

TRANSFERÊNCIA DE PRIMERS SSRs DE *ALLIUM FISTULOSUM* PARA *A. CEPA*

Carlos Antonio F. Santos¹; Luiz Cláudio Correa¹; Hugo Leonardo Coelho Ribeiro^{1,2}; Maria Maiany de Oliveira^{1,2}, Jucilene Silva Araujo^{1,2}.

¹Embrapa Semi-Árido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br. ²Bolsista CNPq-Embrapa

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi testar 12 primers SSRs desenvolvidos para cebolinha em cebola, considerando que as duas espécies pertencem ao mesmo gênero e que o aumento do número de SSRs para cebola facilitará diversas análises genéticas. Os SSRs publicados de cebolinha foram avaliados nos genótipos de cebola Crioula Alto Vale, Optima, Alfa São Francisco, CNPH 6400, Bola Precoce, TEG 502 PRR, IPA 11 e IPA 12. DNA genômico total foi extraído segundo o protocolo CTAB 2x, ajustando-se para a concentração de 30 ng/μL. Os fragmentos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% e de agarose comum a 3,5%, após PCR com a opção de descida da temperatura a cada ciclo de anelamento. Foram observadas amplificações de sete SSRs de cebolinha tanto em poliacrilamida como agarose, quais sejam, AFA01A08, AFA01C07, AFA01C09, AFA02F09, AFA03C06, AFA06A08 e AFAT02D10 nos oito genótipos de cebola, o que corresponde ao percentual de 58%. A amplificação dos sete SSRs de cebolinha em cebola, contudo, resultou em completa ausência de polimorfismo, sugerindo que apesar das regiões serem conservadas entre as duas espécies, as regiões amplificadas em cebola, provavelmente, não são regiões hipervariáveis de DNA repetitivo.

PALAVRAS-CHAVES: microsatélite, PCR, marcador molecular.

ABSTRACT

Transferability of SSRs primers from *Allium fistulosum* to *A. cepa*

The goal of this work was to evaluate the transferability of 12 SSR from bunching onion to onion, considering that both species belong to the same genus and that the increasing of SSRs to onion could improve many genetic analyses. The published bunching onion SSRs were tested in the Crioula Alto Vale, Optima, Alfa São Francisco, CNPH 6400, Bola Precoce, TEG 502 PRR, IPA 11 and IPA 12 onion genotypes. Total genomic DNA was extracted following the CTAB 2x protocol, adjusting the DNA concentration to 30 ng/μL. The PCR products were analyzed in a 6% polyacrylamide gel and also in a 3.5% common agarose gel, after a PCR program with the touch down option, where the annealing temperature decreased 0.7 °C each cycle. PCR amplifications were observed in the polyacrylamide and agarose gels to AFA01A08, AFA01C07, AFA01C09, AFA02F09, AFA03C06, AFA06A08 and AFAT02D10 bunching onion SSRs in the eight onion genotypes, corresponding to 58% (7/12). However the PCR products of the seven bunching onion SSR did not present polymorphism in the eight onion genotypes, suggesting that besides presence of conserved regions in the two species, the amplified onion regions were not hypervariable region of repetitive DNA.

KEYWORDS: microsatellite, PCR, molecular marker.

INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares tipo microssatélites ou seqüências repetitivas simples (SSR) detectam polimorfismo em regiões hipervariáveis do DNA e são ideais para diversos estudos, não só pela riqueza de informação genética que a sua co-dominância oferece como também pela obtenção de dados genéticos via PCR. A ocorrência de amplificação destes fragmentos mostra ser possível aproveitar primers que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do mesmo gênero, com reportado por Lamas et al (2007) e Kuleung et (2004).

A estratégia de transferibilidade de microssatélites de uma espécie para outra é uma estratégia bastante usada, pois os custos para o desenvolvimento de primers de SSRs são bastante elevados e um grande número dos mesmos estão disponíveis apenas para culturas importantes. Para cebola (*Allium cepa*) foram desenvolvidos e publicados primers de 30 SSRs (Fischer e Bachmann, 2000), enquanto para cebolinha (*A. fistulosum*) foram publicados seqüências de 100 primers de SSRs (Tsukazaky et al., 2007).

