

Caracterização Molecular de Populações Crioulas de Cebola Utilizando Marcadores RAPD

Taiane Peres Viana¹, Daniela Lopes Leite², Natércia Lobato Pinheiro³

Resumo

A caracterização da variabilidade genética é um dos mais importantes parâmetros que deve ser estimado para sua utilização no melhoramento de plantas. A cebola apresenta ampla variabilidade genética, devido a sua natureza predominantemente alógama e seu histórico de cultivo e domesticação, que resultou em populações selecionadas pelo clima e preferências culinárias regionais. Para caracterizar populações, marcadores moleculares podem ser utilizados eficientemente, permitindo a identificação das diferenças entre os genótipos (polimorfismo) em nível de DNA, minimizando a interferência ambiental e aumentando a confiabilidade na distinção dos mesmos. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular utilizando a técnica de RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) de cinco acessos de cebola do grupo Crioula, incluindo cultivares locais e comerciais, do Banco Ativo de Germoplasma de Cebola da Embrapa Clima Temperado. Para avaliar a diversidade genética interpopulacional e intrapopulacional foram utilizados 8 iniciadores em DNAs provenientes de um total de 100 plantas individuais oriundas das cultivares Caeté, Crioula Roxa, Crioula Salto Grande, Crioula SC e Roxa SC. As plantas foram genotipadas através dos produtos visualizados em gel de agarose 1,5% e uma matriz de presença/ausência de bandas foi utilizada nas análises de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) e de agrupamento pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Os 8 iniciadores geraram 301 (100%) bandas polimórficas. O número de fragmentos por iniciador variou de 115 (OPA1) até 8 (OPA10) com uma média de 38 bandas por iniciador. Como resultado a técnica de RAPD mostrou eficiência na caracterização molecular, permitindo o agrupamento de indivíduos de mesma população, assim como demonstrando a heterogeneidade intrapopulacional existente, apresentando potencial para serem exploradas em programas de melhoramento no desenvolvimento de novas cultivares.

Introdução

A cebola pertence à família *Alliaceae* e é classificada botanicamente como *Allium cepa* L. (Hanelt, 1990), é uma espécie diplóide $2n=2x=16$, com número básico de cromossomos $x=8$. Estudos indicam que a cebola apresenta ampla variabilidade genética, resultado de sua natureza predominantemente alógama e seu histórico de cultivo e domesticação. A cebola cultivada evoluiu a partir de genitores silvestres que ocorriam nas regiões montanhosas da Ásia Central há aproximadamente 5 mil anos. Em seguida, as sementes e bulbos de cebola devem ter se espalhado através de viagens e comércio e lentamente tornou-se adaptada a cada região para a qual foi levada. Notável neste processo foram as viagens dos exploradores europeus, os primeiros a levarem a cebola para a América, parte da costa oeste da África e Extremo Oriente (Brewster, 1994).

No Brasil, o marco inicial do cultivo de cebola é atribuído aos imigrantes açorianos que colonizaram as regiões de Rio Grande e Pelotas, localizadas no Rio Grande do sul, no século XVIII (Fontoura, 1994). As variedades introduzidas por esses colonizadores estiveram expostas à ação da seleção natural e humana, constituindo populações distintas, adaptadas às condições locais do ambiente. Assim a difusão do germoplasma de cebola resultou na sua adaptação segundo as regiões de cultivo, originando populações locais ou crioulas. Em resposta aos diversos climas e preferências culinárias do mundo, uma grande variação de cultivares locais e melhoradas desenvolveram-se ao longo dos séculos (Leite, 2007). Esses fatores garantiram a formação de um valioso banco de genes desta espécie no Sul do Brasil (Barbieri et al., 2005), germoplasma este que vem sendo utilizado por muitos programas de melhoramento de cebola no país.

