

Seleção Molecular Assistida para a Identificação de Alelo para Cor Rósea em População de Cebola Roxa

Andressa Mirelle Santos Lourenço¹; Carlos Antonio Fernandes Santos²; Jamille Cardeal da Silva³; Soniane Rodrigues da Costa⁴

Resumo

A presença de bulbos de cor amarela é indesejável em populações comerciais de cebola de bulbo roxo. O objetivo deste trabalho foi aplicar o marcador molecular *ANS* para genotipar plantas de população de cebola roxa para possibilitar a eliminação de alelos recessivos da cor rósea. As amostras foliares para a extração de DNA foram coletadas antes da floração para possibilitar a eliminação daquelas que apresentavam o alelo para cor rósea. Foram usados os iniciadores 'anthocyanidin synthase' *ANS-F*: 5'-TTTGCTCGATCGTTTAGCTGAAGAAGA-3' e *ANS-R*: 5'-TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGCA-3'. Os fragmentos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Foram observados produtos de PCR de tamanhos de, aproximadamente, 400 pb e 250 pb. Foi observada a presença de 71 plantas com alelo '*p*' das 307 plantas analisadas, sendo oito homozigotas '*pp*' e 63 plantas heterozigotas '*Pp*', indicando frequência de '*p*' de 12,87% e de '*P*'

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

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

³Estudante de Ciências Biológicas, UPE, bolsista Pibic-CNPq, Petrolina, PE.

⁴Tecnóloga em Gestão em Fruticultura Irrigada, D.Sc. em Recursos Genéticos Vegetais.

de 87,13%. Plantas com alelo '*p*' de 250 pb foram eliminadas antes da floração, deixando-se em campo apenas as plantas '*PP*' para a produção de sementes. Na geração seguinte não foram observadas plantas de bulbo amarelo, indicando que a eliminação de plantas "*pp*" foi eficiente na população de cebola roxa.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, seleção assistida, ANS.

Introdução

A preferência do consumidor brasileiro é pela cebola do bulbo amarelo, assim, a cebola de bulbos vermelhos tem o seu consumo restrito a algumas regiões do país, como na região Nordeste, onde 10% da área cultivada é com cebola de bulbo roxo (DINIZ et al., 2010). A presença de bulbos de diferentes cores dentro do padrão de uma cultivar é fator limitante para a sua comercialização.

Como revisado por Diniz et al. (2010), cinco *locus* principais são responsáveis pela coloração do bulbo da cebola, envolvendo interações epistáticas complexas: bulbo branco pode ser determinado por apenas um alelo dominante do *loco I*, bem como, pelos alelos recessivos do *loco C*. Compostos flavonoides são responsáveis por bulbos coloridos em cebola, sendo a cor vermelha atribuída a compostos derivados de cianidina (KIM et al., 2005). Para a identificação de alelos para a cor rósea (*P*), no melhoramento clássico, são necessários testes de progênies F2 e F3 em cultivares derivadas de cruzamentos entre bulbos vermelhos x bulbos amarelos, como revisado por Kim et al. (2005).

Kim et al. (2004, 2005) desenvolveram marcadores codominantes que possibilitaram a identificação molecular de alelos *P* em cultivares de cebola, facilitando o melhoramento e a eliminação de uma cor de bulbo indesejável em cultivares comerciais de cebola. A cor rósea de bulbos é condicionada por alelos recessivos *p*, sendo de difícil eliminação em cultivares de cebola que apresentam essa característica. Essa situação tem sido relatada na população comercial Brisa IPA 12, recomendada para a região do Vale do São Francisco, cuja frequência de bulbos róseos foi de 3,5%, dificultando

a sua aceitação pelo mercado consumidor (CANDEIA et al., 2014). A aplicação do marcador *ANS* reduziu a frequência de bulbos róseos na população Brisa IPA 12 de 3,5% para 0,052%.

O objetivo deste trabalho foi aplicar marcadores moleculares *ANS* em plantas da cebola roxa para possibilitar a eliminação de alelos recessivos da cor rósea, de forma a eliminar essa segregação comercialmente indesejável.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimento do Bebedouro, pertencente à Embrapa Semiárido. As amostras foliares foram coletadas antes da floração para possibilitar a eliminação daquelas que apresentavam o alelo para a cor rósea. O DNA total foi extraído conforme protocolo CTAB 2x (SANTOS et al., 2010).

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 μL , contendo aproximadamente 30 ng de DNA total, 1x de Tampão para *Taq* DNA Polimerase, 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,15 mmol L⁻¹ de cada dNTP, 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ M de cada iniciador, 0,25 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase. Os iniciadores publicados por Kim et al. (2005) foram: ANS-F: 5' – TTT GCT CGA TCG TTT AGC TGA AGA AGA – 3' e ANS-R: 5' – TGA GGA TGA TGA CAA AGT TAG CGG AGC A – 3'.

