great variation within varieties. Although plants of the same variety tend to cluster in the plane defined by the first two axes in the PCoA, the accessions overlap, revealing considerable gene flux. This flux might have occurred long ago or it might have occurred in modern times after the interchange of materials increased. In any case, the allogamy of the species and the fundamentally entomophilous pollination would favor this situation and would also explain the nearly 50 % heterozygosity found in most populations. These results suggest that Spanish landraces share a large part of their genetic background and that this set has considerable variability. As the morphological traits that are interesting for calçot production also have considerable variability multiple breeding strategies can be used: creation of new populations by crossing interesting populations and then applying selection or development of complementary populations with the aim of obtaining hybrid onions to produce calçots.

The information gathered in this study, especially about the characteristics of the onion bulbs and the genetic distances between populations, can also help breeders identify heterotic patterns for onion production or quality.

References

- Araki N, Masuzaki SI, Tsukazaki H, Yaguchi S, Wako T, Tasahiro Y, Yamauchi N, Shigyo M (2010) Development of microsatellite markers in cultivated and wild species of sections Cepa and Phyllodolon in *Allium*. *Euphytica* 173(3):321–328
- Belaj A, Leon L, Satovic Z, de la Rosa R (2011) Variability of wild olives (*Olea europaea* subsp *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agro-morphological traits and SSR markers. *Sci Hortic* 129(4):561–569
- Belkhir K, Borsig P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996–2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier (France), Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II
- Benham J, Jeung J-U, Jasieniuk M, Kanazin V, Blake T (1999) Genographer: a graphical tool for automated fluorescent AFLP and microsatellite analysis. *J Agric Genom* 4:3
- Bouxin G (2005) Ginkgo, a multivariate analysis package. *J Veg Sci* 16:353–359
- Bradeen JM, Havey MJ (1995) Restriction-fragment-length polymorphisms reveal considerable nuclear divergence within a well-supported maternal clade in *Allium* section *Cepa* (Alliaceae). *Am J Bot* 82(11):1455–1462
- Carraredo M, Mallor C (2007) Variedades autóctonas de cebollas españolas. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Zaragoza
- Casals J, Pascual L, Canizares J, Cebolla-Cornejo J, Casanás F, Nuez F (2011) The risks of success in quality vegetable markets: possible genetic erosion in Marmande tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) and consumer dissatisfaction. *Sci Hortic* 130(1):78–84
- Casals J, Pascual L, Cañizares J, Cebolla-Cornejo J, Casañas F, Nuez F (2012) Genetic basis of long shelf life and variability into Penjar tomato. *Genet Resour Crop Evol* 59(2):219–229
- Castell V, Diez MJ (2000) Colección de semillas de cebolla del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, España
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol Biol Report* 1(4):19–21
- dos Santos MDM, Ragassi CF, Fonseca MED, Buzar AGR, Oliveira VR, de Melo PCT, Boiteux LS (2012) Genetic diversity of tropical-adapted onion germplasm assessed by RAPD markers. *Hortic Bras* 30(1):112–118
- Fischer D, Bachmann K (2000) Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus Rhizirideum. *Theor Appl Genet* 101(1):153–164
- Formisano G, Roig C, Esteras C, Ercolano MR, Nuez F, Monforte AJ, Pico MB (2012) Genetic diversity of Spanish Cucurbita pepo landraces: an unexploited resource for summer squash breeding. *Genet Resour Crop Evol* 59(6):1169–1184
- Havey MJ (1991) Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of the chloroplast genome. *Theor Appl Genet* 81(6):752–757
- Jakse J, Martin W, McCallum J, Havey MJ (2005) Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *J Am Soc Hortic Sci* 130(6):912–917
- Joshi SP, Ranjekar PK, Gupta VS (1999) Molecular markers in plant genome analysis. *Curr Sci* 77(2):230–240
- Khar A, Jakse J, Havey MJ (2008) Segregations for onion bulb colors reveal that red is controlled by at least three loci. *J Am Soc Hortic Sci* 133(1):42–47
- Khar A, Lawande KE, Negi KS (2011) Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp. *Genet Resour Crop Evol* 58(5):741–752
- Masuzaki S, Araki N, Yamauchi N, Yamane N, Wako T, Kojima A, Shigyo M (2006) Chromosomal locations of microsatellites in onion. *HortScience* 41(2):315–318
- McCallum J, Clarke A, Pither-Joyce M, Shaw M, Butler R, Brash D, Scheffer J, Sims I, van Heusden S, Shigyo M, Havey M (2006) Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content. *Theor Appl Genet* 112(5):958–967
- McCallum J, Thomson S, Pither-Joyce M, Kenel F, Clarke A, Havey MJ (2008) Genetic diversity analysis and single-

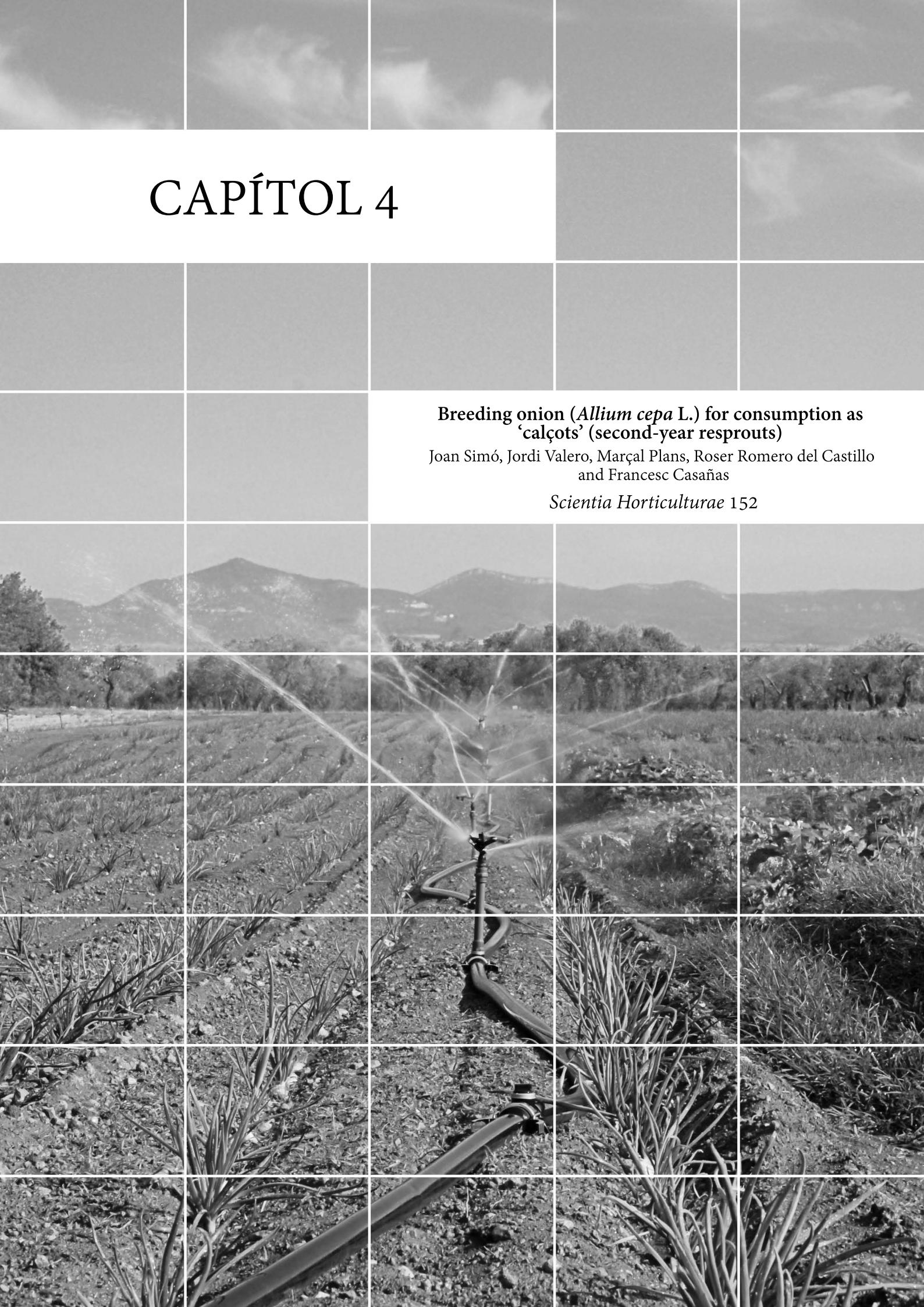
- nucleotide polymorphism marker development in cultivated bulb onion based on expressed sequence tag-simple sequence repeat markers. *J Am Soc Hortic Sci* 133(6): 810–818
- Mendiburu F (2010). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*, R Program
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3):583–590
- Pérez-Vega E, Campa A, De la Rosa L, Giraldez R, Ferreira JJ (2009) Genetic diversity in a core collection established from the main bean Genbank in Spain. *Crop Sci* 49(4): 1377–1386
- Sanchez E, Sifres A, Casanas F, Nuez F (2007) Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Catalonia, a Mesoamerican germplasm hotspot to be preserved. *J Hortic Sci Biotechnol* 82(4):529–534
- Santos CAF, Oliveira VR, Rodrigues MA, Ribeiro HLC (2010) Molecular characterization of onion cultivars using microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45(1):49–55
- Santos CAF, Oliveira VR, Rodrigues MA, Ribeiro HLC, Silva GO (2011) Genetic similarity among onion cultivars of different types and origins, based on AFLP markers. *Hortic Bras* 29(1):32–37
- Sarikamis G, Yanmaz R, Ermis S, Bakir M, Yuksel C (2010) Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. *Genet Mol Res* 9(1):591–600
- Simó J, Romero del Castillo R, Almirall A, Casañas F (2012a) ‘Roquerola’ and ‘Montferri’, first improved onion (*Allium cepa* L.) cultivars for ‘Calçots’ production. *Hortscience* 47(6):801–802
- Simó J, Romero del Castillo R, Casañas F (2012b) Tools for breeding ‘calçots’ (*Allium cepa* L.), an expanding crop. *Afr J Biotechnol* 11(50):11065–11073
- Simó J, Valero J, Plans M, Romero del Castillo R, Casañas F (2013) Breeding onions (*Allium cepa* L.) for consumption as ‘calçots’ (second-year resprouts). *Sci Hortic* 152:74–79
- Soengas P, Cartea ME, Francisco M, Lema M, Velasco P (2011) Genetic structure and diversity of a collection of *Brassica rapa* subsp. *rapa* L. revealed by simple sequence repeat markers. *J Agric Sci* 149:617–624
- Tanikawa T, Takagi M, Ichii M (2002) Cultivar identification and genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J Jpn Soc Hortic Sci* 71(2):249–251
- van Heusden AW, van Ooijen JW, Vrielink-van Ginkel R, Verbeek WHJ, Wietsma WA, Kik C (2000) A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP (TM)) markers. *Theor Appl Genet* 100(1):118–126
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates Inc., Sunderland
- Yao QL, Chen FB, Fang P, Zhou GF, Fan YH, Zhang ZR (2012) Genetic diversity of Chinese vegetable mustard (*Brassica juncea* Coss) landraces based on SSR data. *Biochem Syst Ecol* 45:41–48
- Zhang XA, Zhang YJ, Yan R, Han JG, Fuzeng H, Wang JH, Cao K (2010) Genetic variation of white clover (*Trifolium repens* L.) collections from China detected by morphological traits, RAPD and SSR. *Afr J Biotechnol* 9(21):3032–3041

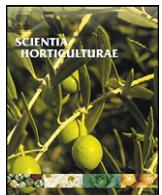
CAPÍTOL 4

Breeding onion (*Allium cepa L.*) for consumption as
'calçots' (second-year resprouts)

Joan Simó, Jordi Valero, Marçal Plans, Roser Romero del Castillo
and Francesc Casañas

Scientia Horticulturae 152





Breeding onions (*Allium cepa* L.) for consumption as 'calçots' (second-year resprouts)

J. Simó*, J. Valero, M. Plans, R. Romero del Castillo, F. Casañas

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia/Fundació Miquel Agustí, UPC, ESAB, Campus del Baix Llobregat, Carrer Esteve Terradas 8, Castelldefels 08860, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2012

Received in revised form 11 January 2013

Accepted 22 January 2013

Keywords:

'Calçots'

Breeding

Number of commercial 'calçots'

Tools for breeding 'calçots'

Selection criteria for breeding 'calçots'

ABSTRACT

Despite the expanding market for 'calçots', the second-year resprouts of the 'Blanca Tardana de Lleida' onion landrace, this product is still obtained from traditional populations. During a program devoted to the obtainment of improved varieties for number of commercial 'calçots' per onion, several experiments were undertaken to evaluate the efficiency of the process and develop breeding tools. The heritabilities estimated for the trait were very low, ranging from 0.14 to 0.24, contrasting with the advances achieved in the selection process (more than 100% in all cases). This is related with the high phenotypic variability of the trait, indicating that the low heritability is due to a very strong environmental component. The results also showed the importance of starting the selection process from large bulbs to allow the maximum productive potential of each genotype to be expressed. Slicing these bulbs transversely and counting the gemmae enables us to know the number of 'calçots' the onion will produce because the coefficient of correlation between gemmae and 'calçots' is 0.80 ($p \leq 0.001$). Unfortunately, the lack of significant correlations between the characteristics of the bulb and the number of commercial 'calçots' per onion makes it necessary to finalize the selection on the second-year 'calçot'-producing plant, but counting gemmae makes it possible to explore a large number of individual bulbs and simplifies the final phase of selection.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

'Calçots' are the floral stems of second-year onion resprouts of the 'Blanca Tardana de Lleida' landrace. These resprouts are harvested in winter when they reach the optimum size for consumption (commercial size: 'calçot' with a compact white edible base measuring 1.7–2.5 cm in diameter, measured at 5 cm from the root, and 15–25 cm long, Fig. 1). The bulb of the 'Blanca Tardana de Lleida' onion is nearly round (6.8 cm in width × 6 cm in height) and its average weight is 145 g (Fig. 2). 'Calçots' are a typical product of Catalonia (northeast Spain), where they are usually grilled or roasted and accompanied with 'romesco', a sauce made from hazelnuts, almonds, dried round sweet peppers ('nyores'), grilled tomatoes, olive oil, vinegar, and mild paprika. This tradition, dating from the 1930s, has recently started to spread to other regions of Spain and other countries, as refrigerated 'calçots' are relatively easy to transport.

Although 'calçots' are not harvested until the second year, the structure that is eaten is similar to the sprouts that appear in *Allium*

fistulosum in the first year, which are highly appreciated in Asian cuisine (Ford-Lloyd and Armstrong, 1993).

All the resprouts from a particular onion are harvested simultaneously when an acceptable number ($\geq 50\%$) of 'calçots' have reached the commercial size. To make growing 'calçots' profitable, it is very important for the percentage of commercial resprouts that can be harvested simultaneously to be high.

The current market volume is about 20 million euros (President of Chamber of Commerce of Valls, personal communication). The singularity of the production has helped confer protected status from the European Union: 'Calçots de Valls' have been awarded Protected Geographic Indication (PGI) (European commission, 2006) and the ultimate goal is to achieve Protected Designation of Origin (PDO).

Surveys of farmers and consumers enabled us to define an ideotype that combines the relevant sensory characteristics with good agronomic performance (around 10 commercial 'calçots' per plant, homogeneity of 'calçot' size within and between plants, and low variability in earliness) (Simó et al., 2012b).

Despite the growing economic importance of this product, farmers continue to use the traditional, unimproved variety of onion. The results are a crop that is very far from the ideotype they themselves helped formulate, with the number of 'calçots' per onion ranging from one to over 25 and the number of commercial 'calçots' ranging between 0 and 15. To multiply the populations, farmers

* Corresponding author at: Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, Campus del Baix Llobregat UPC, Carrer Esteve Terradas 8, Castelldefels 08860, Spain.
Tel.: +34 93 552 10 67.

