

## **Identificação do citoplasma de cebola “S” via PCR numa população experimental de cebola cascuda-bronzeada.**

**Roberta Sâmara N. Lima<sup>1</sup>; Carlos Antonio F. Santos<sup>1</sup>; Ierla Carla N. dos Santos<sup>1</sup>; Marciane Amorim Rodrigues<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Embrapa Semi-Árido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br;

### **RESUMO**

A identificação do tipo de citoplasma estéril em cebola foi tremendamente facilitada com a publicação de primers que possibilitam a identificação do tipo de citoplasma. O objetivo do presente trabalho foi a identificação do tipo de citoplasma presente numa população experimental de cebola cascuda-bronzeada de forma a orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola para o nordeste do Brasil. O DNA genômico total foi isolado de plantas de cebola segundo protocolo CTAB 2x. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 0,25 µM de cada primer, 150 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 unidades da enzima DNA polimerase da Biometrix na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 1,4 µL do DNA total, não quantificado. As seqüências dos primers foram: primer S: GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT; primer N: TCTAGATGTCGCATCAGTGAATCC; primer comum: CTTTTCTATGGTGACAACCTCCTT e primers do Engelke ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC e CCAAGCATTGGCGCTGAC. Na amostra de 44 plantas da observou-se a amplificação de produtos consistentes com os fragmentos de 180 e 414 pb dos primers do N + Comum e S + Comum, respectivamente, bem como a amplificação de fragmento de 473 pb dos primers do Engelke, indicando que o citoplasma presente na população é o citoplasma S. Não foi identificada a presença de CMS-(N) em nenhuma das plantas avaliadas. Estes resultados sugerem que os bulbos que originaram a população possivelmente eram todos estéreis e que a introdução de citoplasma N deverá ser feito de outra população.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, PCR, híbrido.

### **ABSTRACT- Identification of cytoplasm S in an experimental Valenciana type onion population.**

The identification of the sterile cytoplasm type was facilitated by the development of primers specific to onion cytoplasm type. The goal of this work was the identification of the cytoplasm type in an experimental Valenciana type onion in order to facilitate the development of onion hybrids to the Northeast Brazil. Total genomic DNA was extracted according to the CTAB 2x protocol. The PCR reaction was done to a final volume of 25 µL

(0,25  $\mu$ M of each primer, 150  $\mu$ M of each dNTP, 1,5 mM of  $MgCl_2$ , 0,2 units of DNA polymerase in reaction buffer recommended by the supplier and 1,4  $\mu$ L of not quantified total DNA). The primers sequences were: primer S: GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT; primer N: TCTAGATGTCGCATCAGTGGAAATCC; primer common: CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT and Engelke primers ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC e CCAAGCATTGGCGCTGAC. In the sample of 44 plants was observed the amplification of consistent fragments with the 180 and 414 bp of N + C and S + common primers and presence of a fragment of 473 bp of Engelke primers, indicating that the cytoplasm of the population is the "S". It is not identified any plant with cytoplasm N. These results suggest that the bulbs that originated the population probably did not have the N cytoplasm and there is the necessity to introduce it from another population.

Keywords: *Allium cepa*, PCR, hybrids.

## INTRODUÇÃO

O sistema citoplasma macho-estéril (CMS) é a base para a produção de híbridos de cebola. Em adição ao citoplasma N macho-fértil, três outros têm sido identificados em cebola: a) S – identificado na população *Italian Red*; b) C – identificado na população *Rijnsburger*, e c) T – identificado na população *Jaune paille des vertus* ( Szklarczyk et al., 2002). A fertilidade é restaurada por um alelo dominante (Ms) no sistema CMS-(S) e por três loci que segregam independentemente no sistema CMS-(T) (Havey, 1995). Para Engelke et al. (2003), apenas os sistemas CMS-(S) e o CMS-(T) são usados para a produção comercial de híbridos.

A identificação de diferentes tipos de citoplasmas foi facilitada com a aplicação de marcadores de DNA em reações de Polymerase Chain Reaction (PCR): 1) os primers desenvolvidos por Sato (1998) levam em consideração reordenações na proximidade com o gene mitocondrial *cob* e 2) os primers desenvolvidos por Engelke et al. (2003) consideram quiméricas mitocôndrias CMS específicas de cebolinha (*Allium schoenoprasum*).

O objetivo do presente trabalho foi a identificação do tipo de citoplasma presente numa população experimental de cascuda-bronzeada, em desenvolvimento na Embrapa Semi-Árido, de forma orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola para o nordeste do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

DNA genômico total foi isolado de folhas de cebola, segundo protocolo CTAB 2x: em torno de 0,2 g de folhas, mantidas a -80 °C, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido em almofariz de porcelana, tratados previamente em ácido clorídrico 3 N. O pó foi transferido para uma solução extratora de 0,9 mL de CTAB 2% (500 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, CTAB 2% (p/v), 0,2 % beta-mercaptoethanol, 20 mM de EDTA) e incubado a 65 °C por 50 minutos. Após os demais procedimentos, o “pellet” de DNA total foi colocado para secar a temperatura ambiente e 120 mL de tampão TE foi adicionado. A integridade do DNA total foi observada em gel de agarose 1,5 %, sendo estocada a -20 °C.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 0,25 µM de cada primer, 150 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 unidades da enzima DNA polimerase da Biometrix na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 1,4 µL do DNA total (não quantificado). As seqüências dos primers publicados por Sato (1998) foram: primer S: GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT; primer N: TCTAGATGTGCGCATCAGTGGAAATCC e primer comum: CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT. Para os primers publicados por Engelke et al. (2003), as seqüências foram: primer 1: ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC e primer 2: CCAAGCATTGGCGCTGAC. As reações foram incubadas em termociclador, segundo o protocolo de Engelke et al. (2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de identificação dos tipos CMS-(N), CMS-(S) e CMS-(T) envolvem PCR com os primers do Engelke et al. (2003) e do Sato (1998): 1) CMS-(N) – presença do fragmento de 180 pb do primer do Sato e ausência dos demais fragmentos; 2) CMS-(S) – presença dos fragmentos de 180 e 414 do Sato e de 473 do Engelke; e 3) CMS-(T) – presença dos fragmentos de 180 pb do Sato e de 473 pb do Engelke e ausência do fragmento de 414 do Sato.

