ANÁLISE RETROSPECTIVA DO MELHORAMENTO GENÉTICO DE CEBOLA (*Allium cepa* L.) NO BRASIL E POTENCIAL APLICAÇÃO DE NOVAS ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS

Paulo César Tavares de Melo (pctmelo@cnph.embrapa.br) e Leonardo S. Boiteux, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), Caixa Postal 0218, CEP 70359-970 Brasília, DF

IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA DA CULTURA DA CEBOLA

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma espécie diplóide (2n=2x=16) pertencente a família Alliacea, cultivada há mais de 5000 anos, sendo uma hortaliça de ampla difusão no mundo, tendo, como provável centro de origem a Ásia Central. O germoplasma primário envolve algumas espécies cultivadas e selvagens com as quais diferentes níveis de isolamento genético têm sido observados. *A. cepa* possui diversidade genética ampla condicionada, em parte, por sua natureza predominantemente alógama. O germoplasma desta espécie é constituído por diversas populações locais e de cultivares desenvolvidas ao longo dos séculos para adaptação a distintas latitudes, áreas geográficas, sistemas de cultivo e preferências de consumo. O Brasil figura entre os 10 maiores produtores mundiais de cebola. As estimativas para a safra 1999/2000 indicam 970.000t em uma área plantada de cerca de 66.000ha. A cebola é uma cultura que apresenta um cunho social importante baseada na agricultura familiar. As zonas de produção estão distribuídas nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste que produziram, respectivamente, 582.377t (58,8%), 287.254t (29,2%) e 118.462t (12,0%). Novas fronteiras de produção baseadas em fazendas-empresas estão surgindo no Nordeste (Chapada Diamantina-BA) e nos cerrados goiano (Cristalina) e mineiro (São Gotardo). As condições edafo-climáticas destas áreas são altamente favoráveis e o custo de produção tem sido inferior ao das regiões tradicionais de cultivo. As produtividades obtidas, com o uso de híbridos, têm superado 65t/ha. Além disso, o produto ofertado ao mercado é de boa qualidade e padronizado. Nos anos 90, a cebolicultura brasileira mostrou-se uma atividade pouco lucrativa, por vezes deficitária para os produtores, especialmente após a instituição do MERCOSUL. A oferta de cebola argentina contribuiu para desestabilizar o abastecimento do mercado no país. Em poucos anos a cebola produzida na Argentina conquistou a preferência dos consumidores por sua qualidade superior, melhor padronização comercial e visual. Como resultado, os dados de importação para o ano de 1999 indicaram valores em torno de 223.946t de cebola importada da Argentina.

HISTÓRICO DA INTRODUÇÃO E USO DE GERMOPLASMA DE CEBOLA NO BRASIL

O início do cultivo e as primeiras introduções de germoplasma de cebola no Brasil são atribuídos aos imigrantes açoreanos e portugueses que colonizaram a região litorânea do Rio Grande do Sul (RS). As cultivares introduzidas por eles há mais de um século, especialmente a cultivar portuguesa Garrafal, foram submetidas à seleção natural e intencional dando origem a distintas populações adaptadas a diferentes condições agroecológicas, com especial destaque para Baia Periforme. Estas populações variáveis quanto ao ciclo de maturação, potencial produtivo, características de bulbo (formato, cor, pungência, brix e conservação pós-colheita) e resistência a doenças, garantiram a sustentabilidade do cultivo da cebola no RS. Além disso, proporcionaram a formação de um banco de germoplasma de inestimável valor para o melhoramento da cultura no país (Fonseca, 1977). A rigor, todos os programas de melhoramento de cebola no Brasil, tanto os conduzidos pelo setor público quanto os da iniciativa privada, se valeram e ainda se valem deste precioso conjunto gênico (Melo e Ribeiro, 1990), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Cultivares de cebola obtidas a partir das populações Baia Periforme por programas de melhoramento de

instituições públicas e privadas, de 1938 a 2000.