E-mail address: joan.simó@upc.edu (J. Simó).

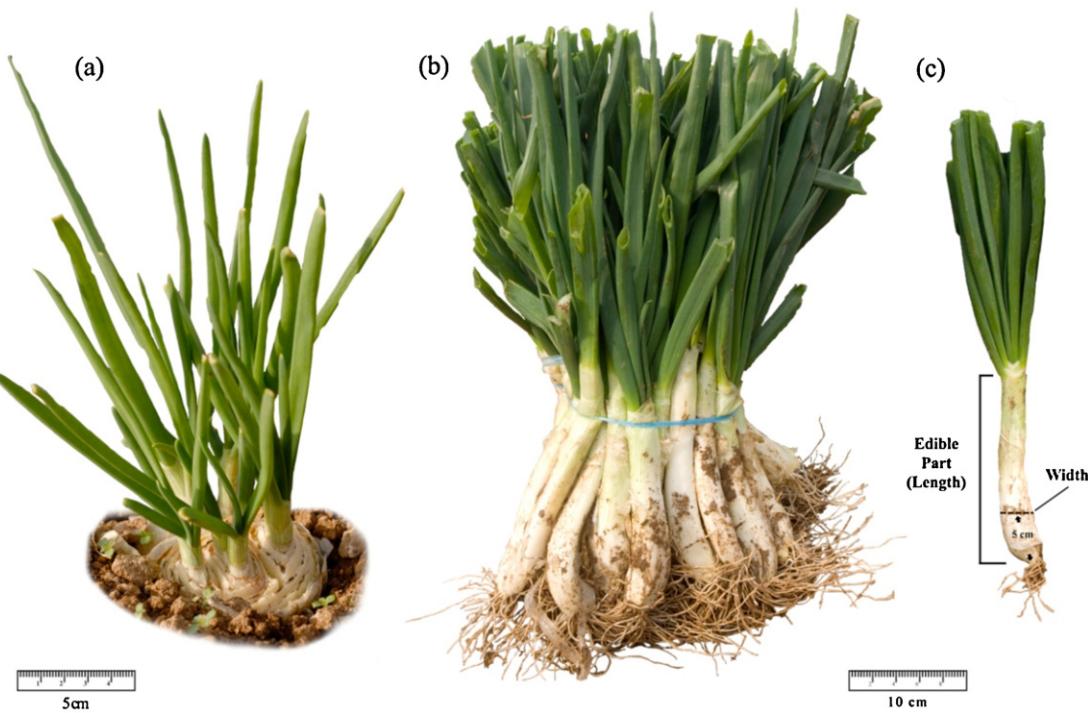


Fig. 1. (a) Onion sliced in half, showing immature 'calçots'; (b) commercial presentation of 'calçots'; (c) dimensions for commercial 'calçots'.

often allow the plants that have not been harvested because they were late or had few commercial 'calçots' to flower. This practice actually moves the population even farther from the ideotype, and current populations tend to yield an average of fewer than three commercial 'calçots' per plant. On the other hand, the selection process is slow because the relations between the traits of the onion and those of the 'calçots' are unknown; moreover, the 'calçots' appear in the second year, making it impossible to begin the selection in the first year, in the onion state.

In summary, 'calçots' are an emerging product in Spanish and international markets, but the germplasm used is inadequate for

the ideotype drawn by producers and consumers. Thus, we aimed to develop specific tools to overcome the problems arising during the selection process leading to the obtainment of two new varieties closer to the ideotype, and to increase the genetic knowledge about the populations.

2. Materials and methods

We carried out two complete cycles of selection to approach the ideotype (Simó et al., 2012a). We estimated the realized heritability of the number of commercial 'calçots' per plant comparing the improved populations obtained in each generation of selection and the initial unimproved population. We performed two additional experiments to develop simple tools that would enable us to increase the efficiency of future breeding programs. All the experiments were performed within the area defined by the PGI 'Calçots de Valls', using the traditional cultivation techniques. Onions developed during the spring and harvested in July were replanted in August in 15 cm deep furrows at a density of 8000 plants per hectare. The resprouts arising in the autumn were covered with earth two or three times (a standard procedure in the traditional cultivation of 'calçots') to increase the length of the edible white part. The plants were harvested individually between December and March when 50% of the 'calçots' reached the commercial size.

2.1. Evaluation of the selection process to increase the yield of commercial 'calçots' per onion

Between the autumn of 2004 and the autumn of 2009, we carried out two cycles of selection. We applied a 0.5% selection pressure on the base population of 10,000 onions proceeding from entries collected from farmers to obtain the first generations of two varieties differing in earliness: an early variety (417 SYN-0) and a late variety (514 SYN-0). These two varieties were reselected using a selection pressure of 0.32% to obtain the second generations (417 SYN-1 or 'Roquerola' and 514 SYN-1 or 'Montferri' (Simó et al., 2012a).



Fig. 2. 'Blanca tardana de Lleida' onions. The smaller squares in the grid measure 1 cm × 1 cm.

To check the advances achieved by October 2009, we carried out an experiment in three locations: La Masó ($41^{\circ}13'47''N$, $01^{\circ}13'12''E$), Valls ($41^{\circ}16'32''N$, $01^{\circ}14'19''E$), and Altafulla ($41^{\circ}08'50''N$, $01^{\circ}22'56''E$). In each location the materials were cultivated in a two random-block design with 100 plants per plot. Plants from the two cycles of selection for both early material (417 SYN-1) and late material (417 SYN-1) were included together with a sample from the base population.

In this final trial, we counted the number of commercial 'calçots' at three points during the growing season: mid-December (T1), late January (T2), and late March (T3). At T3, we also re-counted the total number of 'calçots', which remains constant throughout the growth of the crop.

To compare the various means, we used the linear ANOVA model $x_{ijk} = \mu + g_i + l_j + gl_{ij} + e_{ijk}$, where g_i is the generation effect and l_j is the location effect. Data for the number of 'calçots' per plant were transformed to their square roots to homogenize the variances for this trait, which has discontinuous variability. We used Duncan's multiple range test to compare means; all calculations were done with R statistical system (available free of charge through <http://www.r-project.org>).

We estimated heritability with the expression: $h^2 = R/S$, where R is the response to selection (mean of the offspring – mean of P_0) and S is the intensity of selection (mean of the parents – mean P_0) (Falconer, 1996).

2.2. Relationship between onion traits and yield of 'calçots'

Starting the selection process from the second year of cultivation, when the onion produces 'calçots', greatly prolongs breeding programs and makes it necessary to study many 'calçot'-producing plants. The aim of these experiments, performed at La Masó ($41^{\circ}13'47''N$, $01^{\circ}13'12''E$), was to explore the relations among the onion traits and the traits of the second-year, 'calçot'-producing plant derived from it. If consistent correlations could be established among these traits, it would be possible to start the selection process in the first-year, onion phase, accelerating the process and making it possible to explore a wider range of variability.

2.3. Experiment A

We used a population of 300 unselected seedlings from the base population. The leaves were counted every 15 days during plant growth. In June, after harvesting, we measured the height, weight, and largest and smallest diameters of the onions (they are never perfectly round – see Fig. 2). Before replanting in September, half of the onions, chosen randomly, were sliced crosswise and the inferior section was photographed; the image was processed to make it easier to count the gemmae (Fig. 3). We also measured the Brix degrees of these onions with a refractometer (Shibuya Optical Co. Ltd.).

In September, both the whole onions and the halved onions were planted in the 'calçot' production field, and each plant was labeled. In March, we registered the total number of 'calçots' and the number of commercial 'calçots' for each plant.

We used Pearson's correlation coefficient and regression to study the relations among the traits of the onions and the number of 'calçots' they produced.

2.4. Experiment B

Experiment A was repeated with 1000 onions chosen to represent the entire spectrum of variation in size found in populations of 'Blanca Tardana de Lleida' onions. After weighing each onion, we halved the onions crosswise and counted the number of gemmae as described above for experiment A. In the second year, we



Fig. 3. A photograph of the lower half of an onion cut crosswise processed to facilitate counting the gemmae.

counted the total number of 'calçots' produced by each individually identified onion.

We applied the same statistic procedures used in Experiment A to analyze the results of this experiment.

2.5. Genotypic correlations among 'calçot' traits

The PGI regulations regarding the dimensions of the 'calçots' is strict, and this experiment was designed to determine to what extent selection to increase the number of commercial 'calçots' per plant might affect the individual traits of the 'calçots'. In 300 'calçot' plants from the base population, harvested in March, we measured the following traits in each plant: total number of 'calçots', number of commercial 'calçots', largest and smallest diameters of each 'calçot' (measured at 5 cm from the root), length of the white part of each 'calçot' (Fig. 2), and weight of each 'calçot'.

We applied the same statistic procedures used in the two previous experiments to analyze the results of this experiment.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the selection process for increased yield of 'calçots' per onion

Both selection generation and location were significant ($p \leq 0.001$) in the ANOVA. As the interaction selection generation \times location was not significant, the tables and comment refer to the mean values for the three locations.

The comparison of the mean number of commercial calçots at three time points in the growing season shows that the base population is far from the farmers' ideotype: it yielded only 1.82 commercial 'calçots' per plant at T2 (early harvest: late January) and 3.23 at T3 (late harvest: late March) (Table 1). In the first generation of selection, the early variety practically doubled the number of commercial 'calçots' at the early harvest (3.58 for 417 SYN-0 at T2, Table 1) and the late variety practically doubled the number of commercial 'calçots' at the late harvest (5.15 for 514 SYN-0 at T3, Table 1). The second generation of selection showed further advances, although these were not as great in the early variety as in the late variety (4.10 for 417 SYN-1 at T2, Table 1, and 6.98 for 514 SYN-1 at T3, Table 1). This represents an overall increase in the number of commercial 'calçots' per plant of 125% in the new early variety and 116% in the new late variety with respect to the base population. Nevertheless, the yield in both varieties is far from the proposed ideotype of 10–12 commercial 'calçots' per onion.

Table 1

Mean values of the three locations for the total number of 'calçots' per plant and the number of commercial 'calçots' on mid-December (T1), late January (T2), and late March 15 (T3) in the base population and in the first and second generations in selection for an early variety (417-SYN) and for a late variety (514-SYN).

	Calçots	Commercials T1		Commercials T2		Commercials T3	
	Mean ± SD	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	%
Base population	6.01 ± 3.58 c	0.74 ± 1.07 c	12.0	1.82 ± 1.71 d	30.3	3.23 ± 2.61 d	53.7
417 SYN-0	6.65 ± 3.19 b	2.39 ± 1.85 a	1.9	3.58 ± 2.12 b	53.8	4.42 ± 2.52 c	66.5
417 SYN-1	7.35 ± 3.30 ab	2.52 ± 2.04 a	2.0	4.10 ± 2.74 b	55.8	5.66 ± 3.36 b	77.0
514 SYN-0	7.39 ± 2.40 a	1.37 ± 1.72 b	1.7	2.89 ± 2.07 c	39.1	5.15 ± 2.35 bc	69.7
514 SYN-1	7.81 ± 2.80 a	1.62 ± 1.93 b	1.9	4.83 ± 2.49 a	61.8	6.98 ± 2.81 a	89.4

Means for the same trait followed by the same letter were not significantly different at $p < 0.05$ in Duncan's multiple range test. The % columns indicate the percentage of commercial 'calçots' respect to the total number of 'calçots' for each population and time (Ti).

The ideotype specifies that all the 'calçots' derived from a single onion should attain the commercial size. In the base population, 30% of the 'calçots' were commercial size at the time of early harvesting (T2) and 54% were commercial size at the time of late harvesting (T3) (Table 1). In the first generation resulting from selection, the percentage of commercial 'calçots' increased to 54% in the early variety at T2 and to 70% in the late variety at T3 (Table 1). In the following generation, the percentage of commercial 'calçots' in the early variety at T2 increased slightly (to 56%, Table 1), whereas the percentage of commercial 'calçots' in the late variety at T3 rose to 89% (Table 1). In summary, selection in the late variety is approaching the ideotype, with 7 commercial 'calçots' per plant and 90% of the 'calçots' on each plant reaching the commercial size. In the early variety, we have achieved 4.10 'calçots' per plant and 56% of the 'calçots' on each plant reaching commercial size at T2. These results suggest that the objective of 10–12 commercial 'calçots' per plant is probably unrealistic in the early variety, and it would be better to aim for an ideotype of 5–6 commercial 'calçots' per plant with 80–90% of the 'calçots' on each plant being commercial size.

It is noteworthy that at T1 the mean number of commercial 'calçots' in the populations 417 SYN-0 and 417 SYN-1 is much higher than in the base population (2.39 and 2.52, respectively, vs. 0.74, Table 1). Although there is much room for improvement in the proportion of commercial 'calçots', there is probably enough variability to enable selection for an ultra-early variety with 3–4 commercial 'calçots' per onion and nearly 100% of the 'calçots' reaching commercial size. The availability of such a variety would be very interesting for farmers because 'calçots' fetch a better price at the beginning of the season.

To estimate the additive genetic and environmental effects on the number of commercial 'calçots', we calculated the heritabilities from the selection processes. For the two generations of selection to obtain the variety 417 SYN, the heritabilities were 0.21 and 0.10,

whereas for the two generations of selection to obtain the variety 514 SYN the heritabilities were 0.14 and 0.24. These low values contrast with the advances achieved in the selection process (more than 100%). These results are related with the high phenotypic variability of the trait, indicating that the low heritability is due to a very strong environmental component. The significant values found in our experiment for location effect and the similar results reported by Mallor et al. (2007, 2011) in traits of the onion bulb support this hypothesis.

3.2. Relationship between onion traits and yield of 'calçots'

3.2.1. Experiment A

There were no significant differences in any of the traits studied ($p \leq 0.05$) between the population resulting from whole onion bulbs and the population resulting from onion bulbs halved crosswise, indicating that slicing the onion bulbs in half to count the gemmae did not affect the posterior production of 'calçots' or their traits.

Nearly all the traits measured correlated significantly with the total number of 'calçots' (Table 2); the strongest correlations found were with the number of gemmae and the weight. Likewise, the weight is strongly correlated with the height, diameter, leaves, degrees Brix, number of commercial 'calçots', total number of 'calçots', and number of gemmae (Table 2). On the other hand, we found weak correlations between the number of commercial 'calçots' and the following traits: the number of leaves at stage 3, largest diameter, smallest diameter, weight, degrees Brix, and number of gemmae (Table 2).

3.2.2. Experiment B

After analyzing the results of Experiment A, we decided to do a second experiment with 1000 onions that would represent the entire spectrum of bulb sizes. In this second experiment we

Table 2

Correlations between the traits measured in the onions: number of leaves at four time points (Leaf1–4), smallest diameter of the bulb (DiamS), largest diameter of the bulb (DiamL), mean diameter (DiamM), height of the bulb (Height), weight of the bulb (Weight), degrees Brix (Brix), total number of 'calçots' (Calçots), number of commercial 'calçots' per plant (Commercial) and number of gemmae in the processed photo (Gemmae).

	Leaf2	Leaf3	Leaf4	DiamS	DiamL	DiamM	Height	Weight	Brix	Calçots	Commercial	Gemmae
Leaf1	0.14*	0.12	0.13*	0.10	0.12	0.12	0.10	0.13*	-0.22	0.12	0.09	0.11
Leaf2	1	0.48***	0.42***	0.15*	0.14*	0.16*	0.08	0.15*	0.24	0.14*	0.11	0.09
Leaf3		1	0.60***	0.19**	0.30***	0.27**	0.14*	0.25***	0.25*	0.22***	0.13*	0.15*
Leaf4			1	0.08	0.27***	0.19**	0.13	0.23***	0.26	0.18**	0.12	
DiamS				1	0.68***	0.90**	0.35**	0.79***	-0.24**	0.47***	0.20**	0.28**
DiamL					1	0.93***	0.37***	0.84***	-0.27***	0.59***	0.16*	0.51***
DiamM						1	0.39***	0.89***	-0.28***	0.58***	0.20**	0.44***
Height							1	0.52***	-0.35***	0.30***	0.05	0.20**
Weight								1	-0.31***	0.60***	0.27**	0.38***
Brix									1	-0.33***	0.18*	-0.24***
Calçots										1	0.12	0.62***
Commercial											1	0.19*

* Significant at $p < 0.05$.

