

## **Caracterização molecular citoplasmática em cebola nas cultivares Bola Precoce e Crioula.**

**Daniela Lopes Leite<sup>1</sup>; Denilson Anthonisen<sup>1</sup>; Carlos Antônio Fernandes Santos<sup>2</sup>; Valter Rodrigues Oliveira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Clima Temperado (C. P. 403, 96001-970, Pelotas, RS); <sup>2</sup>Embrapa Semi-Árido (C. P. 23, Petrolina, PE, 56302-970); <sup>3</sup>Embrapa Hortaliças (C. P. 218, 70359-970, Brasília, DF). e-mail: daniela@cpact.embrapa.br

### **RESUMO**

O uso da biotecnologia na agricultura vem crescendo nos últimos anos e tem sido importante como auxílio a programas de melhoramento genético de plantas. Uma das diversas aplicações de marcadores moleculares em cebola é a caracterização citoplasmática. A identificação de citoplasmas estéril e normal auxilia no desenvolvimento de cultivares híbridas, pela significativa redução do número de pareamentos individuais com plantas estéreis *testers*, para identificação de genótipos mantenedores e/ou acelerando o processo de incorporação de macho-estéreis em linhagens elite. Este estudo objetivou a caracterização molecular de citoplasmas das cultivares de cebola Bola Precoce (100 plantas) e Crioula (93 plantas), através de análise de genoma de mitocôndria pela técnica da reação da polimerase em cadeia. As cultivares Bola Precoce e Crioula apresentaram 51,0 e 43,0% das plantas com citoplasma normal, respectivamente. Nas plantas com citoplasma estéril, o tipo predominante foi o T, e somente foi possível identificar citoplasma estéril S em quatro plantas da cultivar Crioula.

**Palavras-chave:** *Allium cepa* L., macho-esterilidade, híbrido.

### **ABSTRACT - Onion molecular cytoplasm characterization in Bola Precoce and Crioula cultivars.**

The use of the biotechnology in agriculture is growing in the last years and has been important as an aid in plant breeding programs. One of the diverse applications of molecular markers in onion is the cytoplasm characterization. The identification of normal and sterile cytoplasms helps the development of hybrid cultivars, by the significant reduction of the number of individual pairings with sterile tester plants, for the identification of maintainers and/or speeding the process of incorporation of male-steriles in elite lines. The objective of this study was the molecular characterization of Bola Precoce and Crioula onion cultivars, through the analyses of mitochondria genome by polymerase chain reaction. The Bola Precoce (100 plants) and Crioula (93 plants) cultivars presented respectively 51,0 and 43,0% of the plants with normal cytoplasm. In the plants with sterile

cytoplasm the predominant type was the T. It was only possible to identify S sterile cytoplasm in four plants of Crioula cultivar.

**Keywords:** *Allium cepa* L., male-sterility, hybrid.

## INTRODUÇÃO

O ciclo de semente a semente em cebola requer dois anos, e para o estabelecimento de citoplasmas estéreis e normais por cruzamentos testes, são necessários de quatro a oito anos. Desta forma, a identificação molecular de citoplasmas representa um auxílio no desenvolvimento de cultivares híbridas, pois reduz significativamente o número de pareamentos individuais com plantas estéreis *testers* necessários para identificação de genótipos mantenedores e/ou acelera o processo de incorporação de macho-estéreis em linhagens elite (HAVEY, 1994).

Sato (1998) identificou citoplasmas normal (N) e estéril (S) de plantas individuais em uma população de polinização aberta de cebola usando reação em cadeia da polimerase, pela amplificação de um fragmento presente no DNA de mitocôndria de citoplasma N e ausente em citoplasma S. Descreveu a produção de fragmentos de 0,41 e 0,18 para citoplasmas S e N, respectivamente. Engelke et al. (2003) desenvolveram um conjunto de *primers* que distingue ambos os citoplasmas macho-estéreis (S e T) do citoplasma normal. Esta identificação é possível através da combinação dos resultados obtidos das bandas produzidas pelos *primers* de Engelke et al. (2003) com os resultados obtidos com os *primers* descritos por Sato (1998).

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de citoplasmas de plantas de cultivares elites de polinização aberta como meio de reduzir o tempo necessário para identificação de plantas mantenedoras da macho-esterilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os marcadores moleculares para citoplasma macho-estéril descritos por Sato (1998) e Engelke et al. (2003) nas cultivares Bola Precoce (100 plantas) e Crioula (93 plantas) de cebola. As amostras (110 a 140mg) utilizadas para análise foram de folhas jovens, obtidas a partir de brotações de bulbos plantados em campo. Os procedimentos usados para extração do DNA foram os descritos por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Todas as amostras de DNA foram testadas em duas reações: 1) com os *primers* de Engelke et al. (2003) e 2) com os *primers* de Sato (1998). O preparo das reações de amplificação de DNA com os *primers* de Engelke et al. (2003) seguiram o protocolo deste autor, utilizando-se Taq polimerase marca Gibco. O preparo das reações de amplificação com os *primers* de Sato (1998) seguiram o protocolo de Szklarczyk et al. (2002) com modificações, em que para um volume total de 15 µl, cada reação continha: 10 mM Tris

HCl pH 8,8; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 0,05% BSA; 0,25 µM de cada *primer*; 10 ng de DNA genômico e 0,5 U de Taq polimerase marca Gibco e cobertas com uma gota de óleo mineral.

