

Identificação Citoplasmática Através de Marcadores Moleculares em Acessos de Cebola

Cytoplasmic Identification by Molecular Markers in Onion Accessions

Jucieny Ferreira de Sá¹; Carlos Antonio Fernandes Santos²; Renata Natália Cândido de Souza Gama³; Rejanildo Robson Candido de Souza¹; Washington Carvalho Pacheco Coelho⁴

Resumo

A identificação de diferentes tipos de citoplasma associados a macho-esterilidade foi facilitada com a aplicação de marcadores de DNA em reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), auxiliando no desenvolvimento de cultivares híbridas de cebola *Allium cepa* L. (LILIACEAE). A produção de sementes híbridas tem sido conduzida com o emprego de dois sistemas de macho-esterilidade (CMS-S e CMS-T) em associação ao sistema macho-fértil (CMS-N). A combinação dos marcadores *5'cob* e *orfa501A* pode distinguir os três tipos de citoplasma. O objetivo deste trabalho foi identificar, por meio de marcadores moleculares, o tipo de citoplasma presente em acessos de cebola, que vêm sendo estudados na Embrapa Semiárido de forma a orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola. Entre os 30 acessos analisados, observou-se a presença dos três tipos de citoplasma ('S', 'N' e 'T'). Doze acessos apresentaram tipo

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade Pernambuco (UPE), bolsista Píbic CNPq/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Melhoramento Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos-fernandes.santos@embrapa.br.

³Bióloga, doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs), Feira de Santana, BA.

⁴Biólogo, bolsista CNPq/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

de citoplasma exclusivamente 'N', sete foram exclusivamente 'S' e apenas dois exclusivamente 'T'. Sete acessos apresentaram mistura entre os tipos de citoplasma 'N' e 'T', dois entre 'N' e 'S' e dois entre 'S' e 'T'. Estes resultados auxiliarão na escolha de genitores em programas de melhoramento de cebola objetivando o desenvolvimento de híbridos.

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

Introdução

A cebola *Allium cepa* L. (LILIACEAE) tem grande importância econômica para o Brasil, onde foi produzido 1,32 milhão de toneladas em 2013 (AGRIANUAL, 2014). A produtividade de híbridos de cebola tem sido de até 192% a mais em relação ao parental mais produtivo e de até 367% em relação a algumas cultivares de polinização aberta (DOWKER, 1990).

O sistema citoplasma macho-estéril (CMS) é a base para a produção de híbridos de cebola, que requer a identificação de linhagens macho-estéreis, linhagens mantenedoras da macho-esterilidade e de linhagens polinizadoras com boa capacidade de combinação (SANTOS et al., 2008). Linhagens macho-estéreis (*Smsms*) podem ser mantidas por sementes quando cruzadas com uma linhagem mantenedora, a qual possui citoplasma normal ('N') para macho-fertilidade e genótipo *msms* para o loco restaurador da fertilidade no sistema CMS-(S) (SANTOS et al., 2008). Além do citoplasma 'N' macho-fértil, dois outros foram identificados em cebola: a) C – identificado na população *Rijinsburger*, e b) T- identificado na população *Jaunepaille dès 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). Apenas os sistemas CMS-(S) e o CMS-(T) são usados para a produção comercial de híbridos (ENGELKE et al., 2003).

A identificação de diferentes tipos de citoplasma associados a macho-esterilidade 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 a reordenações na proximidade com o gene mitocondrial *cobe*; 2) os *primers* desenvolvidos por Engelke et al. (2003) consideram quiméricas mitocôndriais CMS específicas de cebolinha (*Allium schoenoprasum*).

O objetivo deste trabalho foi identificar, por meio de marcadores moleculares, o tipo de citoplasma presente em acessos de cebola, de forma a orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola em programas de melhoramento em andamento na Embrapa Semiárido.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras foliares jovens de 30 acessos de cebola, da coleção de trabalho da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE (Tabela 1). A extração de DNA destes acessos foi realizada utilizando-se o protocolo CTAB 2x (DOYLE; DOYLE, 1990) com algumas modificações: 7.500 rpm e 10.000 rpm, na primeira e segunda centrifugação, β -mercaptoethanol 2% e incubação a 60 °C por 30 minutos. O DNA foi ressuspendido em tampão Tris-EDTA e foram tratadas com RNase. A integridade do DNA total, após tratamento com RNase, foi observada em gel de agarose 0,8%.

As reações de PCR foram realizadas conforme metodologia de Engelke et al. (2003), com modificações para um volume final de 20 μ L: 0,25 μ M de cada *primer*, 150 mM de cada dNTP, 1X de tampão de PCR, 2,0 mM de $MgCl_2$, 2,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA total. Os *primers* usados para a identificação dos citoplasmas foram os desenvolvidos por Sato (1998), que amplificam os fragmentos de 180 pb e 414 pb, e os desenvolvidos por Engelke et al. (2003), que amplificam fragmento de 473 pb.

A programação do termociclador para as amplificações com os marcadores 5' *cob* consistiu de: a) um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, b) 36 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 53 °C e 2 minutos a 72 °C, e c) um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Para os marcadores *orf501A* adotou-se: a) um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, b) 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 54 °C, 2 minutos a 72 °C, e c) um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%.

A identificação de citoplasmas N, S e T baseou-se na metodologia de Engelke et al. (2003): 1) citoplasma N – presença do fragmento de 180 pb e ausência dos demais fragmentos; 2) citoplasma S – presença dos fragmentos de 180 pb, 414 pb e 473 pb; e 3) citoplasma T – presença dos fragmentos de 180 pb e de 473 pb e ausência do fragmento de 414 pb.