** Significant at $p < 0.01$.

*** Significant at $p < 0.001$.

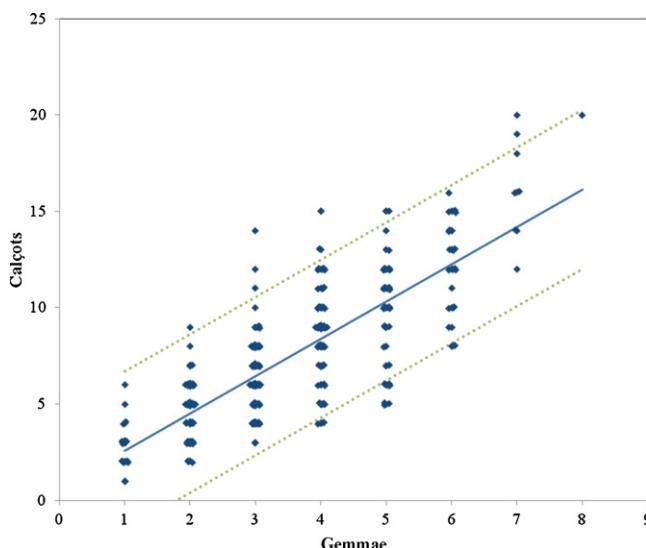


Fig. 4. Regression between the number of gemmae and the total number of 'calçots'. $R=0.80$ ($p<0.0001$), $y=1.94x+0.65$; the size of each spot is proportional to the number of values in the position.

measured only the number of gemmae and the weight of the bulbs; this approach is easier and more accurate than measuring diameters.

With no data transformation, the coefficient of correlation between the number of gemmae in the onion bulb and the total number of 'calçots' was very high ($R=0.80$). The estimated number of 'calçots' for each onion is approximately the double of the number of gemmae detected after halving the bulbs crosswise and photographic processing (Fig. 4); however, we found no significant correlation between the number of gemmae and the number of commercial 'calçots' ($p\leq 0.05$).

On the other hand, the highest correlation between the weight of the bulb and the number of 'calçots' ($R=0.66$) was achieved using the square root of the number of 'calçots' and the logarithm of the weight (Fig. 5).

The type of data transformation we did to improve the fit of the model to a first-degree model suggests that at larger weights the variability in the number of 'calçots' increases (Fig. 5). It seems as if at low bulb weight all the potential for 'calçot' production could not be expressed or simply that small bulbs do not produce many 'calçots' due to genetic factors. As low bulb weight could result from genetic and/or environmental causes, we recommend starting selection with large bulbs (growing the onions in a favorable environment also seems to be a good way to limit environmental effects and allow genetic effects to surface more easily).

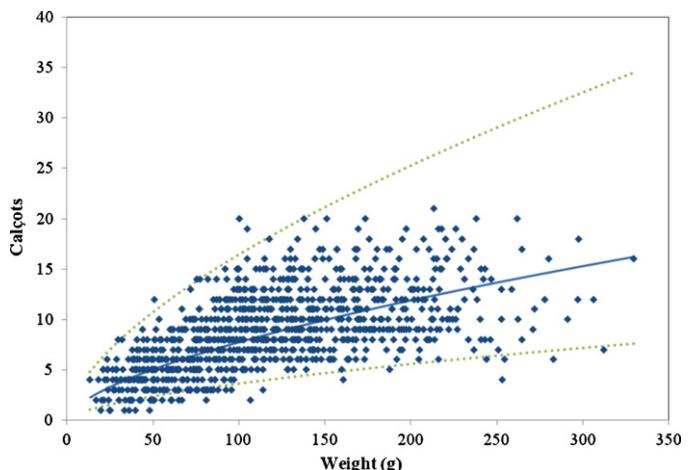


Fig. 5. Regression between the weight of the bulb and the total number of 'calçots'. Untransformed data. $R=0.65$ ($p<0.0001$), $y=1.84x-0.82$.

The effect of bulb size on the number of 'calçots', which seems especially constrictive in small onions, can help explain the low estimated heritabilities in Section 3.1. An onion bulb that is small due to environmental factors cannot express its 'calçot'-producing potential. The onion producing stage thus becomes a key element in cultivation and in breeding programs.

3.3. Genotypic correlations in the 'calçot' plant

Bearing in mind the results in the previous section, we can reduce the environmental effect in the selection process by cultivating the onions in conditions that allow them to express all their potential for growth; this makes it possible to begin the selection process in the onion stage, by predicting the number of 'calçots' that the onion will produce by counting the number of gemmae. Thus, a much larger number of onions can be evaluated and field trials can be limited to the most promising individuals. None of the attempts to correlate traits of the onions with the number of commercial 'calçots' was successful; therefore, we undertook a study of the correlations among diverse aspects of the 'calçots' to see if we could eliminate certain plants from the start of sprouting or if there were aspects that were pleiotropically controlled that would prevent or hinder us from reaching the farmers' ideotype.

We found negative correlations between the final number of 'calçots' and all traits except the length of the calçot (Table 3). However, the number of significant correlations with the number of commercial 'calçots' is much lower; in this case, the length of the 'calçot' is the only trait that correlates strongly (Table 3). The

Table 3
Genotypic correlations between the traits measured in the 'calçots': smallest diameter (DiamS), largest diameter (DiamL), mean diameter (DiamM), length of the white part (Length), weight (Weight), total number of 'calçots' ('Calçots') and the number of commercial 'calçots' (Commercial).

DiamS	DiamL	DiamM	Length	Weight	'Calçots' ^a	Commercial ^a
1	0.97***	0.99***	0.27**	0.88***	-0.72***	0.19*
DiamL	1	0.99***	0.22*	0.90***	-0.76***	0.16
DiamM		1	0.25**	0.90***	-0.74***	0.18*
Length			1	0.47***	-0.16	0.34***
Weight				1	-0.65***	0.24**
'Calçots' ^a					1	0.20*
Commercial ^a						1

* Significant at $p<0.05$.

** Significant at $p<0.01$.

*** Significant at $p<0.001$.

^a For correlations with the total number of 'calçots' and total number of commercial 'calçots', we assigned each individual 'calçot' the number of total and commercial 'calçots' in the 'calçot' plant.

correlation between the total number of 'calçots' and the number of commercial 'calçots' was very low; this indicates that selection only for a large number of 'calçots' would make no sense. Although the estimations and selections for the number of 'calçots' done in the early stages of selection (from measuring the bulb and counting the gemmae) serve to establish a minimum number of 'calçots' that plants should have, it is the number of commercial 'calçots' rather than the total number of 'calçots' that really matters.

In fact, the farmers' ideotype of 'calçot' plants with 10 commercial 'calçots' and no non-commercial 'calçots' is an implicit recognition from the farmers' experience that it is impossible to achieve many 'calçots' that are all commercial size. Given that the commercial 'calçots' must be thick and that the white part must be considerably long to be acceptable to consumers, the high negative correlations found between the total number of 'calçots' and the diameters, length of the white part, and the weight of the 'calçots' (Table 3) tells us that selection for a large number of 'calçots' is contrary to our interests.

If we consider all the correlations together (Table 3), there do not seem to be other incompatibilities. On the contrary, the different measures of the size of the 'calçots' tend to be strongly correlated, so 'calçots' with a long white part are also thicker and weigh more (Table 3); in other words, they are more likely to be commercial 'calçots'.

4. Conclusions

We have made substantial gains toward obtaining new varieties that approach the farmers' ideotype, but whereas in the late varieties it seems reasonable to aim for 10–12 commercial 'calçots' per plant, in the early varieties it is probably more realistic to aim for 6–8 commercial 'calçots' per plant. The variability in earliness within the populations opens the possibility of obtaining ultra-early varieties with 4 commercial 'calçots' that could be sold for a higher price.

The estimated heritabilities for the number of commercial 'calçots' per plant are low, but the response to selection achieved suggests that the low heritabilities are due to a high environmental effect on this trait rather than to a lack of additive genetic variance. The importance of the minimum size of the onion in the expression of the potential number of 'calçots' suggests that many environmental factors might lower heritability. So, providing good environment conditions for the onion crop to ensure the expression of their full potential for size will most likely result in increased

heritability and greater progress in breeding for number of commercial 'calçots'.

The complementary studies enable us to recommend the following selection protocol: (1) cultivate the onions in optimum, uniform conditions because the number of 'calçots' depends strongly on the size of the onion. (2) Select large onions, halve them crosswise, photograph them, and use image processing to estimate the number of 'calçots' they will produce. (3) Set an interval for the estimated number of 'calçots' (e.g., between 12 and 18 for late varieties) and take these onions to the selection fields. (4) Select for the number of commercial 'calçots', and if the goal is to obtain materials with different earliness, take into account the time when they reach commercial size.

Given that neither the number of gemmae nor the weight of the onion bulb correlate well with the number of commercial 'calçots', the two tools we have developed help us to screen a large number of onions but also obligate us to finalize the selection in the second year of cultivation, when the 'calçots' are produced. All these procedures are already being used in new breeding programs.

Acknowledgments

We thank the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural of the Government of Catalonia and the Regulating Board of the PGI 'Calçot de Valls'. Special thanks to the farmers Sebastià Banús and the Blanch brothers and to the FMA's taste panel.

References

- European commission, 2006. Regulation (CE) 510/2006, on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. European commission, Brussels.
- Falconer, D.S., 1996. Introduction to Quantitative Genetics, 4th ed. Longman, Essex.
- Ford-Lloyd, B.V., Armstrong, S.J., 1993. Welsh onion *Allium fistulosum* L. In: Fallo, G., Bergh, B.O. (Eds.), Genetic Improvement of Vegetable Crops. London, Pergamon Press, pp. 51–58.
- Mallor, C., Balcells, M., Mallor, F., Sales, E., 2011. Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. Plant Breed. 130, 55–59.
- Mallor, C., Llamazares, A., Gutierrez, M., Bruna, P., Mallor, F., Arnedo-Andres, M.S., Alvarez, J.M., 2007. Evaluation of morphology, pungency and soluble solid content of the onion 'Fuentes de Ebro'. ITEA-Inf. Tec. Econ. Agrar 103, 212–223.
- Simó, J., Romero del Castillo, R., Almirall, A., Casañas, F., 2012a. 'Roquerola' and 'Montferri' first improved onion (*Allium cepa* L.) cultivars for 'Calçots' production. Hortscience 47, 801–802.
- Simó, J., Romero del Castillo, R., Casañas, F., 2012b. Tools for breeding 'calçots' (*Allium cepa* L.), an expanding crop. Afr. J. Biotechnol. 11, 11065–11073.

CAPÍTOL 5

'Roquerola' and 'Montferri', First Improved Onion (*Allium cepa L.*) Cultivars for 'Calçots Production'
Joan Simó, Roser Romero del Castillo, Antoni Almirall and Francesc Casañas
HortScience 47(6)

HORTSCIENCE 47(6):801–802. 2012.

‘Roquerola’ and ‘Montferri’, First Improved Onion (*Allium cepa* L.) Cultivars for “Calçots” Production

Joan Simó¹, Roser Romero del Castillo, Antoni Almirall,
and Francesc Casañas

Departament d’Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Universitat Politècnica de Catalunya, Campus del Baix Llobregat, Carrer Josep Terrades 8, 08860 Castelldefels, Spain

Additional index words. onion landrace, breeding, onion resprouts, “calçots,” sensory value, ‘Blanca Tardana de Lleida’ onion

“Calçots” are the floral stem of second-year onion resprouts of the ‘Blanca Tardana de Lleida’ onion landrace. These resprouts are harvested during winter (December to April) when they reach the commercial size for consumption, i.e., when the edible white part is ≈200 mm long and 25 mm in diameter. Each onion yields between one and 20 “calçots,” and their thickness is negatively correlated with the number of “calçots” per onion, i.e., plants with a high number of resprouts yield few, if any, commercial “calçots.” In the field management, all the resprouts from an onion are harvested at the same time, when 50% or more reach the commercial size indicated as specified in the regulations for the ‘Calçot de Valls’ Protected Geographical Indication (<http://www.gencat.cat>). This particular use of the onion is typical of Catalonia (northeast Spain), where “calçots” are usually grilled or roasted. The tradition dates from the 1930s and has recently started to spread to other regions in Spain and other countries; the current market volume is ≈20 million Euros and is quickly rising. Traditionally producers have used local populations of the landrace and no breeding programs had been undertaken (Muñoz et al., 2003), resulting in large differences in the yield of commercial “calçots” per plant and low total yields.

Compared with previously existing populations, the two new cultivars obtained, ‘Roquerola’, an early cultivar, and ‘Montferri’, a late cultivar, significantly increase the mean number of commercial “calçots” obtained from each plant while maintaining the sensory characteristics. The combined use of these two cultivars makes it possible to begin the growing season earlier and maintain production throughout the winter, when the demand is highest.

Received for publication 6 Mar. 2012. Accepted for publication 6 Apr. 2012.

This study was funded by the ‘Departament d’Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural’ of the ‘Generalitat de Catalunya.’

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail joan.simo@upc.edu.

and the earliness of 50 offspring of each mother plant selected in the first year (2500 early plants and 2500 late plants). On the basis of the mean values for the offspring and the individual values within each family, we chose eight plants from the field with the early material and eight plants from the field with the late material from which to create the two new varieties. Like in the first year, 10 “calçots” were separated from the selected plants and planted in the same month (Mar. 2007) in two isolated multiplication fields. The seeds obtained through open pollination were bulked to constitute the base of the new cultivars (June 2007). After multiplication by open pollination again, these materials were cultivated in three locations, La Masó (lat. 41°13'47" N, long. 01°13'12" E), Valls (lat. 41°16'32" N, long. 01°14'19" E), and Altafulla (lat. 41°08'50" N, long. 01°22'56" E), from Oct. 2009 to Mar. 2010 to confirm stability and homogeneity.

Description

The “calçot” plants of the ‘Roquerola’ variety (Fig. 1A) are early, producing four to six commercial-sized “calçots” in January and from five to seven if allowed to grow until March. The edible part of the “calçots” is of intermediate length (145 mm to 175 mm) and width (19 mm to 22.5 mm). The leaves are dark green, intermediately erect, and resistant to cracking; the position of the exterior leaves is high (mean, 574 mm). The edible part is white. This cultivar is a long-day, non-storage type and its flat globe-shaped bulb weighs 149 to 172 g with white skin and flesh. This onion has low storage capacity. The flower is white and the mean 100-seed weight is 0.251 g. The incidence of the onion yellow dwarf virus is very low both during the growth of the onions and during the growth of the “calçots.”

The “calçot” plants of the ‘Montferri’ variety (Fig. 1B) are late, producing only two



Fig. 1. Aspect of a simple plant of ‘Roquerola’ variety with 11 commercial “calçots” (A) and 13 commercial “calçots” coming from a simple plant of ‘Montferri’ variety, ready for packaging (B).

to four commercial-sized “calçots” in January and from six to nine if allowed to grow until March. The edible part of the “calçots” is of intermediate length (175 mm to 215 mm) and width (20.5 mm to 25 mm). The leaves are dark green, intermediately erect, and resistant to cracking; the position of the exterior leaves is high (mean, 626 mm). This cultivar is a long-day, non-storage type and its flat globe-shaped bulb weighs 168 to 203 g with white skin and flesh. The flower is white and the mean 100-seed weight is 0.258 g. The incidence of the onion yellow dwarf virus is very low both during the growth of the onions and during the growth of the “calçots.”