O objetivo desse trabalho foi testar 12 primers SSRs desenvolvidos para cebolinha em cebola, considerando que as duas espécies pertencem ao mesmo gênero e que o aumento do número de SSRs para cebola facilitará análises genéticas diversas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados os SSRs AFA01A08, AFA01C07, AFA01C09, AFA01F03, AFA02, AFA02F09, AFA03C06, AFA06A08, AFA07A08, AFA07A10, AFAT02D10 e AFAT05G01 desenvolvidos para cebolinha (Tsukazaky et al., 2007) em oito genótipos de cebola, quais sejam: Crioula Alto Vale, Optima, Alfa São Francisco, CNPH 6400, Bola Precoce, TEG 502 PRR, IPA 11 e IPA 12.

DNA genômico total foi extraído segundo o protocolo CTAB 2x, ajustando-se para a concentração de 30 ng/ μ L. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 μ L, contendo 30 ng de DNA genômico, 1x de Tampão para *Taq* DNA Polimerase, 1,5 de mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,3 μ M de cada *primer* 0,15 Unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase (Fermentas).

O programa de PCR foi o seguinte: denaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 10 ciclos a 94 °C por 40 s, 62 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, com a temperatura de anelamento sendo reduzida 0,7 °C a cada ciclo. A seguir foram realizados 30 ciclos a 94 °C por 40 s, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, seguido de extensão final de 4 min a 72 °C. Após a amplificação, os fragmentos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, conforme descrito por Creste et al. (2001). Os fragmentos de PCR foram também visualizados em gel de agarose comum a 3,5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas amplificações de sete SSRs de cebolinha, quais sejam, AFA01A08, AFA01C07, AFA01C09, AFA02F09, AFA03C06, AFA06A08 e AFAT02D10 nos oito genótipos de cebola (Fig.1 e Fig. 2).

Esse número corresponde ao percentual de 58%, sendo esse percentual maior ao observado de melão para melancia (Lamas et al., 2007) e de trigo para centeio (Kuleung et al., 2004). Entre os 30 SSRs de cebola (Fischer e Bachmann, 2000) apenas um apresentou segregação em cebolinha (Ohara et al., 2004). Os tamanhos dos fragmentos amplificados variaram de 130 bp no SSR AFA06A08 a 400 bp no SSR AFA01A08 (Fig. 2).

A amplificação dos sete SSRs de cebolinha em cebola resultou em completa ausência de polimorfismo, sugerindo que apesar das regiões serem conservadas entre as duas espécies, as regiões amplificadas em cebola, provavelmente, não são regiões hipervariáveis de DNA repetitivo.

Esforços devem ser realizados por programa de melhoramento de cebola para o desenvolvimento de SSRs específicos para a espécie, o que possibilitará estudos diversos, como paternidade em disputas comerciais com híbridos e cultivares, mapeamento genético, entre outros.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do CNPq, projeto edital Universal.

LITERATURA CITADA

CRESTE, S; TULMANN NETO, A; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 299-306. 2001.

FISCHER D.; BACHMANN, K. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use to assess intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. *Theoretical and applied Genetics*, 101: 153-164. 2000.

KULEUNG, C. BAENZIGER, P. S. DWEIKAT, I. 2004. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(6): 1147-1150.

LAMAS, N. da S. e; FERREIRA, M.A; AMARAL, Z. P. de S.; VIEIRA, J. V. ; FERREIRA, M. A. J. da F.; BUSO, G. S. C. Detecção de polimorfismo em melancia com primers microssatélites de melão. In: 47 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2007, Porto Seguro. *Horticultura Brasileira*, 2007. v. 25. p. 94-94.

OHARA, T., SONG, Y.S., TSUKAZAKI, H., WAKO, T., NUNOME, T., KOJIMA, A. 2005. Genetic mapping of AFLP markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica* 144: 255–263

TSUKAZAKI, H.; NUNOME, T.; FUKUOKA, H.; KANAMORI, H.; KONO, I.; YAMASHITA, K-I.; WAKO, T.; KOJIMA, A. Isolation of 1,796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica*, 157(1-2): 83-94. 2007