INSTITUIÇÃO	INÍCIO	CULTIVARES LANÇADAS	MÉTODO DE MELHORAMENTO
1. Estação de Pesquisa e Produção de Rio Grande (FEPAGRO), Rio Grande, RS	1938	Rio Grande, Luzitana, Faroupilha, Sulina, Baia Jubileu, Pera Norte-14 , **Petrolini**(1) e **Madrugada**	• Seleção massal (SM) • Síntese de linhagens • Hibridação
• Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP	1938	Baia Bojuda I-2448, Roxa do Traviú I-3824, IAC Monte Alegre 3385 e Solaris	• Seleção Massal
• Instituto de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba, SP	1940	Baia Periforme Precoce do Cedo, Composto Baia, Pira Ouro, Pira Dura, Pira Tropical	• Hibridação + SM • Síntese de composto e polycross
• Empresa Pernambucana de Pesq. Agropecuária (IPA), Belém do São Francisco, PE	1972	Pera IPA-1, Pera IPA-2, Roxa IPA-3, Chata IPA-4, IPA-5, **IPA-6**, Mutuali IPA-8, Belém IPA-9, **Franciscana IPA-10** e **Vale Ouro IPA-11**	• Seleção Massal Estratificada (SME) • Hibridação + SME
• Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), Ituporanga, SC	1975/76	EMPASC 351 Seleção Crioula, **EMPASC 352 Bola Precoce**, EMPASC 355 Ituporanga, EMPASC 356 Rosada, **EPAGRI 362 Crioula Alto Vale** e **EPAGRI 363 Super Precoce**,	• Seleção Massal
• Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS	1980	**Aurora**, **Primavera** e Seleção 9101(2)	• Seleção Massal
• Embrapa Hortaliças, Brasília, DF	1977	Conquista, São Paulo, Alfa Tropical(2) e Beta Cristal(2)	• Seleção Massal • Hibridação + SM
• Horticeres, São Joaquim de Bicas, MG	1971	Híbridos Baia Ouro AG-55, Baia Ouro 55R, Baia Ouro AG-59 e **Baiadura AG-737**	• Híbridos F_1 • Seleção Massal
• Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Paulínia, SP	1985	**Serrana** e **Montana**	• Seleção Massal • Híbridos F_1
10. Sakata/ Agroflora, Bragança Paulista, SP	1985-86	**Superprecoce** e **Bella Crioula**	• Seleção Massal

(1) Cultivares em negrito: ainda estão em cultivo comercial
(2) Em fase de validação

PANORAMA VARIETAL ATUAL

A produção de cebola no Brasil é baseada em cultivares de polinização aberta (~90%) com seleções do tipo Baia Periforme e Crioula dominando o mercado. Variedades do grupo Grano representadas pela tradicional cultivar Texas Grano 502, têm importância localizada no Nordeste. No segmento de híbridos, durante vários anos, Granex 33 foi líder nas zonas de produção de Monte Alto e São José do Rio Pardo, em São Paulo. A partir de 1995, devido a problemas de qualidade dos lotes de sementes colocados no mercado, outros híbridos do mesmo segmento varietal foram introduzidos, e, paulatinamente, foram reduzindo a fração de mercado de Granex 33. Merecem destaque os híbridos Granex Ouro, Superex, Princesa e Mercedes. Os dois últimos vêm mostrando maior flexibilidade de adaptação às diferentes zonas de produção do país, com bulbificação muito uniforme e elevado potencial produtivo.

ANÁLISE CRÍTICA DOS PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE CEBOLA: DESAFIOS E PERSPECTIVAS

Até a poucos anos, as instituições públicas de pesquisa e ensino tiveram uma ação marcante e foram bem sucedidas no desenvolvimento de cultivares adaptadas às diferentes épocas e sistemas de cultivo. No panorama atual, a maior parte das cultivares de polinização aberta em uso, foi originada de programas públicos de melhoramento, sobretudo, nas três últimas décadas do século XX. É importante destacar, no entanto, que o futuro do melhoramento de cebola no Brasil parece não ser muito promissor. Três dos sete programas (IGEN/ESALQ-USP; IAC e EMBRAPA Hortaliças) foram descontinuados e os quatro restantes tiveram uma drástica redução nas suas atividades ao longo da década passada (Tabela 1). Desses programas, o do IPA-PE vem concentrando esforços na obtenção de cultivares com bulbos de coloração roxa e conta com apenas um pesquisador dedicado ao programa desde que seus três melhoristas desligaram-se da instituição. O programa da EMBRAPA-Clima Temperado deverá ter suas atividades oficialmente reiniciadas no ano de 2001 e o da EPAGRI-SC, vem sendo conduzido graças aos esforços de pesquisadores da área de produção de sementes. Atualmente, o número de pesquisadores atuando como melhoristas de cebola no setor público é insatisfatório. A título de comparação, em 1981, haviam onze melhoristas trabalhando nestes mesmos programas (Buso, 1981).

NOVAS ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO

Uso marcadores moleculares para identificação de citoplasmas macho-estéreis e na produção comercial de híbridos

A macho esterilidade (ME) tem sido uma estratégia de fundamental importância na produção comercial de sementes híbridas evitando a tarefa quase impossível de realizar a emasculação. Dois sistemas distintos de ME genético-citoplasmática têm sido usados para produzir sementes híbridas de cebola. O citoplasma estéril **S** foi descrito por Jones e Clarke (1943) dentro da população Italian Red. O sistema de citoplasma **S** possui um controle genético relativamente simples envolvendo a interação de um citoplasma estéril com um gene nuclear dominante (**Ms**), responsável pela restauração da fertilidade. Um sistema distinto foi identificado na cultivar francesa Jaune Paille des Vertus, denominado citoplasma **T**. Este sistema possui um controle genético complexo envolvendo a interação do citoplasma estéril com três *loci* nucleares que segregam independentemente (Schweisguth, 1973). A cebola é tipicamente bianual sendo necessário cerca de 4-8 anos para incorporar e fixar citoplasma estéril em populações de interesse. O método convencional para distinguir uma planta fértil envolve cruzamentos com plantas macho estéries seguido de testes de progênie. Deste modo, a identificação de marcadores capazes de distinguir citoplasma **N** do **S** bem como marcadores codominantes para o gene **Ms** poderiam acelerar o processo de incorporação de ME em linhagens elite. Os primeiros marcadores para ME em cebola foram derivados de análises dos produtos de clivagem de DNA de cloroplasto e mitocôndria usando distintas enzimas de restrição e avaliação destes produtos usando sondas