In the 2009–2010 and 2010–2011 growing seasons, we cultivated the two new varieties, the base population, and two well-known Spanish landraces of onion, ‘Babosa’ and ‘Nerja’, from the Genebank of the Institute of Conservation and Improvement of the Agrodiversity of the Polytechnic University

of Valencia were cultivated at La Masó (lat. 41°13'47" N, long. 01°13'12" E) at a farm representative of the ‘Calçot de Valls’ Geographic Protected Designation.

Onions from the two new cultivars were slightly larger than those of the base population with a size intermediate between the checks ‘Babosa’ and ‘Nerja’ (Table 1). The plants derived from the onions of the two new cultivars produced a significantly higher number of “calçots” and of commercial-sized “calçots” (Table 1). Compared with the base population, in January, the early cultivar, Roquerola, had 320% more commercial-sized “calçots” and the late cultivar, Montferri, had 165% more. In February, the early cultivar had 76% more “calçots” than the base population and the late cultivar had 116% (Table 1). The control ‘Nerja’ did not differ significantly from the base population and the control ‘Babosa’ produced fewer “calçots” (Table 1).

Table 1. Morphological and agronomic traits of onions and the derived “calçot” plants for the ‘Blanca Tardana de Lleida’ landrace (the mixed population used as the starting point for breeding), new cultivars Roquerola and Montferri, and ‘Babosa’ and ‘Nerja’ used as checks.

	Onion			Plant (calçots)		
	Width (mm)	Length (mm)	Wt (g)	January ^x	March ^w	Total ^y
Landrace	67.5 bc ^z	60.1 b	143.9 b	1.1 b	3.7 c	8.7 b
Roquerola	72.8 ab	61.6 ab	165.8 b	4.6 a	6.4 b	12.1 a
Montferri	76.6 a	66.3 a	184.6 ab	2.9 ab	7.9 a	12.9 a
Nerja	60.4 c	44.1 c	83.1 c	1.0 b	3.0 c	7.5 b
Babosa	81.0 a	66.5 a	222.5 a	0.6 b	1.4 d	4.5 c

^xA completely randomized block design was used with three blocks and 50 plants per plot. Means for the same trait followed by the same letter were not significant at $P \leq 0.05$ in Duncan's multiple range test.

^yNumber of “calçots.”

^zNumber of commercial-sized “calçots” in January.

^wNumber of commercial-sized “calçots” in March.

Table 2. Morphological and sensory traits of “calçots” from the ‘Blanca Tardana de Lleida’ landrace (the mixed population used as the starting point for breeding), new cultivars Roquerola and Montferri, and ‘Babosa’ and ‘Nerja’ checks.^z

	Morphologic traits			Sensory traits		
	Width (mm)	Length (mm)	Wt (g)	Sweetness	Fiber	Off-flavors
Landrace	23.6 a	15.6 c	75.6 a	6.2 ab	2.4 bc	2.8 a
Roquerola	21.1 b	15.9 c	69.5 a	7.1 a	2.5 b	2.5 a
Montferri	23.1 ab	19.0 a	74.2 a	6.2 ab	2.5 b	2.4 a
Nerja	15.6 c	17.9 b	72.0 a	5.2 c	2.2 c	2.8 a
Babosa	16.3 c	14.4 d	75.4 a	5.7bc	3.5 a	3.7 b

^zThe analysis of variance included the fixed factors panelist and accession, the random factor session, and the interaction panelist*accession. Means for the same trait followed by the same letter were not significant at $P \leq 0.05$ in Duncan's multiple range test. Sensory evaluations were done by a trained panel (eight judges) in a room specifically designed for this purpose (ISO 8589, 2007). Accessions were scored on a semistructured scale from 0 (low) to 10 (high) for all traits (Romero del Castillo et al., 2008). The experimental design had four sessions and four accessions per session, and each accession was tested in triplicate.

The morphological traits of the “calçots” of the two new cultivars were very similar to those of the landrace, although the edible portion of the “calçots” in the late cultivar was significantly longer than in the base population and in the early cultivar (Table 2). The length of the edible portion of the “calçot” in the control ‘Nerja’ was similar to that of the late cultivar, Montferri, although the diameter of the “calçots” from the control was significantly smaller than in “calçots” from the base population and those from the two improved cultivars (Table 2). The control ‘Babosa’ had lower values for all the morphological traits (Table 2).

The sensory analysis found no significant changes in the three key traits studied between “calçots” from the base population and those from the two new cultivars (Table 2). In contrast, none of the checks had the same sensory quality as the three Blanca Tardana de Lleida materials studied if we consider all three traits in the idiosyncrasy (Table 2). As expected for the selected trait (number of commercial “calçots”), the variation coefficient decreased from the landrace to Roquerola and Montferry (from 1.8 to 0.88 and 0.80 in the first harvest and from 0.78 to 0.63 and 0.66 in the second harvest, respectively). This is very favorable for the management and commercialization of the product.

Because the significant increase in the yield of “calçots” was achieved without lowering sensory quality, farmers are already trying out the two new cultivars while the cultivars are being registered. Small samples of ‘Roquerola’ and ‘Montferri’ seeds are available for research purposes (contact the author).

Literature Cited

- ISO 8589. 2007. Sensory analysis—General guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Muñoz, P., O. Santos, A. Ballvér, and C. Matas. 2003. Resultados del proyecto de experimentación de seis cultivares de cebolla blanca tardía de Lleida utilizadas para el cultivo de calçot. XXXIII seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura. Badajoz. p. 61–69.
- Romero del Castillo, R., J. Valero, F. Casañas, and E. Costell. 2008. Training, validation and maintenance of a panel to evaluate the texture of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sens. Stud.* 23:303–319.



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

L'any 2006, el grup en el qual em vaig incorporar per realitzar aquest treball de tesi doctoral va rebre una sol·licitud per part del Consell Regulador de la Indicació Geogràfica Protegida “El calçot de Valls” per tal de revertir un procés que s'estava produint en els darrers anys. La principal varietat utilitzada pels productors presentava, sense motiu apparent, una progressiva disminució del nombre de calçots per mota, fet que significava un descens molt important en la producció. Aleshores es va proposar iniciar un programa de millora genètica enfocat principalment a augmentar el nombre de calçots per mota. En aquell moment, però, els estudis genètics i la informació sobre els calçots era pràcticament inexistent, no es coneixia el tipus d'herència que presentava el caràcter nombre de calçots per mota, es desconeixia el grau de variabilitat genètica de les poblacions cultivades i tampoc es disposava de les eines per tal de realitzar un programa de millora. Partint d'aquesta situació, el treball d'aquesta tesi doctoral s'ha dirigit cap al desenvolupament de les eines necessàries per tal de dur a terme un programa de millora i s'han aplicat a la obtenció de dues noves varietats que corregeixen la situació detectada pel Consell Regulador.

2.1 ELABORACIÓ D'IDIOTIPS

Els agricultors, amb la seva experiència en el cultiu del calçot, van consensuar un idiotip agromorfològic que constava de motes amb entre 8 i 12 calçots comercials (perquè un calçot es consideri comercial, ha de presentar, segons el reglament de la IGP, una longitud superior als 20 cm de la part blanca, i un diàmetre a 5 cm de l'arrel d'entre 1,7 i 2,5 cm (DAAR, 2009)), i que assolissin la característica de comercials simultàniament. A la vegada demanaven minimitzar el rebuig, és a dir, la formació de calçots no comercials en la mota. Malgrat que no descartem que aquest objectiu de 8-12 calçots per mota, tots comercials i de collita simultània, sigui superable en el futur, vàrem assumir temporalment com a òptim aquest tipus de planta i vàrem preferir ampliar l'idiotip amb característiques que ens semblaven molt importants per als consumidors.

Així es va plantejar detectar, amb l'ajuda d'un panel de consumidors habituals, quins eren els atributs que més pes tenen en l'acceptació o rebuig sensorial dels calçots. Al final de l'estudi es va determinar que la dolçor és un atribut positiu, mentre que la percepció de la fibra i la presència de gustos estranys són els principals caràcters negatius.

La variabilitat detectada dins de les poblacions implicades en els processos de selecció ens va obligar a reformular l'idiotip agromorfològic plantejat pels agricultors, doncs vàrem trobar una gran variabilitat en la precocitat de les plantes que a la vegada influïa fortament en el nombre de calçots comercials finals. Com que les motes molt primerenques permeten fer arribar calçots als consumidors quan hi ha poca oferta (i per tant el preu de venda és superior), es va proposar un idiotip per a aquestes varietats on prima la ràpida emergència en detriment d'un nombre elevat de calçots comercials (3-4 és el nombre final de calçots comercials desitjats, que es desenvolupin d'una manera homogènia entre novembre i desembre). L'idiotip per varietats tardanes ha quedat constituït per motes amb 10-12 calçots comercials, encara que el seu creixement sigui més lent (collita de gener a març).

2.2 SELECCIÓ EL PRIMER ANY

(RELACIÓ MORFOLOGIA DE LA CEBA-NOMBRE DE CALÇOTS)

L'acumulació durant el primer any del cicle de substàncies de reserva en alguns òrgans de plantes amb cicles biennals ha portat a que algunes d'elles s'hagin aprofitat com a plantes d'interès hortícola. Alguns exemples poden ser la pastanaga (*Daucus carota* L.), el rave (*Raphanus sativus* L.), la xirivia (*Pastinaca sativa* L.) o la ceba. No obstant, és molt poc freqüent que l'aprofitament de les plantes d'aquesta mena sigui durant el segon any del cicle, més enllà de recol·lectar-ne les llavors. El fet de que l'aprofitament com a calçot es produueixi durant el segon any del cicle complica el procés de millora. Per aquest motiu ens vàrem proposar detectar correlacions entre un nombre important de paràmetres mesurats en el primer any de cultiu amb aspectes comercialment importants en l'estadi de calçot. D'entre els paràmetres analitzats, el pes de la ceba i el nombre d'ulls (gemmes) observats al tallar una ceba per la meitat, han resultat correlacionar d'una manera significativa i elevada amb el nombre de calçots. En el cas dels ulls, s'ha trobat una correlació directa entre el nombre d'ulls que presenta una ceba i el nombre de calçots que desenvoluparà, ja que el nombre de calçots s'apropa al doble de les gemmes comptades ($R=0.80$, $p<0.001$; $y = 1.94x + 0.65$, nº calçots (y) i ulls (x)). Donat que els ulls observats en la fase de ceba no són més que les gemmes immadures que posteriorment donaran lloc als calçots, sembla lògic que aquesta correlació sigui tant alta (malgrat que cada gemma sembla que origina de mitjana dos calçots). Proves realitzades amb cebes tallades i cebes no tallades van revelar que no existia cap diferència en caràcters productius i de qualitat dels calçots entre els dos tractaments. Aquesta correlació elevada i el fet de que el desenvolupament de les motes no es vegi afectat pel fet de tallar les cebes, permet, durant la selecció per un elevat nombre de calçots per mota, descartar un nombre molt gran de cebes abans de ser plantades. S'ha de fer notar que la presència de gemmes no assegura que aquestes esdevinguin calçots el suficientment grans i llargs per tal d'esdevenir comercials, ja que la correlació entre el nombre d'ulls i el nombre de calçots comercials baixa fins a $R=0.19$ ($p<0.05$). Comptar gemmes serveix, doncs, únicament per eliminar els extrems de les poblacions.

Pel que fa al pes de la ceba els resultats suggerixen una bona correlació entre l'arrel quadrada del nombre de calçots i el logaritme del pes, de manera que quan augmenta el pes de la ceba, l'increment del nombre de calçots cada vegada és més petit ($R=0.65$, $p<0.0001$; $y = 1.84x - 0.82$, $\sqrt{nº}$ calçots (y) i $\log(\text{pes})$ (x)). Una possible explicació a aquest fet és que quan la ceba és petita (per motius genètics i/o ambientals) l'expressió del nombre de calçots queda limitada. Un cop assolit un valor llindar (situat al voltant dels 100 g) la mida de la ceba deixa de ser limitant i el nombre de calçots ve determinat pel genotip de la planta i per l'ambient en què s'està desenvolupant el segon any del cicle. En aquest cas, com en el cas del nombre de gemmes, la predicción del nombre de calçots totals és millor que la del nombre de calçots comercials, malgrat la diferència entre les dues és molt menor que en el cas del nombre de gemmes. Aquesta correlació entre el pes i el nombre de calçots (totals i comercials) té una vessant clarament pràctica per l'agricultor, ja que el fet de plantar cebes molt petites (per exemple perquè el primer any del cicle s'ha desenvolupat en males condicions ambientals) determina un nombre baix de calçots independent de la varietat usada (encara que genèticament tingui un gran potencial de producció de calçots). A l'altra extrem, malgrat la creença dels agricultors, plantar cebes molt grans no garanteix un nombre elevat de calçots (pot ser que genèticament la ceba no tingui potencial per fer-ne).

2.3 MODELITZACIÓ DEL CREIXEMENT

Modelitzar l'evolució del cultiu dels calçots per poder comparar poblacions o determinar el moment òptim de la collita coneixent la demanda, seria una eina important per la gestió econòmica d'aquest cultiu. Les dades de l'evolució del nombre de calçots comercials de cada mota al llarg del període de cultiu, preses durant els diferents experiments realitzats en diverses poblacions, suggerien un patró sigmoïdal típic del creixement bacterià, amb: 1) una fase de latència on els calçots van creixent però cap asoleix la mida comercial, 2) una fase de creixement ràpid, i 3) una fase final on el nombre de calçots tendeix asimptòticament al valor màxim, on tots els calçots de la mota que podien fer-ho ja han assolit la mida comercial.

Diversos autors han descrit el creixement de vegetals mitjançant models sigmoïdals. Tei i col-laboradors (1996) van predir el creixement de la ceba, l'enciam i la remolatxa vermella, a partir de variables com el temps, l'integral tèrmica, i els graus efectius per dia, mitjançant diferents models com el Logístic, Gompertz o l'exponential. Amb cap dels tres models es va obtenir un ajust millor que en la resta, ja que depenen de les variables utilitzades s'obtenien millors o pitjors ajustos segons el model. Un cas similar ocorre en la predicción de la massa vegetativa en pastures, on no es troben grans diferències en els diferents models sigmoïdals usats (Gompertz, Weibull i model logístic asimètric), ja que en tots obtenen r^2 pròximes a 0.99 (Barker *et al.*, 2010). En el cas del blat de moro, Simoes i col-laboradors (2005), preduïen la biomassa total i la producció usant un model Gompertz amb unes r^2 de 0.90 i 0.97, respectivament.

En el cas dels calçots, s'ha pogut ajustar un model basat en la funció de Gompertz per predir el nombre de calçots produïts per cada mota en un temps determinat. Mitjançant diferents proves d'idoneïtat de les funcions, s'ha determinat que, amb el model basat en una distribució multinomial dels paràmetres d'ajust de l'equació de Gompertz (λ , període de latència; μ_m , taxa màxima de creixement i N_m , nombre màxim assolit a infinit temps) s'obté la simulació més pròxima a les dades empíriques. L'avantatge de treballar amb models com el de Gompertz és que els paràmetres poden tenir una interpretació biològica. Així doncs, la λ o període de latència, ens permet saber en quin moment els calçots comencen a ser comercials i, per tant, permet identificar les varietats més primerenques. L'altre paràmetre interessant és el N_m o nombre màxim de calçots comercials, ja que permet predir en quin moment la mota assolirà el nombre màxim de calçots i, per tant, quin és el seu moment òptim de collita. Per altra banda, la modelització de creixement per les poblacions ha de permetre un millor estudi de la variabilitat poblacional, ja que fins ara aquests estudis es duien a terme a partir de cada un dels comptatges realitzats durant el cultiu per separat. Amb la modelització, aquests estudis es poden dur a terme amb tres paràmetres que engloben el conjunt del creixement.