Para o melhoramento de plantas a quantificação e conservação da dissimilaridade genética é um dos mais importantes parâmetros que devem ser estimados, principalmente quando o objetivo for a obtenção de segregantes transgressivos e populações de ampla variabilidade genética (Benin, et al., 2003). Para isso marcadores moleculares podem ser utilizados, pois proporcionam aumento na eficiência de seleção, melhor caracterização do germoplasma, permitindo a identificação das diferenças entre os materiais (polimorfismo) em nível de DNA, minimizando a interferência ambiental e aumentando a confiabilidade na distinção dos acessos (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

Em estudos genéticos em cebola, e dentro do gênero *Allium*, Wilkie et al. (1993) quando acessaram o grau de polimorfismo, demonstraram a aplicabilidade de marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). Esta técnica tem oferecido melhor resolução em estudos de diversidade genética devido ao número ilimitado de marcadores que utilizam (Klaas and Friesen, 2002).

1 Estudante de agronomia, FAEM- UFPEL; Estagiária da Embrapa Clima Temperado; C. Postal 403, 96001-970 Pelotas-RS; taipv_@hotmail.com.br

2 Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Clima Temperado, C. Postal 403, 96001-970 Pelotas-RS; daniela@cpact.embrapa.br

3 Analista Embrapa Clima Temperado; C. Postal 403, 96001-970 Pelotas-RS; natercia.lobato@cpact.embrapa.br

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de cinco populações de cebola do grupo Crioula, utilizando a técnica de RAPD, de maneira a estimar a variabilidade genética interpopulacional e intrapopulacional, obtida pela estimativa da similaridade genética.

Material e métodos

Foram analisadas 100 plantas individuais de acessos integrantes do Banco Ativo de Germoplasma de Cebola da Embrapa Clima Temperado, incluindo cultivares comerciais (Caeté e Crioula Salto Grande) e locais (Crioula Roxa, Crioula SC e Roxa SC). Os procedimentos usados na extração de DNA (folhas jovens de 20 plantas de cada acesso) e amplificação utilizando a técnica de RAPD foram os descritos por Ferreira and Grattapaglia (1998) com algumas modificações: cada reação foi realizada em um volume final de 12,5 •l, contendo o kit comercial da Promega GoTaq® Green Master Mix (6,25•l), água ultra pura autoclavada (5•l), iniciador (1,3•l na concentração de 10 mM) e DNA genômico (20 •g).

As amplificações foram realizadas em placas para PCR utilizando um termociclador programado para 40 ciclos repetidos nas seguintes condições: um minuto a 92°C (desnaturação), um minuto a 35°C (anelamento) e dois minutos a 72°C (extensão). Após, foi efetuada uma etapa final de extensão de cinco minutos a 72°C.

Foram usados 8 iniciadores (OPA1, OPA10, OPA19, OPC10, OPC11, OPI1, OPI2 e OPY19). Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel submerso de agarose a 1,5%, onde migraram sob diferença de potencial por um período médio de três horas e trinta minutos. Foram corados com brometo de etídio (50 •g por gel de 100 mL), e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm).

As cultivares foram genotipadas pela visualização dos fragmentos em gel de agarose, pela estimativa do tamanho em pares de bases (pb), comparando-se o tamanho dos fragmentos amplificados com o padrão 1 Kb plus, avaliado no programa BIO 1 D. Desta análise foi formada uma matriz, na qual foram anotados presença (1) e ausência (0), servindo de base para a análise de similaridade genética, com o uso do coeficiente de Jaccard. A partir da matriz de similaridade, as populações foram agrupadas pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA). A consistência do dendrograma formado foi avaliada pelos métodos de *bootstrap* (considerando 1000 reamostragens) e coeficiente de correlação cofenética. A fidelidade entre o dendrograma gerado e a matriz de similaridades que lhe deu origem foi avaliada pelo teste de Mantel (1967).

Resultados e Discussão

Os oito iniciadores utilizados geraram 301 bandas polimórficas (100%), sendo que o número de fragmentos por iniciador variou de 115 (OPA1) até 8 (OPC10) com uma média de 38 bandas por iniciador. Porcentagem semelhante de polimorfismo de bandas (86,4%) foi obtida por Leite and Anthonisen (2009) com a caracterização de cultivares de cebola pelo técnica de RAPD, também com a utilização de iniciadores da Operon Technologies.