Tabela 1. Número de plantas e tipo de citoplasma de acessos de cebola *Allium cepa* L. (LILIACEAE) analisados com marcadores moleculares de DNA específicos para os tipos estéril 'S', normal 'N' e estéril 'T'.

| Acesso | Número de plantas analisadas | Tipo de citoplasma | | |
|--------------------|------------------------------|--------------------|-----|-----|
| | | 'S' | 'N' | 'T' |
| 30 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 30 A CNPH | 5 | 5 | | |
| 39 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 39 A CNPH | 5 | 4 | 1 | |
| 81 A CNPH | 5 | 5 | | |
| 81 B CNPH | 4 | | 2 | 2 |
| 80 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 80 A CNPH | 5 | | 1 | 4 |
| 65 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 65 A CNPH | 5 | | 1 | 4 |
| 78 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 78 A CNPH | 5 | | 1 | 4 |
| 6109 B CNPH | 5 | | 4 | 1 |
| 55 A CNPH | 5 | | | 5 |
| 55 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 54 B CNPH | 5 | | 5 | |
| 54 A CNPH | 4 | 4 | | |
| IPA 10 | 5 | | 2 | 3 |
| IPA 11 | 5 | | 5 | |
| IPA 12 | 5 | 5 | | |
| T6 13 CR 15 | 4 | 4 | | |
| T8 11 CR 13 A | 5 | 5 | | |
| T 11 Botucatu | 4 | | 4 | |
| 25 CA 10 | 4 | 4 | | |
| 17 CAI 1 | 5 | 3 | 2 | |
| T 11 Botucatu B | 5 | | 5 | |
| Cascuda amarela SI | 5 | | 5 | |
| 44 B CNPH | 4 | | 4 | |
| 6268 A CNPH | 4 | 1 | | 3 |
| T8 11 CR 13 | 5 | 3 | | 2 |

Resultados e Discussão

Foram necessárias apenas duas reações de PCR para a correta identificação do citoplasma 'S', 'N' ou 'T': uma com os *primers* 'N' + 'S' + Comum (SATO, 1998) e outra com os *primers* publicados por Engelke et al. (2003). Nos géis de agarose foi possível verificar a presença dos fragmentos de 180 pb, 414 pb e 473 pb e não foram observadas amplificações indesejadas. Estes resultados indicam que a metodologia utilizada é adequada para amplificar a pequena quantidade do DNA mitocondrial, onde a mutação para a macho-esterilidade citoplasmática é encontrada. Este resultado corrobora com os apresentados por Engelke et al. (2003) e Santos et al. (2008).

Os acessos 30 B CNPH, 39 B CNPH, 80 B CNPH, 65 B CNPH, 78 B CNPH, 55 B CNPH, 54 B CNPH, IPA 11, T11 Botucatu, T11 Botucatu B, Cascuda amarela SI e 44 B CNPH apresentaram 100% das plantas com citoplasma N (Tabela 1). Estes são macho-férteis e podem ser utilizados como linhagens mantenedoras.

Os acessos 30 A CNPH, 81 A CNPH, 54 A CNPH, IPA 12, T6 13 CR 15, T8 11 CR 13 A e 17 CAI 1 apresentaram 100% das plantas analisadas com citoplasma 'S'. Os acessos 55 A CNPH e Alfa São Francisco apresentaram 100% das plantas com citoplasma 'T' (Tabela 1). Segundo Santos et al. (2008) dados de CMS com citoplasma 'T' são raros, pois até 2003 não era possível distinguir o citoplasma 'T' do citoplasma 'N' por métodos moleculares. Os demais acessos apresentaram mistura de citoplasma 'N' e 'T', 'S' e 'N' ou 'S' e 'T' (Tabela 1).

Os pares dos acessos 30 B CNPH e 30 A CNPH, 55 A CNPq e 55 B CNPQ, e 54 B CNPH e 54 A CNPH são boas opções para o desenvolvimento de híbridos, pois não apresentaram misturas nas linhas 'A' e 'B', tendo sido estudadas previamente na Embrapa Hortaliças (Tabela 1). A cultivar IPA 10 e a população 17 CAI 10, por apresentarem plantas de diferentes citoplasmas, são potenciais para a identificação de linhas 'A' e 'B', objetivando o desenvolvimento de híbridos de cebola.

Conclusão

Observou-se a presença dos três tipos de citoplasma ('S', 'N' e 'T') nos 30 acessos de cebola analisados. Onze acessos apresentaram tipo de citoplasma exclusivamente 'N', sete foram exclusivamente 'S', dois exclusivamente 'T' e dez apresentaram mistura entre os tipos de citoplasma 'N' e 'T', 'N' e 'S' e 'S' e 'T'.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, e à Embrapa Semiárido, pela disponibilização do espaço para realização do trabalho. Carlos Antonio Fernandes Santos é bolsista de produtividade do CNPq.

Referências

AGRIANUAL 2014: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2014. p. 231.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

DOWKER, B. D. Onion breeding. In: RABINOWITCH; BRESTER, J. L. (Ed.). **Onions and allied crops**. Baton Rouge: CRC Press. 1990. p. 125-232.

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.

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**, New York, v. 90, p. 263-268, 1995.

SANTOS, C. A. F.; LEITE, D. L.; COSTA, N. D.; OLIVEIRA, V. R.; SANTOS, I. C. N.; RODRIGUES, M. A. Identificação dos citoplasmas “S”, “T” e “N” via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 308-311, 2008.

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.