No obstant, el model presentat és una primera aproximació a la creació d'un model on s'inclouin, més enllà del temps, altres variables que podrien jugar un paper rellevant en el creixement del calçot. Un altre tipus de variable que resultaria interessant d'incloure seria el preu del calçot, ja que aquest varia substancialment al llarg de la temporada de cultiu i, sovint, amb patrons molt semblants entre anys. D'aquesta manera, el model permetria una optimització molt més bona del rendiment econòmic del cultiu.

2.4 LA MILLORA AMBIENTAL

La millora ambiental no és l'objectiu d'aquesta tesi, que realitza una primera aproximació a les característiques genètiques de les poblacions de calçots i a la seva millora genètica. Tot i així, com a resultat d'un dels assajos volem remarcar la importància que tenen algunes relacions fenotípiques entre les característiques del bulb de sembra i el nombre de calçots produïts el segon any (Apartat 2.2). En efecte, val clarament la pena per als agricultors invertir en aconseguir cebes grans, doncs per més bona productora de calçots que sigui una varietat si la ceba es queda petita el nombre de calçots que produirà la mota de segon any serà reduït. És per tant del tot recomanable esmerçar-se en un bon maneig del cultiu de les cebes, incloent les densitats adequades de plantació, una bona gestió de la fertilitat, un bon maneig de les males herbes i un reg adequat per no comprometre la producció de calçots de l'any següent.

2.5 LA MILLORA GENÈTICA

2.5.1 L'herència dels caràcters

Durant el programa de millora realitzat, s'han estimat les heretabilitats dels caràcters nombre de calçots per mota i nombre de calçots comercials per mota. En tots dos casos s'han obtingut valors molt baixos, entre 0.09 i 0.24. Aquests valors són similars als obtinguts en ceba pel caràcter percentatge de bulbs amb un únic centre que van des de 0.17 fins els 0.37 depenent de la població estudiada (Cramer, 2006; Wall *et al.*, 1996). Vista la correlació trobada entre el nombre d'ulls i el nombre de calçots finals, sembla que el caràcter de la presència d'un únic centre seria un dels extrems del sistema genètic que controla el nombre d'ulls (futurs calçots).

2.5.2 Variabilitat genètica

L'antiguitat del cultiu de la ceba, així com la gran facilitat d'adaptació que presenta aquesta hortalissa a múltiples ambients, segurament han generat una gran quantitat de varietats amb un rang molt ampli de mides, formes, colors, gustos i qualitats. Més a més de la selecció determinada per l'entorn edafològic i climàtic, cada regió/cultura ha seleccionat les cebes que cultiva atenent als gustos propis. L'actual facilitat de transportar els productes a qualsevol part del món i la globalització cultural han reduït la importància de les produccions locals en favor de la producció de varietats amb una acceptació més global. No obstant, cada regió sembla seguir tenint un fort arrelament a determinades cebes històriques de la zona, tal com passa amb altres espècies com ara el tomàquet o la mongeta seca (Casals, 2011; Sánchez, 2007). Així, al nord-oest d'Europa la majoria de cebes que es consumeixen presenten la pell entre marró i groc, tenen una mida mitjana i una forma arrodonida. Al Regne Unit en canvi prefereixen les cebes més fosques. A Mèxic, les cebes preferides són les blanques, mentre que als Estats Units, les cebes grans, amb un gust suau i grogues són les més populars. Un cas similar a l'anterior és el del Japó, amb una preferència cap a les cebes grans, blanques i grogues (Bosch Serra i Currah, 2002). Les cebes anomenades espanyoles, es caracteritzen per ser rodones, grogues i suaus. Aquesta atribució històrica podria fer pensar que aquest tipus de cebes són les preferides pels espanyols. A Catalunya, les varietats més conegudes es caracteritzen per ser morades, de mida mitjana i més aviat dolces, com és el cas de la ceba de Figueres, la ceba morada d'Amposta o la ceba de

Vic. Una altra de les varietats més apreciades a Catalunya és la ceba de Coll de Nargó, en aquest cas també es morada i dolça, però es caracteritza per les seves grans dimensions.

Malgrat les possibles preferències generals esmentades més amunt, a Espanya existeix un nombre molt gran de varietats tradicionals que presenten una morfologia molt variable. L'estudi realitzat amb 20 entrades corresponents a varietats espanyoles que conserven prestigi entre els consumidors locals, va mostrar una variabilitat molt gran per tots els caràcters estudiats (Taula 2). Pel que fa als caràcters del bulb, va destacar una gran variabilitat en el pes, que va anar des dels 352 g de la Cebolla de Fuentes, fins als 44 g de la Ceba de Lanzarote, amb un coeficient de variació de 40.22%. La forma del bulb (calculada a partir del quocient entre l'alçada i el diàmetre) també va presentar un ampli rang, ja que es van trobar cebes amb forma clarament allargada (1.90) fins a cebes amb forma eixatada (0.56) (Taula 2). L'estudi més enllà d'estudiar la variabilitat genètica de les cebes espanyoles per tal de determinar el seu potencial en el programa de millora del calçot, també tenia l'objectiu de situar la varietat Ceba Blanca Tardana de Lleida (CBTL), la varietat usada en el cultiu dels calçots, en el context de les restants poblacions espanyoles. La mitjana dels diferents caràcters estudiats, del conjunt de poblacions estudiades de CBTL, es va situar una mica per sota de la mitjana dels caràcters estudiats en les cebes espanyoles. No obstant, sense assolir la gran variabilitat observada en el cas de les cebes espanyoles, les 4 poblacions diferents de CBTL usades van mostrar una variabilitat important per la majoria de caràcters (Taula 2): la mitjana del coeficient de variació dels diferents caràcters per les varietats espanyoles va ser de 24.16%, en canvi la de les diferents poblacions de CBTL va ser de 8.36%. Els valors, tant mitjans com de variabilitat, de forma i pes, obtinguts en les diferents entrades espanyoles, són molt semblants als valors trobats per Mallor i col·laboradors en un estudi dels recursos fitogenètics espanyols de ceba (Mallor *et al.*, 2011).

· 105 ·

		Diam. Gran	Diam. Petit	Diàm. Mitjà	Alçada	Forma (Al./Diam.)	Pes
Varietats	Max.	95.36	91.04	93.20	111.52	1.90	352.67
Espanyoles	Mín.	49.40	48.39	48.90	34.85	0.56	44.63
(20 entrades)	Mitj.	76.95	73.22	75.09	63.25	0.86	193.33
Blanca Tardana	Max.	80.12	63.15	71.54	65.21	0.93	163.69
de Lleida	Mín.	63.45	54.11	58.78	54.88	0.87	93.56
(4 entrades)	Mitj.	73.55	60.43	66.97	60.71	0.91	139.31

Taula 2. Màxima, mínima i mitjana dels diferents caràcters morfològics del bulb estudiats en les varietats espanyoles i en les diferents poblacions de CBTL (Simó *et al.*, 2012a).

Les varietats locals espanyoles, o la majoria d'elles, estan adaptades a les condicions climàtiques de la zona tradicional de producció de calçots, i per tant podrien ser un bon recurs per futurs programes de millora. En el moment però de començar aquesta tesi ni tan sols teníem informació sobre la capacitat de formació de calçots de cada una d'elles. Els assajos de camp han revelat que, com en el cas dels caràcters del bulb, les diferents varietats mostren una gran variabilitat per tots els caràcters estudiats (Taula 3). Pel que fa als caràcters de la morfologia del calçot, destaca que, la mitjana dels diferents caràcters estudiats en les varietats espanyoles és molt semblant a la de la CBTL. Pel que fa a la variabilitat, el conjunt de varietats espanyoles presenten una variabilitat superior en els caràcters diàmetre i pes. Pel caràcter longitud, la variabilitat

observada en les diferents varietats espanyoles és inferior a la que presenta la CBTL, el coeficient de variació presentat per les varietats espanyoles és 15.68% i el de les diferents poblacions de CBTL és 19.85%. En els caràcters nombre de calçots totals per mota i nombre de calçots comercials per mota, les poblacions de CBTL presenten una variabilitat menor. Pel que fa a la mitjana d'aquests caràcters, les varietats espanyoles mostren uns valors molt inferiors als de les diferents poblacions de CBTL (Taula 3). No obstant, es van identificar algunes varietats que presentaven un nombre mitjà de calçots per mota semblants als de la CBTL (Cebolla de Nerja (8.21 calçots totals) i Cebolla Amarilla de Ibarra (8.58)). Aquestes varietats són especialment interessants pel nostre programa de millora, ja que tenint en compte que mai s'hi ha fet selecció per elevat nombre de calçots, s'esperaria una bona resposta a la selecció per aquest caràcter. Tot i així, caldria veure quina proporció d'aquests calçots acabarien sent comercials.

		Diam. Gran	Diam. Petit	Diàm. Mitjà	Longitud	Pes	Calçots totals	Calçots comercials	Dolçor	Fibra	Gustos estrany
Varietats	Max.	27.99	25.80	26.90	18.82	181.57	8.58	2.21	6.76	7.24	7.15
Espanyoles	Mín.	17.32	13.68	15.60	8.91	50.25	2.57	0.00	1.94	2.08	3.07
(20 entrades)	Mitj.	21.43	17.97	19.70	14.20	98.98	4.20	0.73	4.46	3.77	4.69
Blanca Tardana de Lleida	Max.	22.70	19.03	20.31	16.10	105.60	9.91	5.12			
	Mín.	16.79	14.02	15.40	9.35	69.59	8.94	3.06			
(4 entrades)	Mitj.	20.19	16.64	18.41	12.97	90.65	9.66	4.39	6.78	1.38	3.32

Taula 3. Màxima, mínima i mitjana dels diferents caràcters morfològics dels calçots estudiats en les varietats espanyoles i ens les diferents poblacions de CBTL (Simó *et al.*, 2012a; 2012b).

· 106 ·

Com en el cas dels caràcters morfològics, mai s'havien estudiat sensorialment les diferents varietats espanyoles en forma de calçot. Desconeixem si l'elecció de la CBTL com a varietat tradicionalment usada en el cultiu dels calçots havia estat simplement per la seva capacitat de treure molts brots florals o si hi havia també característiques sensorials que la fessin especialment atractiva. Els resultats experimentals ens diuen que la CBTL és una de les varietats que presenta uns valors més pròxims a l'idiotip fixat (Taula 3). De la mateixa manera que passava amb els caràcters productius, es van detectar altres varietats amb valors també pròxims a l'idiotip i que podrien ser usades en futurs programes de millora: la Ceba de Figueres i la Cebolla de Betanzos, amb 6.34 i 6.76, van destacar com a varietats molt dolces; la Cebolla de Nerja i la Ceba Blanca Mallorquina, van destacar per una baixa percepció de fibra (2.08 i 2.34 respectivament); finalment la Cebolla Colomera (3.07) i la Cebolla Babosa (3.50) van ser les varietats que van presentar els valors més baixos pel caràcter presència de gustos estranys.

2.5.3 Del Fenotipat d'ADN al Genotip

En ceba, una gran diversitat de marcadors ha estat usada per la caracterització molecular. Cada tipus de marcador té els seus avantatges i els seus inconvenients, i es fa difícil determinar quin és el marcador més apropiat per cada espècie o per les diferents finalitats de l'estudi. Així doncs, en ceba s'han fet servir RFLPs (Bradeen i Havey, 1995; King *et al.*, 1998), CAPS (Havey, 1995; McCallum *et al.*, 2007), RAPDs (Bradeen i Havey, 1995; D'Ennequin *et al.*, 1997; dos Santos *et al.*, 2012; Leite i Anthonisen, 2009; Tanikawa *et al.*, 2002), microsatèl·lits o SSR (Araki *et al.*, 2010; Baldwin *et al.*, 2012; Fischer i Bachmann, 2000; Jakse *et al.*, 2005; Khar *et al.*, 2011;

McCallum *et al.*, 2006, 2007, 2008; Santos *et al.*, 2010), AFLPs (Araki *et al.*, 2003; Gökcé *et al.*, 2002; Havey *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2011; van Heusden *et al.*, 2000) i SNPs (Khar *et al.*, 2008; McCallum *et al.*, 2008).

La quantitat d'ADN necessari per les analisis, la necessitat de conèixer la seqüència prèviament, la facilitat d'ús i interpretació, la capacitat per detectar heterozigots, el tipus de mutació detectada, la freqüència i la distribució al llarg del genoma del marcador, la reproductibilitat o el cost econòmic, són algunes de les diferències entre els marcadors com ja s'ha comentat en la introducció.

En el nostre cas, i per tal de donar una major solidesa als resultats obtinguts es va optar per utilitzar simultàniament dos tipus de marcadors. Per una banda, es va escollir treballar amb microsatèl·lits, donat que són altament informatius, co-dominants, basats en la PCR, específics de locus i àmpliament distribuïts. El principal problema dels microsatèl·lits, però, és la necessitat de conèixer la seqüència de la regió flanquejant al motiu repetit. Aquesta limitació quedava resolta amb l'ús de SSR anteriorment descrits (Fischer, 2000). Per altra banda, es van escollir els AFLPs, pel baix cost econòmic, la facilitat en l'ús i el gran polimorfisme que presenten.

La immensa majoria dels treballs realitzats amb marcadors moleculars parteixen d'extraccions fetes en *bulk* (barreja dels ADNs dels diferents individus), fet que fa pràcticament impossible determinar la diversitat genètica dins de la població, més enllà de lleugeres interpretacions fetes amb intensitats de senyals de banda. En el nostre cas, varem treballar amb extraccions individuals de 6 plantes diferents, fet que ens permetria obtenir informació sobre el nivell de fixació o heterozigosi present en les poblacions.

L'anàlisi amb SSR dóna un total de 71 alels que representa 10.14 alels per marcador, molt similar a la mitjana obtinguda per Baldwin i col·laboradors (2012) amb 8 alels per marcadors i als 10.4 alels per marcador estimats per Tsukazaki i col·laboradors (2010) en *Allium fistulosum*. Pel que fa a les heterozigositats observades, en el nostre cas són lleugerament superiors a les publicades per Baldwin i col·laboradors (2012), els quals especulen que la causa d'aquesta baixa heterozigositat pot venir donada per l'efecte de la selecció. Malgrat els milloradors normalment fan servir unes 50 plantes pel manteniment de les poblacions, en el cas de les entrades conservades i multiplicades en bancs de germoplasma, sovint el nombre de plantes usades pel manteniment és menor, i això fa que es trenqui l'equilibri de Hardy-Weinberg. Destaca el fet que les varietats millorades que es van incloure en l'estudi presenten un nivell d'heterozigositat similar a la resta de les entrades, fet molt important degut a possibles problemes de depressió consanguïnia derivada del procés de selecció.

Pel que fa a l'anàlisi amb AFLP, utilitzant 3 combinacions d'encebadors s'han obtingut 201 bandes de les quals 74 han resultat polimòrfiques, obtenint una proporció de pràcticament 25 bandes polimòrfiques per combinació d'encebadors. Cap d'aquestes bandes va resultar específica d'una sola varietat ni tampoc del conjunt de les diferents poblacions de la CBTL. En pocs estudis de variabilitat genètica de ceba s'han usat els AFLPs, Santos i col·laboradors (2011) usant 13 combinacions d'encebadors en 41 genotips de diferent varietats de cebes, van obtenir un rendiment molt inferior al nostre pel que fa a nombre de bandes polimòrfiques, amb 11.23 bandes polimòrfiques per combinació. Estudis fet amb espècies silvestres emparantades, tal i com era d'esperar, augmenten el nombre de bandes per combinació, Filijushin i col·laboradors (2011) treballant amb 25 genotips de diferents espècies d'*Allium* obtenen un rendiment de més de 50 bandes polimòrfiques per marcador; Phillips i col·laboradors (2008) obtenen 90 bandes per

combinació d'encebadors, treballant amb 12 genotips de 3 espècies diferents d'*Allium*. El fet que s'usin diferents combinacions d'encebadors i el nombre d'individus usat per genotip són factors que poden explicar aquesta diferència tan gran entre els diferents treballs.