Todos os iniciadores foram polimórficos interespecificamente e intraespecificamente. Em um estudo de diversidade genética entre quatro espécies do gênero *Allium* e de sete cultivares de cebola Wilkie *et al.* (1993) ao testarem 20 iniciadores RAPD, obtiveram nas análises interespecíficas quase todos os iniciadores polimórficos, com grandes variações nos padrões de bandas, enquanto na intraespecífica sete iniciadores apresentaram polimorfismo.

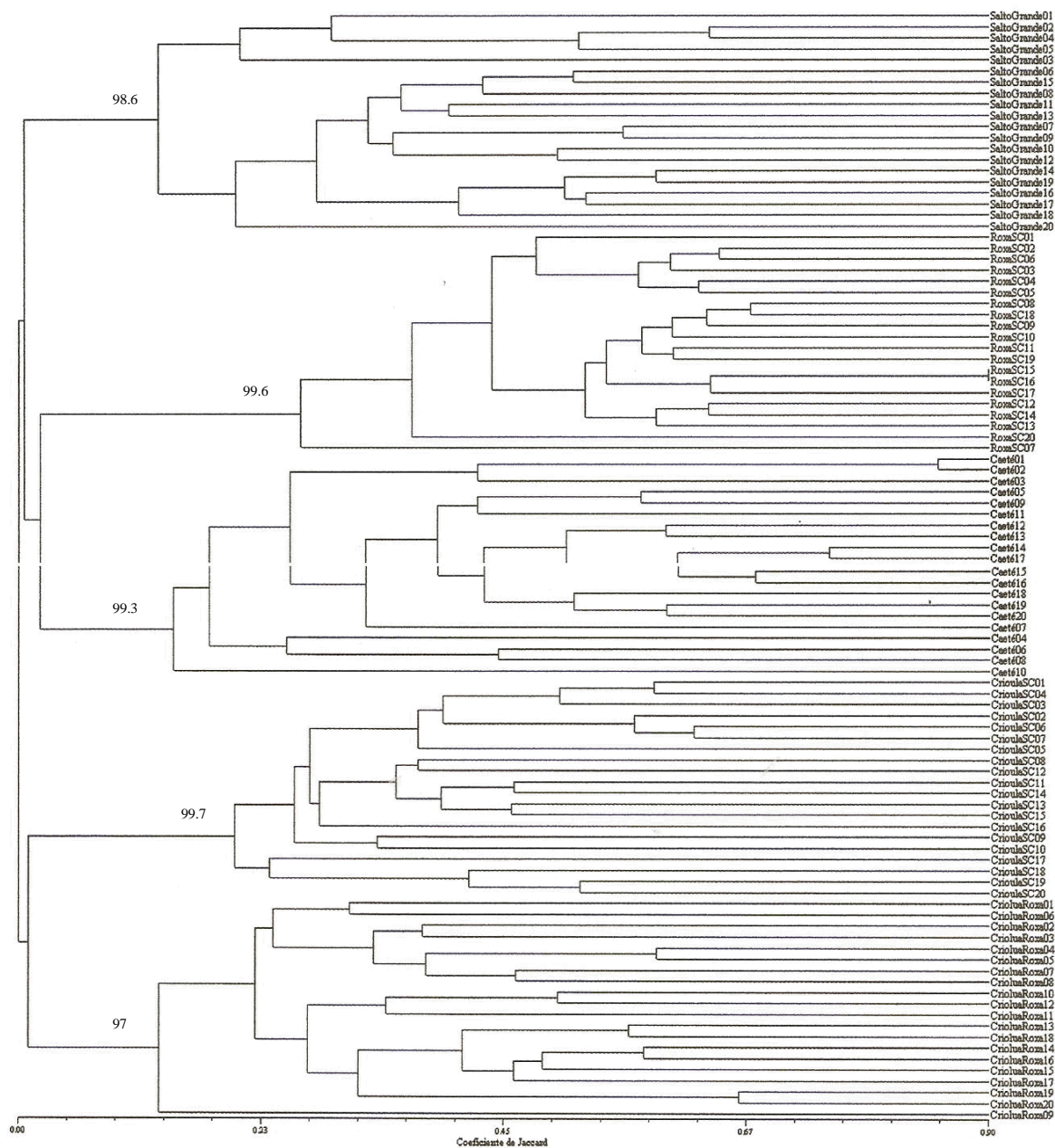


Figura 1. Agrupamento (UPGMA) de 100 genótipos de cebola com base na similaridade genética (coeficiente de Jaccard). Os valores de *bootstrap* (%) estão indicados nos nós correspondentes de cada agrupamento. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2011.

Considerando como o ponto para corte a similaridade média entre os genótipos, a análise de agrupamento permitiu a formação de cinco grupos unindo somente indivíduos de mesma população no mesmo grupo (Figura 1). Estes cinco agrupamentos formados pelo método de UPGMA foram sustentados por valores 99,3%, 97%, 99,7%, 99,6% e 98,6% em cada nó (Figura1) de replicações similares para as 1.000 permutações conduzidas pelos *bootstraps* e por valores correspondentes de quando da análise do coeficiente de correlação cofenética, valores considerados relativamente altos. Observando-se além do ponto de corte ocorre formação de dois grandes grupos, onde no primeiro estão presentes a cultivar comercial Crioula Salto Grande as populações Crioula Roxa, e a Crioula SC. Em um segundo grupo estão presentes a cultivar comercial Caeté juntamente com as populações Roxa SC e Crioula Roxa. Cabe destacar que o coeficiente de correlação de Mantel foi de 0,96, indicando concordância satisfatória entre a matriz de dados e o agrupamento.

O Grupo 'Crioula', ao qual pertencem as cultivares analisadas, é uma das três principais populações de base das cultivares brasileiras (Oliveira et al., 2004), responsável pelo desenvolvimento da cultura da cebola no estado de Santa Catarina.

Provavelmente devido ao isolamento geográfico não ocorreu agrupamento de populações no ponto de similaridade média, indicando a conservação da diversidade genética destas populações.