Com ambos os *primers* foi utilizado o protocolo de Szklarczyk et al. (2002) para as amplificações de DNA realizadas em um termociclador (RoboCycler 96 Temperature Cycler – Stratagene). Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (Gibco), submerso, na concentração de 1,5%, com uma diferença de potencial de 80 v.cm<sup>-1</sup> por um período médio de três horas e trinta minutos, corados com brometo de etídeo, deixados para migrar por 8 cm, e fotografados sob luz ultravioleta. As cultivares foram genotipadas através dos produtos visualizados em gel.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi possível caracterizar as 193 plantas com os *primers* de Engelke et al. (2003) e 132 plantas com os *primers* de Sato (1998). Para cada planta analisada houve concordância nos resultados obtidos com ambos marcadores (Tabela 1).

Com a utilização dos *primers* de Sato (1998), foi observada uma banda fraca de 0,18 kb nas plantas classificadas com citoplasma S, em adição ao fragmento de 0,41 kb. Os resultados do surgimento de bandas adicionais concordam com os resultados obtidos por Szklarczyk et al. (2002) e Engelke et al. (2003).

As cultivares Bola Precoce e Crioula apresentaram respectivamente 51,0 e 43,0% das plantas com citoplasma normal. Nas demais plantas, o citoplasma foi estéril e o tipo predominante foi o T. O citoplasma estéril S somente foi observado em quatro plantas da cultivar Crioula (4,3%) (Tabela 1). Estes dados concordam com os obtidos por Leite e Anthonisen (2004) que ao caracterizarem o citoplasma de 45 plantas da cultivar Crioula, identificaram apenas duas plantas com citoplasma estéril S. O sistema de macho-esterilidade gênica-citoplasmática (CMS) baseado no citoplasma S vem sendo utilizado há muito tempo. Porém, dados de CMS com citoplasma T são raros, pois até 2003 não era possível distinguir o citoplasma T do citoplasma N por métodos moleculares.

Ambas as cultivares testadas, Bola Precoce e Crioula, apresentaram plantas com citoplasma indutor da macho-fertilidade, com isto, têm potencial de serem utilizadas como mantenedoras da macho-esterilidade na produção de sementes híbridas.

### **LITERATURA CITADA**

ENGELKE, T.; TEREFE, D.; TATLIOGLU, T.A. PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 107, p. 162-167, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. pp. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).

HAVEY, M.J.; BARK, O.H. Molecular confirmation that sterile cytoplasm has been introduced into open-pollinated Grano onion cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount Vernon, v. 119, p. 90-93, 1994.

LEITE, D.L.; ANTHONISEN, D. Marcadores moleculares na caracterização citoplasmática em cebola como auxílio ao melhoramento genético. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 14p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 11).

SATO, Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 96, p. 367-370, 1998.

SZKLARCZYK, M.; SIMLAT, M.; JAGOSZ, B.; BA, G. The use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Wroclaw, v. 7, p. 625-634, 2002.

**Tabela 1.** Citoplasmas de cebola das cultivares Bola Precoce e Crioula. Pelotas, RS, Embrapa Clima Temperado, 2005.

Padrão ou cultivar	Nº de plantas	Marcadores citoplasmáticos [pb] <sup>a</sup>			Citoplasma <sup>b</sup>
		B 473(450±20)	A 414(440±20) e	180(180±10)	
Citoplasma estéril	-	1	-	-	Estéril
Citoplasma S	-	1	1	0 ou 1	Estéril (S)
Citoplasma T	-	1	0	1	Estéril (T)
Citoplasma N	-	0	-	-	Normal (N)
Citoplasma N	-	0	0	1	N
'Bola Precoce'	23	0	-	-	N
	28	0	0	1	N
	16	1	-	-	Estéril
	33	1	0	1	T
'Crioula'	9	0	-	-	N
	31	0	0	1	N
	13	1	-	-	Estéril
	36	1	0	1	T
	02	1	1	0	S
	02	1	1	1	S
Total	193				

<sup>a</sup> somente foram consideradas bandas fortes e reproduzíveis; <sup>b</sup> citoplasmas determinados pela presença (1) ou ausência (0) de bandas dos marcadores de A (SATO, 1998) e/ou B (ENGELKE et al., 2003) segundo amplificação de Szklarczyk et al. (2002).