El resultat obtingut amb els dos tipus de marcadors és semblant, confirmat per la correlació significativa trobada en realitzar el test de Mantel (Mantel, 1967) a les dues matrius de dades. En la majoria de casos, tant amb SSRs com amb AFLPs, els individus de cada una de les entrades es situen més o menys agrupats, encara que existeix un fort solapament entre les diferents entrades. Fins i tot les entrades d'altres parts del món, exceptuant-ne una en el cas de l'anàlisi amb microsatèl·lits, es solapen amb algunes de les varietats locals espanyoles. En resum, la població espanyola de cebes presenta un fons genètic bastant compartit fins i tot amb altres varietats forasteres, fet que segurament s'explica pel caràcter al·lògam de la ceba, la ubiqüïtat del cultiu i la seva importància en l'alimentació mundial. A la vegada observem una variabilitat molt gran pel que fa a caràcters agromorfològics, i el fet que aquests sovint estiguin regulats per un nombre petit de gens (el color, per exemple, està controlat per 5 gens majors (Davis i El-Shafie, 1967)) dificulta enormement la relació entre les dades del fenotipat agromorfològic i l'anàlisi molecular amb marcadors neutres, tal i com s'havia observat anteriorment en altres espècies com el tomàquet (Casals *et al.*, 2011).

2.5.4 Fenotipat de caràcters comercialment importants en les cebes i els calçots. Els atributs sensorials

Dels quatre articles localitzats referents a l'anàlisi sensorial de ceba (Cavagnaro *et al.*, 2007; Crowther *et al.*, 2005; Schwimmer i Guadagni, 1962; Wall i Corgan, 1992), només el treball realitzat per Cavagnaro i col·laboradors (2007) es basa en ceba cuita. En aquest darrer treball, les mostres cuites en bany maria, en diferents temps, són posteriorment triturades i homogeneitzades, i els tastadors proven una petita alíquota servida a 20 °C. El tast es limita a la valoració de la pungència, en una escala de l'1 al 5. La manca d'estudis orientats a avaluar el perfil sensorial de la ceba cuita ha comportat que no existeixi un mètode estandarditzat de preparació de la mostra. No existeix una normativa vigent que descrigui un possible mètode estandarditzat de cocció de calçots (ni de cebes), com sí passa, per exemple, amb altres productes com les llegums (UNE 87028-1, 1997), l'oli verge d'oliva (UNE 55124, 1981) o els olis refinats (UNE 55125, 1981). Alhora cal recordar que en el procés d'elaboració d'un mètode estandarditzat per a la cocció de mongetes, realitzat pel nostre grup (Romero del Castillo *et al.*, 2012), es va partir d'una norma UNE, i es va procurar adaptar-lo a l'usat pels professionals de la cocció de llegums doncs el mètode vigent resultava imprecís i allunyat de la cocció que fan restauradors i consumidors. En el transcurs de les nostres investigacions es va posar de manifest, doncs, la necessitat de descriure un mètode normalitzat de preparació del calçot per tal de dur a terme anàlisi sensorial.

El mètode tradicional més freqüent emprat per a la cocció dels calçots consisteix literalment en cremar a flama viva la part externa, per consumir-ne la part central que queda cuita. Aquest mètode genera moltes diferències ambientals entre la cocció de cada calçot, provocant un error important a l'hora de comparar genotips mitjançant un panel de tast. Per això, després de diverses proves ens varem inclinar per la cocció al forn (18 minuts a 270°C), la qual resulta, evidentment, més homogènia.

Un altre problema que s'havia de resoldre era el de la representativitat de la mostra que tastaven els panelistes, doncs assajos preliminars varen revelar que hi havia diferències sensorials entre calçots de la mateixa mota, i entre diferents parts del mateix calçot. Finalment, un darrer problema a abordar era la gran quantitat de mostres que el panel havia d'avaluar en un curt període, doncs el producte no es pot conservar fresc gaire temps i presenta una marcada estacionalitat.

El problema del mostreig es va resoldre elaborant un puré amb un nombre elevat de calçots del mateix genotip. Aquest material era homogeni i a la vegada representatiu del conjunt de calçots que presentava el genotip. Experiments de comparació de l'avaluació del calçot en forma convencional (calçot sencer) i en forma de puré van posar de manifest que no hi havia diferències significatives i per tant es va seleccionar el puré dels calçots cuits al forn com el material a tastar pel panel.

El problema de l'estacionalitat es va resoldre congelant el puré a -20°C. Les proves de comparació fetes entre puré acabat d'elaborar i puré congelat no van mostrar diferències significatives i per tant varem decidir incloure la congelació del puré com una rutina més del procediment de preparació, que permetia repartir la feina dels panelistes al llarg de tot l'any. En cap cas els purés analitzats varen romandre congelats més de 9 mesos conservats.

L'anàlisi química es va realitzar preparant les mostres de la mateixa manera que per a l'anàlisi sensorial.

Tal i com s'ha explicat en el punt 2.1, mitjançant un panel de consumidors es va determinar quins caràcters eren els més importants a l'hora de valorar sensorialment els calçots. Aquest mateix panel també es va utilitzar per comprovar que el mètode de cocció, mostreig i conservació de les mostres, era suficientment proper al mètode tradicional com per detectar els caràcters definits a l'idiotip.

. 109 .

Un cop definits els atributs i dissenyat el protocol de cocció, mostreig i conservació es va procedir a l'entrenament d'un panel capaç de valorar en una escala numèrica les diferències entre mostres pel que fa als atributs escollits. El panel estava format per personal del grup de recerca, i la majoria formava part del panel entrenat per a l'avaluació sensorial de mongetes seques (Romero del Castillo, 2008). Durant 9 sessions (6 d'entrenament i 3 de validació), els panelistes van ser entrenats per tal de discriminari cada un dels tres caràcters seleccionats com a important pels consumidors: dolçor, fibra i absència de gustos estranys. El nombre de categories de caràcters és el mateix que s'utilitza en l'anàlisi de mongetes cuites (Casañas *et al.*, 2006; Romero del Castillo *et al.*, 2008a, 2008b). També en el cas dels olis s'usen 3 tipus d'atributs (color, aroma i gust), encara que s'usen entre 8 i 22 descriptors per descriure'ls (Dabbou *et al.*, 2011; Delgado i Guinard, 2011; Fernandes-Silva *et al.*, 2013; Lauri *et al.*, 2013). En el cas del vi i del formatge, per la descripció de l'aroma es treballa amb un nombre molt elevat (94 i 75) de descriptors (Berodier *et al.*, 1997; Noble *et al.*, 1987), però això s'explica pel gran desenvolupament de l'anàlisi sensorial al voltant d'aquests dos productes. En el cas dels tomàquets Casals i col·laboradors (2011) usen 6 descriptors, tant de textura com de percepció olfactogustativa. Molt probablement el pas següent en la valoració del gust i l'aroma dels calçots haurà de ser la substitució del caràcter "Absència de gustos estranys", per diversos descriptors que corresponguin a variacions en l'olor i el gust dels calçots. Per a la mesura dels diferents atributs es van usar escales semiestructurades amb extrems en el 0 i el 10 (Romero del Castillo *et al.*, 2008). Amb aquest tipus de mesura s'obté més informació que usant escales fixes, on només es permeten valors enters, com el cas de la mesura de pungència usada per Cavagnaro i col·laboradors (2007).

2.5.5 Estratègies de millora en cebes i les noves varietats

Actualment, al mercat es troben tres tipus de cebes: varietats híbrides, varietats de pol·linització oberta (PO) i varietats sintètiques. De fet les darreres es pot considerar que són un refinament metodològic derivat de les segones i, per això, en molts casos es parla només de dos grans tipus de materials cultivats (híbrids i PO). Cada tipus de varietat té associat un mètode de millora genètica diferent, tal com s'ha explicat en el punt 2.5.5 de la introducció. L'elecció del mètode de millora i, per tant, del tipus de varietat final obtinguda, té en compte, en el cas de la ceba, sobretot dos factors: el tipus de caràcters descrits en l'idiotip, lligat a la presència de gens que codifiquen per aquests caràcters, i el temps que es pot esmerçar en el procés de millora. En els nostre cas, la desconeixença de la genètica implicada en l'expressió dels caràcters d'interès, i l'escàs temps del que disposavem per tal de fer la millora, ens va fer decantar per un programa basat en la selecció per tal d'obtenir varietats sintètiques. Alhora aquest tipus de selecció facilita la multiplicació anual de llavor, important per donar autonomia al grup de productors associat a la IGP.

Es va decidir iniciar el procés amb poblacions heterozigòtiques amb diferents graus de selecció. Es va decidir no usar línies pures com a plantes fundadores de les noves varietats, degut a l'elevada depressió consanguïnia que es dóna en la ceba, impedint en molts cassos arribar a la homozigosi completa (Brewster, 2008), i augmentant molt el temps d'obtenció i avaluació de les línies. Així doncs, la llavor autofecundada de les plantes seleccionades es guarda i passa a constituir la reserva de material per refundar la població si així es desitja. Els avenços aconseguits en les dues varietats millorades obtingudes indiquen que aquesta estratègia ha estat bona al menys en una primera etapa de millora. Després de només dues generacions de selecció, en el cas de la varietat tardana Montferri, s'ha augmentat més d'un 100% el nombre de calçots comercials al final de la temporada, i en el cas de la varietat primerenca Roquerola, s'ha augmentat més d'un 200% el nombre de calçots comercials desenvolupats al començament de la temporada. Malgrat els avenços espectaculars és cert que en cap de les dues varietats s'ha assolit l'idiotip proposat. Com que continuem fent selecció a partir de les noves varietats obtingudes faltarà veure en les pròximes generacions de selecció si el nombre de calçots comercials segueix en augment o s'estabilitza, fent necessari un canvi en l'estratègia de millora. De fet l'experiment destinat a l'estudi de la variabilitat pel que fa al nombre i característiques dels calçots obtinguts a partir de varietats de ceba diferents de la CBTL, ja dóna pistes sobre quin germoplasma ens podria ajudar per ampliar la variabilitat usada en el programa de millora genètica.

2.6 EL CULTIU DEL CALÇOT: PASSAT, PRESENT I FUTUR

Passat

En el moment d'iniciar aquesta tesi, la varietat de Ceba Blanca Tardana Lleida usada per la majoria d'agricultors de la IGP Calçot de Valls, havia experimentat una disminució del número de calçots comercials per ceba i aquest fet havia generat una preocupació entre ells. Malgrat que aquesta varietat era la més usada, es disposava d'algunes poblacions seleccionades per agricultors i diferents varietats comercials com a possibles germoplasmes de partida d'un procés de millora.

La informació que teníem envers al cultiu es limitava a l'experiència dels productors i als treballs realitzats per Muñoz i col·laboradors (2003, 2006 i 2011). Així, sabíem que es tractava d'un cultiu biennal, amb un maneig molt particular i que malgrat existir una pràctica tradicional de tallar la ceba per la meitat abans de plantar-la, aquesta no aportava un guany significatiu en la producció. No obstant, es desconeixia la variabilitat de les poblacions existents, com afectava l'ambient en els diferents caràcters dels calçots o fins a quin punt era heretable el caràcter nombre de calçots per mota.

Present

Com a resultat de la present tesi, s'han obtingut dues noves varietats que s'aproximen a l'idiotip establert pels productors. Alhora s'ha explorat la variabilitat present en les diferents poblacions de CBTL, i tenint en compte la gran variabilitat que presenten s'han fixat com un bon punt de partida per a la realització de nous programes de millora. A més, s'han caracteritzat també altres varietats de cebes espanyoles per diferents caràcters d'interès tant de la fase de ceba com de la fase de calçot, i s'han pogut identificar algunes varietats interessants, pel que fa al nombre de calçots totals per mota i per cada un dels tres caràcters sensorials estudiats (dolçor, percepció de fibra i absència de gustos estranys).

Aquesta tesi ha aportat i posat a punt un seguit d'eines que han permès i han de permetre realitzar diferents programes de millora en calçots. La constitució dels idiotips sensorial i agronòmic, l'establiment d'una correlació entre el nombre d'ulls que presenta la ceba al tallar-la transversalment i el nombre final de calçots, el desenvolupament del protocol de cocció de calçots i l'entrenament d'un panel de tast, constitueixen alguns èxits d'aquest treball.

. 111 .

Per altra banda, s'ha posat de manifest la forta influència de la fase de ceba en el futur desenvolupament dels calçots. La correlació positiva existent entre la mida del bulb de sembra i el nombre de calçots per mota, o la creació d'un model que permet predir el nombre de calçots produïts per cada mota en un temps determinat han de ser eines que facilitin un maneig més eficient del cultiu.

Actualment, el cultiu del calçot té un important paper dins l'horticultura catalana, sent un dels productes amb un volum de mercat més important. Aquesta importància creix fortament si es té en compte exclusivament les comarques tarragonines on el cultiu del calçot passa a ser la hortalissa amb un volum de mercat més gran. La IGP Calçot de Valls, després de més de 10 anys d'existència, sembla consolidada amb un augment constant de la producció de calçots cada any, i amb un preu de venda superior a la resta de calçots comercialitzats sense distintiu.

Futur

Poc a poc la IGP s'ha anat fent un lloc en el mercat basant-se bàsicament en una bona presentació del producte. Aquest tret diferencial és de fàcil assoliment per la resta de productors i pot fer que en pocs anys, el calçot de Valls amb etiqueta quedí diluït en el mercat. Així doncs, sembla clau poder desenvolupar nous caràcters que permetin donar un valor afegit al calçot de Valls i per tant que es pugui diferenciar de la resta. La millora del perfil sensorial ha de ser sens dubte el pròxim objectiu de millora els pròxims anys, sense deixar de banda la millora contínua de les varietats actuals respecte al nombre de calçots comercials per

mota i la homogeneïtat de creixement (cal recordar que les varietats obtingudes són els resultat de només tres cicles de selecció).

Com a resultat d'aquesta tesi, es disposa de l'idiotip sensorial, del protocol de cocció i d'un panel entrenat en la caracterització sensorial dels calçots. No obstant, aquesta caracterització sensorial mitjançant panel ha de venir acompanyada de mètodes de fenotipat més ràpids, ja que la limitació del panel pel que fa al nombre de mostres tastades per temporada fa inviable la selecció només usant aquest tipus de fenotipat. Proves fetes amb tecnologies com l'infraroig proper (NIR), apunten bones correlacions entre els espectres obtinguts amb aquesta metodologia i els caràcters sensorials.

Un dels aspectes que sovint provoquen error en la determinació del valor genotípic dels aspectes sensorials és el factor ambiental. Durant la present tesi, s'han realitzat alguns avenços al respecte, però es requereix un estudi més a fons per tal de determinar quin paper juga l'ambient en els diferents caràcters d'interès, no només sensorials, sinó també morfològics i agronòmics. Aquest efecte ambiental s'ha de poder incloure en un nou model matemàtic que permeti predir el desenvolupament dels calçots, no només en funció del temps en una determinada població, sinó que incloent els aspectes ambientals i econòmics permeti establir el millor moment de la collita tenint en compte les condicions del sòl, el clima o el genotip.

Així doncs, sembla evident la necessitat de seguir apostant per la investigació entorn aquest cultiu. S'han fet grans avenços en el coneixement de diferents aspectes vinculats a la millora i al maneig del cultiu, però si es vol fer front a una possible entrada de producte estranger a preus inferiors, com ha passat en tants altres vegetals, serà imprescindible poder aportar un valor afegit al producte i que aquest sigui demostrable objectivament.

CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

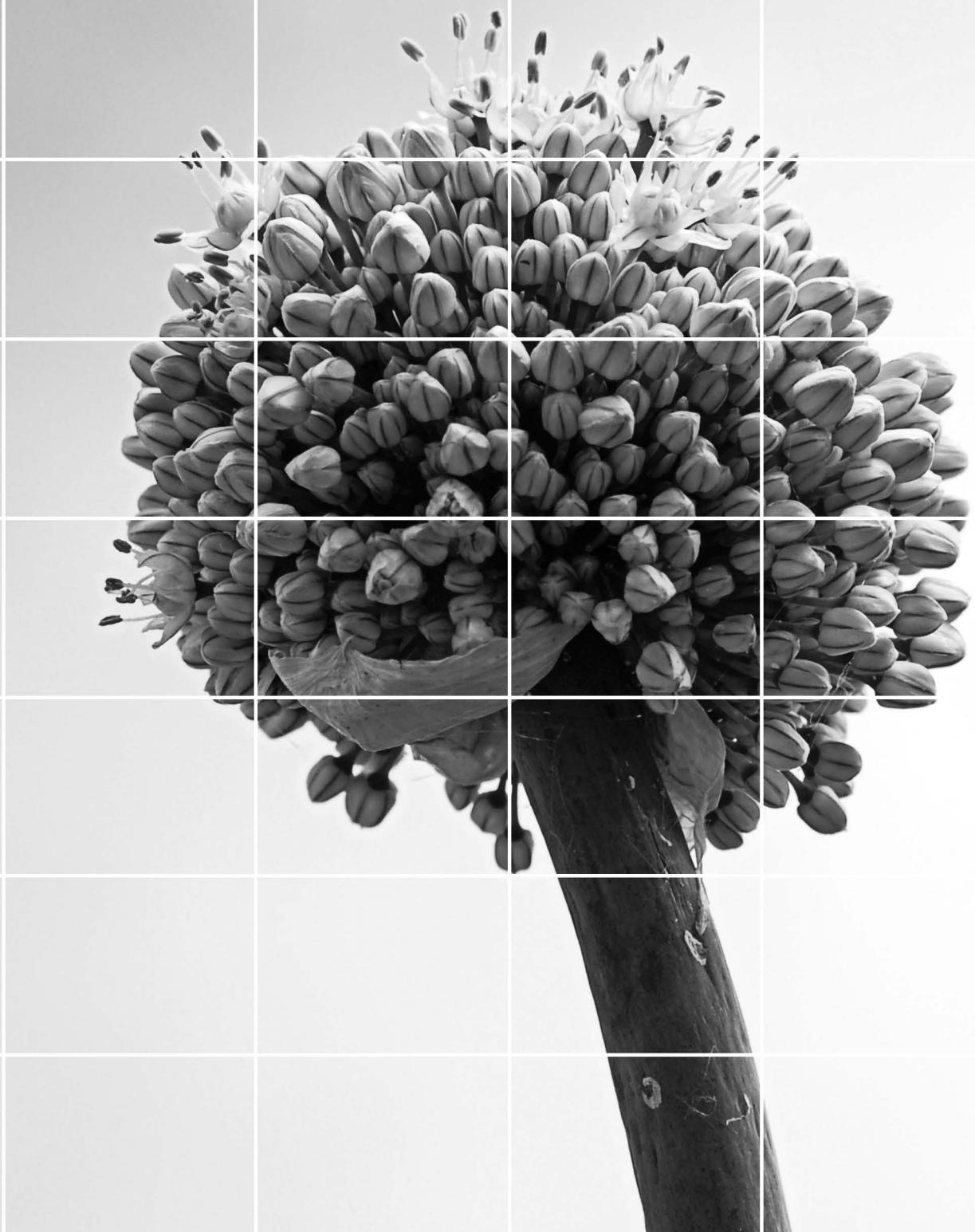
1. El idiotip sensorial dissenyat, descriu que un calçot, per ser apreciat, ha de ser dolç, presentar poca fibra i no tenir gustos estranys. Aquest idiotip és compatible amb els caràcters descrits en el idiotip agronòmic.
2. El protocol de preparació desenvolupat per tal de poder analitzar les mostres mitjançant un panel sensorial o químicament, consisteix en: una cocció al forn de 18 minuts a 250°C de 50 calçots per mostra i l'elaboració de puré amb la part blanca interior dels calçots cuits. La utilització de puré homogeni en les analisis permet un mostreig molt eficient i disposar de rèpliques idèntiques per a tots els panelistes. A la vegada, i aprofitant que aquest es pot congelar conservant les propietats, permet un allargament en la temporada de tastos i ànalisis químiques.
3. La variabilitat inter-varietal observada en les varietats de cebes de prestigi espanyoles pel que fa a caràcters sensorials és molt elevada. Malgrat que cap de les varietats estudiades s'ha apropat més al idiotip que la Ceba Blanca Tardana de Lleida (CBTL), s'han identificat algunes varietats amb característiques interessants tenint en compte que mai s'han seleccionat pel seu ús com a font de calçots.
4. S'ha desenvolupat un model, ajustat a una funció de Gompertz modificada, que permet l'estimació del nombre de calçots per planta en funció del temps. Això permet la comparació entre poblacions en un moment determinat del cultiu o tenint en compte les corbes que descriuen al llarg de tot el cultiu.
5. La varietat de ceba Blanca Tardana de Lleida és la que ha produït un major nombre de calçots. No obstant alguna de les varietats de cebes espanyoles estudiades han presentat valors similars la qual cosa les fa candidates a ser usades en programes de millora.
6. Les diferents varietats espanyoles de ceba estudiades, incloent la CBTL, presenten un fons genètic molt similar. Tant l'aproximació feta a partir de SSR com la feta a partir de AFLPs, mostren un gran solapament entre les varietats, suggerint un fort flux genètic entre elles.
7. El pes de la ceba juga un paper important en el nombre de calçots finals produïts. Aquest nombre es veu fortemet afectat negativament amb pesos de ceba inferiors a 100g , mentre que amb pesos superiors l'efecte es dilueix.
8. El recompte d'ulls efectuat en un a ceba tallada per la meitat de manera transversal permet predir el nombre de calçots totals que es desenvoluparan multiplicant el nombre de gemes per dos.
9. Com a resultat d'un programa de millora genètica s'han obtingut dues noves varietats de ceba productora de calçots: Roquerola, amb un desenvolupament primerenc obtenint un nombre de calçots comercials mitjà (4,6 el més de gener), i Montferri, amb un nombre de calçots comercials (8 per mota) molt pròxim a l'idiotip i un desenvolupament tardà.

ABREVIATURES

ABREVIATURES

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
°C	Graus Centígrads
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequences</i>
CHI	Xalcona isomerasa
CITA	<i>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón</i>
cm	Centímetres
COMAV	<i>Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana</i>
CRF	<i>Centro de Recursos Fitogenéticos</i>
DARP	Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi rural
DOP	Denominació d'Origen Protegida
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FL	Factor lacrimogen
FOS	Fructooligosacàrids
g	Grams
ha	Hectàrea
IGP	Indicació Geogràfica Protegida
INIA	<i>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria</i>
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària
MARM	<i>Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente</i>
MCFH	Mercat Central de Fruites i Hortalisses
Ms	Esterilitat Masculina o Androesteril·litat
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NIR	Tecnologia del infraroig proper
nm	Nanòmetre
OP	Varietats de Polinització Oberta
pb	Parell de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
S	Un tipus d'esterilitat citoplasmàtica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SSR	<i>Single Sequence Repeat</i>
t	Tona
T	Un tipus d'esterilitat citoplasmàtica

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

A

- Allard, R. W. (1960) *Principles of Plant Breeding*. John Wiley & Sons, Australia.
- Amer, F. A. and Williams, W. T. (1957) Leaf-area growth in *Pelargonium zonale*. *Annals of Botany*, 21, 339-342.
- Aquadro, C. F. (1997) Insights into the evolutionary process from patterns of DNA sequence variability. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7(6), 835-840.
- Araki, N., Furuta, T., Ohara, T., Yamauchi, N. and Shigyo, M. (2003) Cultivar discrimination among wakegi onion (*Allium* x *wakegi* Araki) by fluorescent AFLP technique. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72(3), 230-235.
- Araki, N., Masuzaki, S. I., Tsukazaki, H., Yaguchi, S., Wako, T., Tashiro, Y., Yamauchi, N. and Shigyo, M. (2010) Development of microsatellite markers in cultivated and wild species of sections Cepa and Phyllodolon in *Allium*. *Euphytica*, 173(3), 321-328.

B

- Bacher, J. W., Pan, S. and Ewart, L. (1989). Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ceiae* in cultivated onions. Paper presented at the Natl. Onion Res. Conf., Boise.
- Baldwin, S., Pither-Joyce, M., Wright, K., Chen, L. S. and McCallum, J. (2012) Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations. *Molecular Breeding*, 30(3), 1401-1411.
- Barker, D. J., Ferraro, F. P., Nave, R. L., Sulc, R. M., Lopes, F. and Albrecht, K. A. (2010) Analysis of Herbage Mass and Herbage Accumulation Rate Using Gompertz Equations. *Agronomy Journal*, 102(3), 849-857.
- Bérodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J., Herrero, L. and Adamo, C. (1997) Guide d'Évaluation Olfacto-Gustative des Fromages à Pâte Dure et Semi-dure. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(7), 653-664.
- Bohanec, B. (2002). Double-haploid onions. In Rabinowitch H. D. and Currah L. (Eds.), *Allium Crop Science: Recent Advances* (pp. 145-157). CAB International, Wallingford, UK.
- Bosch Serra, A. D. and Currah, L. (2002). Agronomy of Onions. In Rabinowitch H. D. and Currah L. (Eds.), *Allium Crop Science: Recent Advances* (pp. 187-223). CAB International, Wallingford, UK.
- Bradeen, J. M. and Havey, M. J. (1995) Restriction-Fragment-Length-Polymorphisms reveal considerable nucleic divergence within a well-supported maternal clade in *Allium* section Cepa (Alliaceae). *American Journal of Botany*, 82(11), 1455-1462.
- Brewster, J. L. (2008) *Onion and other vegetable alliums* (2nd ed.). CAB International, Wallingford, UK.

C

- Cacho, O. J. (1993) A practical equation for pasture growth under grazing. *Grass and Forage Science*, 48(4), 387-394.
- Carraledo, M. and Mallor, C. (2007) *Variedades autóctonas de cebollas españolas*. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Zaragoza, Spain.
- Casals, J., Pascual, L., Canizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casanas, F. and Nuez, F. (2011) The risks of success in quality vegetable markets: Possible genetic erosion in Marmande tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) and consumer dissatisfaction. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 78-84.
- Casanas, F., Pujola, M., del Castillo, R. R., Almirall, A., Sanchez, E. and Nuez, F. (2006) Variability in some texture characteristics and chemical composition of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2445-2449.
- Cavagnaro, P. F., Sance, M. M. and Galmarini, C. R. (2007) Effect of heating on onion (*Allium cepa* L.) antiplatelet activity and pungency sensory perception. *Food Science and Technology International*, 13(6), 447-453.
- Clarke, A. E., Jones, H. A. and Little, T. M. (1944) Inheritance of bulb color in the onion. *Genetics*, 29(6), 569-575.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. and Helling, R. B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3240-3244.
- Coolong, T. W. and Randle, W. M. (2003) Temperature influences flavor intensity and quality in 'Granex 33' onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 176-181.
- 124 · Cramer, C. (2000) Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion. *Euphytica*, 115(3), 159-166.
- Cramer, C. S. (2004) Trait Heritability Estimates of an Open-pollinated Onion Population. *Hortscience*, 39(4), 812-812.
- Cramer, C. S. (2006) Onion trait heritability and response from selection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(5), 646-650.
- Crowther, T., Collin, H. A., Smith, B., Tomsett, A. B., O'Connor, D. and Jones, M. G. (2005) Assessment of the flavour of fresh uncooked onions by taste-panels and analysis of flavour precursors, pyruvate and sugars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 112-120.
- Cubero, J. I. (2003) *Introducción a la mejora genética vegetal* (2nd ed.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Currah, L. (1985) Review of three onion improvement schemes in the tropics. *Tropical Agriculture*, 62(2), 131-136.

D

- D'Ennequin, M. L. T., Panaud, O., Robert, T. and Ricoch, A. (1997) Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity*, 78(4), 403-409.
- Dabbou, S., Brahmi, F., Selvaggini, R., Chehab, H., Taticchi, A., Servili, M. and Hammami, M. (2011) Contribution of irrigation and cultivars to volatile profile and sensory attributes of selected virgin olive oils produced in Tunisia. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(9), 1964-1976.
- Darbyshire, B. and Henry, R. J. (1978) Distribution of fructans in onions. *New Phytologist*, 81(1), 29-&.

Darbyshire, B. and Henry, R. J. (1979) Association of fructans with high percentage dry-weight in onion cultivars suitable for dehydrating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(11), 1035-1038.

Darbyshire, B. and Steer, B. T. (1990). Carbohydrate biochemistry. In Brewster J. L. and Rabinowitch H. D. (Eds.), *Onions and Allied Crops* (Vol. 3, pp. 1-16). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Davis, G. N. and El-Shafie, M. W. (1967) Inheritance of bulb color in the onion (*Allium cepa* L.). *Hilgardia*, 38, 607-622.

Delgado, C. and Guinard, J. X. (2011) Sensory Properties of Californian and Imported Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Food Science*, 76(3), S170-S176.

Departament d'Agricultura Alimentació i Acció Rural (2009). Ordre AAR/414/2009.

Donald, C. M. (1968) The breeding of crop ideotypes. *Euphytica*, 17(3), 385-403.

dos Santos, M. D. M., Ragassi, C. F., Fonseca, M. E. D., Buzar, A. G. R., Oliveira, V. R., de Melo, P. C. T. and Boiteux, L. S. (2012) Genetic diversity of tropical-adapted onion germplasm assessed by RAPD markers. *Horticultura Brasileira*, 30(1), 112-118.

Dowker, B. D. (1990). Onion Breeding. In Rabinowitch H. D. and Brewster J. L. (Eds.), *Onions and Allied Crops* (pp. 215-232). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

E

East, E. M. (1916) Studies on size inheritance in Nicotiana. *Genetics*, 1, 164-176.

Enciso, J., Wiedenfeld, B., Jifon, J. and Nelson, S. (2009) Onion yield and quality response to two irrigation scheduling strategies. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 301-305.

European Comission (2006). Regulation (CE) 510/2006, on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs.

F

Fernandes-Silva, A. A., Falco, V., Correia, C. M. and Villalobos, F. J. (2013) Senosory analisis and volatile compounds of olive oil (c. Corbançosa) from different irrigation regimes. *Grasas y aceites*, 64(1), 59-67.

Filjushin, M. A., Kholda, O. A., Kochieva, E. Z. and Ryzhova, N. N. (2011) AFLP marking of the genotypes of leek (*Allium porrum*) varieties. *Russian Journal of Genetics*, 47(4), 492-496.

Fischer, D. and Bachmann, K. (2000) Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus Rhizirideum. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(1), 153-164.

Friesen, N. and Klaas, M. (1998) Origin of some minor vegetatively propagated *Allium* crops studied with RAPD and GISH. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45(6), 511-523.

Fritsch, R. M., Matin, F. and Klaas, M. (2001) *Allium vavilovii* M. Popov et Vved. and a new Iranian species are the closest among the known relatives of the common onion *Allium cepa* L. (Alliaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48(4), 401-408.

G

Galmarini, C. R., Goldman, I. L. and Havey, M. (2001) Genetic analyses of correlated solids, flavor, and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 265(3), 543-551.

Gökçe, A. F., McCallum, J., Sato, Y. and Havey, M. J. (2002) Molecular Tagging of the Ms Locus in Onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 576-582.

Gompertz, B. (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 36, 513-585.

H

Hamilton, B. K., Pike, L. M., Sparks, A. N., Bender, D. A., Jones, R. W., Candeia, J. and de Franca, G. (1999) Heritability of thrips resistance in the 'IPA-3' onion cultivar in South Texas. *Euphytica*, 109(2), 117-122.

Hamilton, B. K., Pike, L. M. and Yoo, K. S. (1997) Clonal variations of pungency, sugar content, and bulb weight of onions due to sulphur nutrition. *Scientia Horticulturae*, 71(3-4), 131-136.