Constatou-se divergência genética tanto entre cultivares como dentro de uma mesma população de cebola recomendada para a Região Sul do Brasil em estudo, o que confirma o potencial de serem exploradas em trabalhos de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos superiores (Oliveira *et al.*, 2004).

Referências

Barbieri RL, Leite DL, Choer E and Sinigaglia C (2005) Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. **Ciência Rural** **35**: 303-308.

Benin G, Carvalho FIF de, Oliveira AC de, Marchioro VS, Lorencetti C, Kuek AJ, Silva JAG, Cruz PJ, Hartwing I and Schmidt DAM (2003) Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatística multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural** **33**: 657-662.

Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** (ed.) Editora:Embrapa - Cenargen, Brasília, 220p.

Fontoura LFM (1994) **As relações de produção e a produção do espaço agrário em São José do Norte.** Dissertação Mestrado em Sociologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 126p

Hanelt P (1990) Taxonomy, evolution and history. In: Rabinowitch HD, Brewster JL (ed.) **Onion and allied crops.** Press: CRC, Boca Raton, p.1-26.

Klaas M and Friesen N (2002) Molecular markers in *Allium* In: Rabinowitch HD, Currah L (ed.) **Allium crop science: recent advances.** Press: CABI, New York p.159-185

Leite DL (2007) Melhoramento genético de cebola. In: Barbieri RL (ed.). **Cebola: ciência, arte e história.** (2 ed) Editora: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p.79-113.

Leite DL and Anthonisen D (2009) Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores RAPD. **Horticultura Brasileira** **27**: 420-424.

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

Oliveira VR, Leite DL, Santos CAF, Costa ND and Melo PCT (2004) **Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.).** Brasília: Embrapa Hortaliças. Versão eletrônica. (Embrapa Hortaliças. Sistemas de Produção, 5). Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/cultivares.htm>. Acessado em 08 de maio de 2011.

Wilkie SE, Isaac PG and Slater RJ (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theoretical and Applied Genetics** **86**: 497-504.