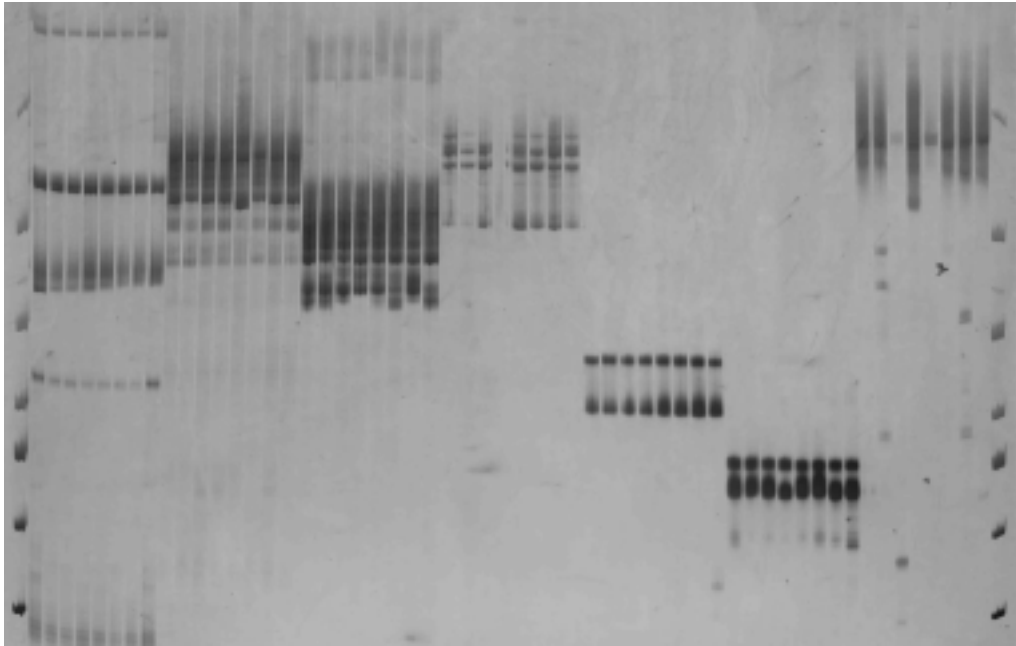


Figura 1. Gel de poliacrilamida (6%) com SSRs de cebolinha AFA01A08, AFA01C07, AFA01C09, AFA02F09, AFA03C06, AFA06A08 e AFAT02D10 (da esquerda para a direita) avaliados nos genótipos de cebola Crioula Alto Vale, Optima, Alfa São Francisco, CNPH 6400, Bola Precoce, TEG 502 PRR, IPA 11 e IPA 12 (da esquerda para a direita em cada SSR).

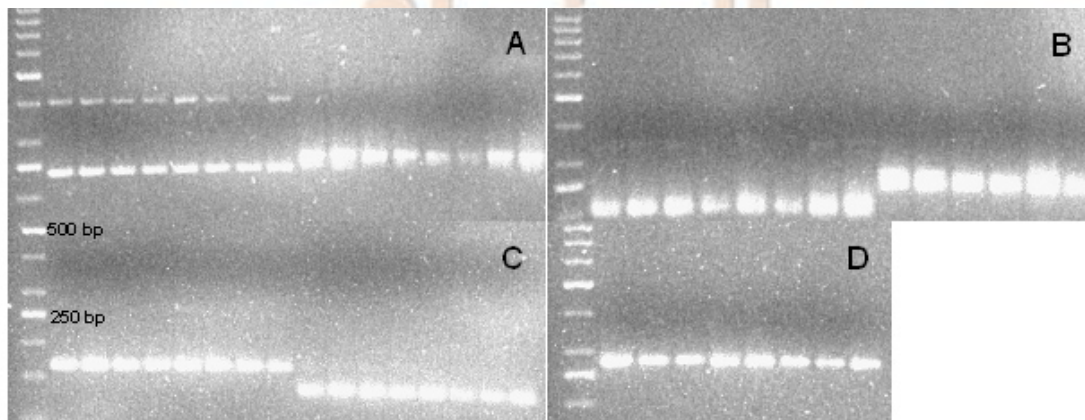


Figura 2. Gel de agarose comum (3,5%) com SSRs de cebolinha AFA01A08, AFA01C07 (painel A), AFA01C09, AFA02F09 (painel B), AFA03C06, AFA06A08 (painel C) e AFAT02D10 (painel D) avaliados nos genótipos de cebola Crioula Alto Vale, Optima, Alfa São Francisco, CNPH 6400, Bola Precoce, TEG 502 PRR, IPA 11 e IPA 12 (da esquerda para a direita em cada SSR).