Hamilton, B. K., Sun Yoo, K. and Pike, L. M. (1998) Changes in pungency of onions by soil type, sulphur nutrition and bulb maturity. *Scientia Horticulturae*, 74(4), 249-256.

Hanelt, P. (1990) *Taxonomy, evolution, and history*. In Rabinowitch H. D. and Brewster J. L. (Eds.), *Onions and Allied Crops* (vol. 1, pp. 1-26). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Havey, M. J. (1995) Identification of cytoplasms using the polymerase chain-reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(2), 263-268.

Havey, M. J. (1999). Onion. In Wehner T. C. (Ed.), *Vegetable Cultivar Descriptions for North America* (Vol. 34, pp. 961-968). HortScience, Vol. 34(6)

Havey, M. J., King, J. J., Bradeen, J. M., Bark, O., Sato, Y. and Gokce, A. F. (2001). A low-density genetic map of onion (*Allium cepa* L.) and its use for marker-facilitated selection of maintainer lines. In Armstrong J. (Ed.), *Proceedings of the Second International Symposium on Edible Alliaceae* (pp. 87-89). International Society Horticultural Science, Leuven 1.

I

Ismail, Z., Khamis, A. and Jaafar, Y. (2003) Fitting Nonlinear Gompertz Curve to Tobacco Growth Data. *Pakistan Journal of Agronomy*, 2(4), 223-236.

J

Jakse, J., Martin, W., McCallum, J. and Havey, M. J. (2005) Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(6), 912-917.

Johannsen, W. (1911) The Genotype Conception of Heredity. *The American Naturalist*, 45(531), 129-159.

Jones, H. A. and Davis, D. R. (1944) *Inbreeding and heterosis and their relation to the development of new varieties of onions* (Vol. 874). U.S. Department of Agriculture, Washington, USA.

Jones, H. A. and Mann, L. K. (1963) *Onions and their allies, botany, cultivation, and utilization*. Leonard Hill, London, UK.

K

Kadams, A. M. and Nwasike, C. C. (1986) Heritability and correlation studies on some vegetative traits in nigerian local white onion, *Allium cepa* L. *Plant Breeding*, 97(3), 232-236.

Kampen, J. (1970) *Shortening the breeding cycle in onions (Allium cepa L.)* (Vol. 51). Mededelingen Proefstation voor de Groenteteelt in de Vollegrond, Alkmaar, the Netherlands.

Khar, A., Jakse, J. and Havey, M. J. (2008) Segregations for onion bulb colors reveal that red is controlled by at least three loci. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1), 42-47.

Khar, A., Lawande, K. E. and Negi, K. S. (2011) Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(5), 741-752.

Kik, C. (2008) *Allium* genetic resources with particular reference to onion. *Acta Horticulturae*, 770, 135-137.

Kim, S., Jones, R., Yoo, K. S. and Pike, L. M. (2004) Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4), 411-419.

Kim, S., Yoo, K. S. and Pike, L. M. (2007) Production of doubled haploid onions (*Allium cepa*) and evaluation of their field performance. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 48(3), 143-147.

King, J. J., Bradeen, J. M. and Havey, M. J. (1998) Variability for restriction fragment-length polymorphisms (RFLPs) and relationships among elite commercial inbred and virtual hybrid onion populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6), 1034-1037.

· 127 ·

Klaas, M. and Friesen, N. (2002). Molecular Markers. In Rabinowitch H. D. and Currah L. (Eds.), *Allium Crop Science: Recent Advances* (pp. 145-157). CAB International, Wallingford, UK.

Kumar, S., Imtiyaz, M. and Kumar, A. (2007) Effect of differential soil moisture and nutrient regimes on postharvest attributes of onion (*Allium cepa* L.). *Scientia Horticulturae*, 112(2), 121-129.

Kumar, S., Imtiyaz, M., Kumar, A. and Singh, R. (2007) Response of onion (*Allium cepa* L.) to different levels of irrigation water. *Agricultural Water Management*, 89(1-2), 161-166.

L

Lancaster, J. E. and Boland, M. J. (1990). Flavor biochemistry. In Brewster J. L. and Rabinowitch H. D. (Eds.), *Onions and Allied Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Lauri, I., Pagano, B., Malmendal, A., Sacchi, R., Novellino, E. and Randazzo, A. (2013) Application of "magnetic tongue" to the sensory evaluation of extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 140(4), 692-699.

Lee, E. J., Yoo, K. S., Jifon, J. and Patil, B. S. (2008) Changes in pungency and flavor precursor compounds in four onion cultivars by applying extra sulfur nutrition. *Hortscience*, 43(4), 1078-1079.

Leite, D. L. and Anthonisen, D. (2009) Molecular characterization of onion cultivars by RAPD markers. *Horticultura Brasileira*, 27(4), 420-424.

Lin, M.-W., Watson, J. F. and Baggett, J. R. (1995) Inheritance of Soluble Solids and Pyruvic Acid Content of Bulb Onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(1), 119-122.

Lladonosa, J. (2005) *El gran llibre de la cuina catalana*. Empúries, Barcelona, Catalonia.

M

Machado, E. C. (1981) *Um modelo matemático-fisiológico para simular o acúmulo de matéria seca na cultura de cana-de-açúcar (Saccharum sp.)*. UNICAMP/FEA, Campinas, Brasil.

Mallor, C., Balcells, M., Mallor, F. and Sales, E. (2011) Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. *Plant Breeding*, 130(1), 55-59.

Mallor, C., Carravedo, M., Estopanan, G. and Mallor, F. (2011) Characterization of genetic resources of onion (*Allium cepa* L.) from the Spanish secondary centre of diversity. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1), 144-155.

Mallor, C. and Sales, E. (2012) Yield and traits of bulb quality in the Spanish sweet onion cultivar 'Fuentes de Ebro' after selection for low pungency. *Scientia Horticulturae*, 140, 60-65.

Mantel, N. (1967) Detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.

Martin, W. J., McCallum, J., Shigyo, M., Jakse, J., Kuhl, J. C., Yamane, N., Pither-Joyce, M., Gokce, A. F., Sink, K. C., Town, C. D. and Havey, M. J. (2005) Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(3), 197-204.

· 128 ·
McCallum, J., Clarke, A., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Butler, R., Brash, D., Scheffer, J., Sims, I., van Heusden, S., Shigyo, M. and Havey, M. (2006) Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(5), 958-967.

McCallum, J., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Kenel, F., Davis, S., Butler, R., Scheffer, J., Jakse, J. and Havey, M. J. (2007) Genetic mapping of sulfur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(5), 815-822.

McCallum, J., Pither-Joyce, M., Shaw, M., Porter, N., Searle, B., McManus, M. and Havey, M. J. (2005). Genomic and biochemical analysis of onion (*Allium cepa* L.) sulfur metabolism. In Guangshu L. (Ed.), *Proceedings of the IVth International Symposium on Edible Alliaceae* (pp. 75-83). International Society Horticultural Science, Leuven 1.

McCallum, J., Thomson, S., Pither-Joyce, M., Kenel, F., Clarke, A. and Havey, M. J. (2008) Genetic Diversity Analysis and Single-nucleotide Polymorphism Marker Development in Cultivated Bulb Onion Based on Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(6), 810-818.

McCollum, G. D. (1968) Heritability and genetic correlation of soluble solids bulb size and shape in white sweet spanish onion. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 10(3), 508-514.

Mendel, G. (1865) Versuche über Pflanzen-hybriden. English translation by Batesen W. in *J. Roy Hort. Soc.*, 26, 1-32, 1901.

Menges, R. M. and Tamez, S. (1981) Response of onion (*Allium cepa* L.) to annual weeds and postemergence herbicides. *Weed Science*, 29(1), 74-79.

Muchow, R. C., Spillman, M. F., Wood, A. W. and Thomas, M. R. (1994) Radiation interception and biomass accumulation in a sugarcane crop grown under irrigated tropical conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45(1), 37-49.

Muñoz, P. (2011) *Fertilització de calçot en producció ecològica*. Fitxa tècnica, 60. DAAM.

Muñoz, P., Santos, O., Ballvé, A. and Matas, C. (2003) Resultados del proyecto de experimentación de seis cultivares de cebolla blanca tardía de Lleida utilizadas para el cultivo de calçot. Paper presented at the XXXIII Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura, 61-69.

Muñoz, P., Santos, O., Ballvé, A. and Matas, C. (2006). Evaluación de diferentes cultivares de cebolla blanca tardía de Lleida utilizadas para el cultivo de calçot. Paper presented at the XXXVI Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura.

N

Nilsson-Ehle, H. (1911) *Kreuzungsuntersuchungen an Hafer und Weizen*. Lunds Univ. Årsskr. N. F. Afd. 2 Bd 7 Nr 6. 2-82, Germany.

Noble, A. C., Arnold, R. A., Buechsenstein, J., Leach, E. J., Schmidt, J. O. and Stern, P. M. (1987) Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), 143-146.

O

Osman, A. M., Almekinders, C. J. M., Struik, P. C. and van Bueren, E. T. L. (2008) Can conventional breeding programmes provide onion varieties that are suitable for organic farming in the Netherlands? *Euphytica*, 163(3), 511-522.

· 129 ·

P

Parsons, A. J., Johnson, I. R. and Harvey, A. (1988) Use of a model to optimize the interaction between frequency and severity of intermittent defoliation and to provide a fundamental comparison of the continuous and intermittent defoliation of grass. *Grass and Forage Science*, 43(1), 49-59.

Parsons, A. J., Schwinnig, S. and Carrere, P. (2001) Plant growth functions and possible spatial and temporal scaling errors in models of herbivory. *Grass and Forage Science*, 56(1), 21-34.

Pearl, R. and Reed, L. J. (1925) Skew growth curves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11, 16-22.

Phillips, N. C., Larson, S. R. and Drost, D. T. (2008) Detection of genetic variation in wild populations of three Allium species using amplified fragment length polymorphisms. *Hortscience*, 43(3), 637-643.

Powell, W., Machray, G. C. and Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215-222.

R

Ramachandra Prasad, T. V., Krishnamurthy, K. and Kailasam, C. (1992) Functional Crop and Cob Growth Models of Maize (*Zea mays* L.) Cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 168(3), 208-212.

Randle, W. M. (1992) Sampling procedures to estimate flavor potential in onion. *Hortscience*, 27(10), 1116-1117.

Reiman, G. H. (1931) Genetic factors for pigmentation in the onion and their relation to disease resistance. *Journal of Agricultural Research*, 45(5), 251-278.

Richards, F. J. (1959) A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*, 10(29), 290-300.

Romero Del Castillo, R., Costell, E., Plans, M., Simó, J. and Casanas, F. (2012) A standardized method of preparing common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) for sensory analysis. *Journal of Sensory Studies*, 27(3), 188-195.

Romero del Castillo, R. R., Almirall, A., Valero, J. and Casanas, F. (2008) Protected Designation of Origin in beans (*Phaseolus vulgaris* L.): towards an objective approach based on sensory and agromorphological properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 1954-1962.

Romero Del Castillo, R. R., Valero, J., Casanas, F. and Costell, E. (2008) Training, validation and maintenance of a panel to evaluate the texture of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Sensory Studies*, 23(3), 303-319.

S

Sanchez, E., Sifres, A., Casanas, F. and Nuez, F. (2007) Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Catalonia, a Mesoamerican germplasm hotspot to be preserved. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82(4), 529-534.

· 130 ·
Santos, C. A. F., Oliveira, V. R., Rodrigues, M. A. and Ribeiro, H. L. C. (2010) Molecular characterization of onion cultivars using microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 45(1), 49-55.

Santos, C. A. F., Oliveira, V. R., Rodrigues, M. A., Ribeiro, H. L. C. and Silva, G. O. (2011) Genetic similarity among onion cultivars of different types and origins, based on AFLP markers. *Horticultura Brasileira*, 29(1), 32-37.

Schwimmer, S. and Guadagni, D. G. (1962) Relation Between Olfactory Threshold Concentration and Pyruvic Acid Content of Onion Juice. *Journal of Food Science*, 27(1), 94-97.

Schwimmer, S. and Weston, W. J. (1961) Onion Flavor and Odor, Enzymatic Development of Pyruvic Acid in Onion as a Measure of Pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9(4), 301-304.

Sedgley, R. H. (1991) An appraisal of the Donald ideotype after 21 years. *Field Crops Research*, 26(2), 93-112.

Simó, J., Romero del Castillo, R. and Casañas, F. (2012) Tools for breeding 'calçots' (*Allium cepa* L.), an expanding crop. *African Journal of Biotechnology*, 11(50), 11065-11073.

Simó, J., Pascual, L., Cañizares, J. and Casañas, F. (2013) Spanish onion landraces (*Allium cepa* L.) as sources of germplasm for breeding calçots: a morphological and molecular survey. *Euphytica* (in press).

Simoes, M. d. S., Rocha, J. V. and Lamparelli, R. A. C. (2005) Growth indices and productivity in sugarcane. *Scientia Agricola*, 62, 23-30.

Simon, P. W. (1995) Genetic analysis of pungency and soluble solids in long-storage onions. *Euphytica*, 82(1), 1-8.

T

Tanikawa, T., Takagi, M. and Ichii, M. (2002) Cultivar identification and genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71(2), 249-251.

Tei, F., Aikman, D. P. and Scaife, A. (1996) Growth of Lettuce, Onion and Red Beet. 2. Growth Modelling. *Annals of Botany*, 78(5), 645-652.

Tsukazaki, H., Honjo, M., Yamashita, K., Ohara, T., Kojima, A., Ohsawa, R. and Wako, T. (2010) Classification and identification of bunching onion (*Allium fistulosum*) varieties based on SSR markers. *Breeding Science*, 60(3), 293-293.

Tsutsui, K. (1991). *Inheritance of resistance to Fusarium oxysporum in onion*. MS Thesis. Univ. Wisconsin, Madison.

U

UNE 55125, *Clasificación de aceites refinados con ayuda de una escala* (1981). AENOR, Madrid.

UNE 55124, *Clasificación de aceites vírgenes de oliva, con ayuda de una escala* (1981). AENOR, Madrid.

UNE 87028-1, *Directrices para la preparación de legumbres para evaluar su textura* (1997). AENOR, Madrid.

V

van Heusden, A. W., Shigyo, M., Tashiro, Y., Vrielink-van Ginkel, R. and Kik, C. (2000) AFLP linkage group assignment to the chromosomes of *Allium cepa* L. via monosomic addition lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3), 480-486.

· 131 ·

van Heusden, A. W., van Ooijen, J. W., Vrielink-van Ginkel, R., Verbeek, W. H. J., Wietsma, W. A. and Kik, C. (2000) A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP (TM)) markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1), 118-126.

Vavilov, N. I. and Chester (Trad.), K. S. (1951) *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants*. Chronica Botanica Co. , New York, USA.

W

Wall, A. D. and Corgan, J. N. (1999) Heritability estimates and progeny testing of phenotypic selections for soluble solids content in dehydrator onion. *Euphytica*, 106(1), 7-13.

Wall, M. M. and Corgan, J. N. (1992) Relationship between Pyruvate Analysis and Flavor Perception for Onion Pungency Determination. *Hortscience*, 27(9), 1029-1030.

Wall, M. M., Mohammad, A. and Corgan, J. N. (1996) Heritability estimates and response to selection for the pungency and single center traits in onion. *Euphytica*, 87(2), 133-139.

Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 737-738.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.

Y

Yoo, K. S., Pike, L., Crosby, K., Jones, R. and Leskovar, D. (2006) Differences in onion pungency due to cultivars, growth environment, and bulb sizes. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 144-149.

Yoo, K. S. and Pike, L. M. (2001) Determination of background pyruvic acid concentrations in onions, *Allium* species, and other vegetables. *Scientia Horticulturae*, 89(4), 249-256.

Great... He cut himself. NOW
we're all gonna start crying...