O programa de PCR utilizado foi o descrito por Kim et al. (2005): desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos e uma extensão ao final dos 40 ciclos de 7 minutos a 72 °C. Os fragmentos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Os fragmentos de PCR esperados conforme Kim et al. (2005) são: *pp* (fragmento de 428 pb), *Pp* (fragmentos de 818 e 428 pb) e *PP* (fragmento de 818 pb).

Resultados e Discussão

Diferente do relatado por Kim et al. (2005) e Candeia et al. (2014), foram observados produtos de PCR de tamanhos de, aproximadamente, 400 pb e 250 pb (Figura 1). Essa diferença deve estar relacionada ao fato de que, neste trabalho, objetivou-se a eliminação de alelos relacionados com a cor amarela e não com a cor rósea, como reportado nos trabalhos anteriores. Dessa forma, optou-se pela manutenção apenas de plantas que apresentavam alelos homozigotos para o fragmento de, aproximadamente, 400 pb.

Foi observada a presença de 71 plantas com alelo '*p*' nas 307 plantas analisadas, sendo oito homozigotas '*pp*' e 63 plantas heterozigotas '*Pp*', indicando frequência de '*p*' de 12,87% e de '*P*' de 87,13%. Essas 71 plantas foram eliminadas antes da antese, deixando-se apenas plantas '*PP*' para a produção de sementes. Na geração seguinte, com o plantio de sementes de plantas '*PP*', não foram observadas plantas de bulbos amarelos, indicando o sucesso na eliminação do alelo '*p*'.

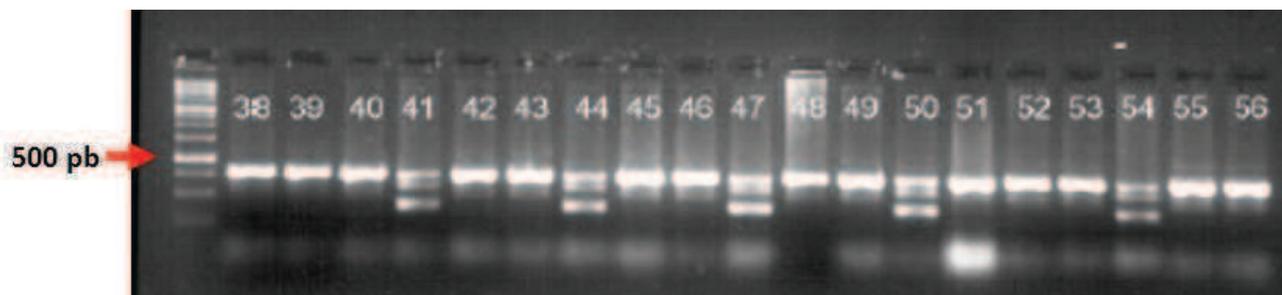


Figura 1. Padrão alélico para o gene da 'anthocyanidin synthase' – *ANS* em plantas de cebola roxa. Da esquerda para a direita: M = marcador generuler 100 bp Plus DNA (Fermentas).

Candeia et al. (2014) também comprovaram que a seleção assistida com o marcador do gene *ANS* foi eficiente para a quase eliminação total do alelo '*p*' na população de Brisa IPA12 em apenas um ciclo de seleção, eliminando-se a presença de bulbos róseos (*pp*) e tornando possível a comercialização de sementes dessa cultivar.

Conclusão

Os iniciadores *ANS* (anthocyanidin synthase) são eficientes na eliminação de alelos relacionados com a cor amarela em cebolas, possibilitando a obtenção de bulbos 100% roxos na geração seguinte.

Referências

CANDEIA, J. A.; COSTA, S. R.; SANTOS, C. A. F.; SILVA, M. C. L.; KARASAW, A. M. Seleção molecular assistida para identificação de alelo para cor rósea na cultivar Brisa IPA 12. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 31, p. S1962-S1966, 2014.

DINIZ, L. da S.; SANTOS, C. A. F.; COSTA, S. R. da; MEDEIROS, A. G. de. Identificação molecular de alelos para cor rósea em cultivares de cebola no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, p. S2593-S2597, 2010.

KIM, S.; BINZEL, M. L.; YOO, K. S.; PARK, S.; PIKE, L. M. *Pink (P)*, a new locus responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa*) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase. **Molecular Genetics and Genomics**, Cham, v. 272, p. 18-27, 2004.

KIM, S.; YOO, K. S.; PIKE, L. M. Development of a co-dominant, PCR-based marker for allelic selection of the pink trait in onions (*Allium cepa*), based on the insertion mutation in the promoter of the anthocyanidin synthase gene. **Theoretical and Applied Genetics**, Cham, v. 104, p. 628-633, 2005.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. de; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, p. 49-55, 2010.