Na amostra de 44 plantas da população experimental da cebola cascuda-bronzeada observou-se a amplificação de produtos consistentes com os fragmentos de 180 e 414 pb dos primers do Sato, bem como a amplificação de fragmento de 473 pb dos primers do Engelke (Fig. 1), indicando que o citoplasma presente na população é o citoplasma S. Não foi identificada a presença de CMS-(N).

Estes resultados sugerem que os bulbos que originaram a população possivelmente eram todos estéreis e que a introdução de citoplasma N deverá ser feito de outra população.

## 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*, v. 107, p.162–167, 2003.
- HAVEY, M.J. Identification of cytoplasm using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theoretical and Applied Genetics*, v.90, p. 263-268, 1995.
- SZKLARCZYK, M; SIMLAT, M; JAGOSZ, B.; BA, G. The use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding. *Cellular & Molecular Biology Letters*, v 7, p.625-634, 2002.
- SATO, Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.96, p.367-370, 1998.

## AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do BNB-Etene-Fundeci.

Ângela Katiussia Nascimento dos Santos Coelho pelo trabalho nas reações de PCR.

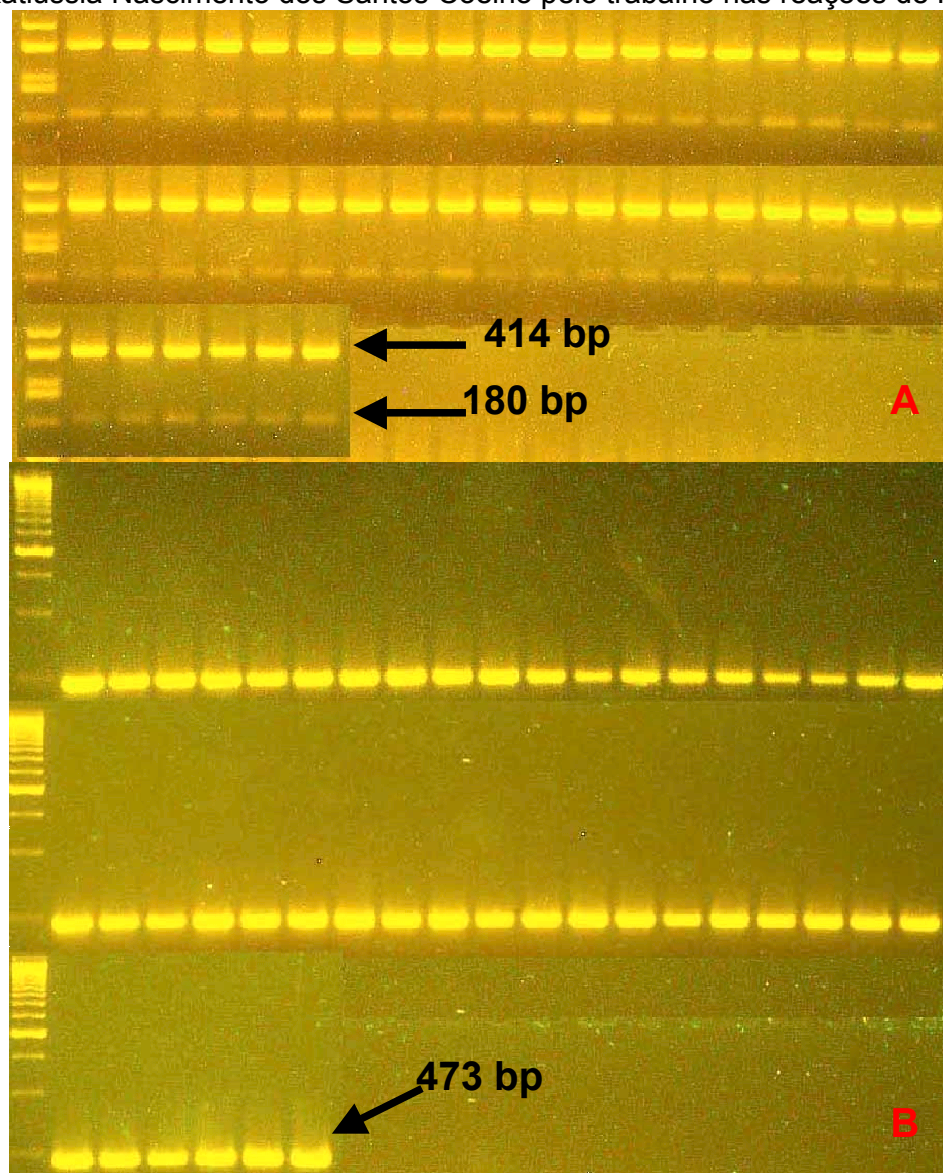


Figura 1. Fragmentos de 44 amostras de cebola amplificados com os primers N + S + Comum (A) publicados por Sato (1998) e primers publicados por Engelke (2003) (painel B). A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Amresco DNA MicroMarker (painéis A, B e C) e padrão de 500 da Invitrogen (painel D). Petrolina, PE, 2006.