radioativas (para revisão ver Havey, 1995). Marcadores mais simples e de menor custo operacional foram obtidos via PCR com *primers* desenhados para regiões polimórficas presentes no DNA de cloroplasto (Havey, 1995) e de mitocôndria (Muro et al., 1997) de plantas macho estéreis. Estas técnicas estão sendo, atualmente, utilizadas nos programas de melhoramento conduzidos por diversas companhias de sementes nos EUA e Europa, permitindo a pronta identificação de citoplasma macho estéril e a extração de linhas mantenedoras em bases genéticas distintas. Análises moleculares do citoplasma de cultivares brasileiras, usando marcadores para os citoplasmas **S** e **T,** estão sendo conduzidas no Brasil (Leite et al., 1999). Projetos de pesquisa para identificar marcadores ligados ao locus **Ms** já estão também em andamento nos EUA.

Mapas genéticos

Mapas genéticos são importantes estratégias em estudos básicos de evolução e podem cumprir um papel de destaque no melhoramento permitindo seleção indireta de características qualitativas e quantitativas difícies de avaliar e/ou fortemente influenciadas pelo ambiente. Um mapa de baixa densidade (124 marcadores) foi inicialmente gerado a partir de um cruzamento interespecífico. Dois marcadores do tipo RFLP correspondendo a dois clones de cDNA da alliinnase (enzima envolvida na geração de componentes de sabor) foram alocados neste mapa (King et al., 1998a). Mapas de maior densidade de marcadores foram obtidos via AFLP (Heusden et al., 2000). Um total de 692 marcadores foram mapeados em um cruzamento entre *A. roylei* x *A. cepa*. Este mapa cobriu todos os oito grupos de ligação e abrangeu cerca de 694cM dos 800cM previstos para o genoma de *A. cepa*. Um marcador ligado à resistência ao míldio (*Peronospora destructor*) também foi mapeado. Diversas características quantitativas estão agora sendo mapeadas em diversas populações de cebola usando estes mapas como referência.

Usos de marcadores moleculares na caracterização e organização de germoplasma

Uma reclamação constante dos produtores de cebola que usam sementes híbridas é a instabilidade de performance observada de lote para lote ou de ano para ano. Linhagens usadas para produção de híbridos são auto-fecundadas no máximo 2-3 vezes retendo, desta forma, um nível residual alto de heterozigosidade. A análise dos resultados, usando marcadores do tipo RAPD, indicaram que seleção não intencional, deriva genética e contaminação explicam estas irregularidades de performance. Marcadores RFLP também têm sido empregados para estimar as distâncias genéticas entre linhagens elites de cebola. Estes marcadores foram capazes de distinguir todas as linhagens independente da origem geográfica e tipo morfo-agronômico (King et al., 1998b). Estes resultados confirmaram a utilidade de marcadores para identificar combinações híbridas de maior potencial heterótico e na condução de testes de pureza genética de lotes de sementes híbridas ("QA plantouts").

Uso de marcadores moleculares em estudos filogenéticos

Classificação e análise filogenética baseada apenas em características anatômicas e morfológicas tornam-se problemáticas e algumas vezes imprecisas. Marcadores têm sido empregados para estudar as relações filogenéticas de algumas espécies de importância econômica dentro do gênero *Allium* (Klaas, 1998). Todavia, os resultados indicaram que a espécie *A. roylei* (colocada em uma distinta seção de acordo com critérios morfológicos) é o *taxon* mais relacionado com a cebola cultivada.

Cruzamentos ponte, engenharia cromossômica e introgressão de genes

Fusão de células têm sido conduzida entre espécies da seção *Cepa* do gênero *Allium*. Híbridos contendo diversos genes de interesse têm sido obtidos entre *A. cepa* e *A. fistulosum*, *A. galanthum*, *A. oschaninii* e *A. vavilovii*. Linhagens de retrocruzamento para *A. cepa* já foram obtidas (Tashiro et al., 1997). Testes de fertilidade, com progênies de retrocruzamento em materiais genéticos, contendo o citoplasma de *A. galanthum* indicaram a inesperada presença de indivíduos macho estéreis. *A. roylei* cruza sem muitas dificuldades com *A. cepa* e programas de retrocruzamento já estão em andamento (van de Meer e de Vries,

1990). No entanto, a introgressão de genes de interesse de *A. fistulosum* em *A. cepa* via cruzamento natural tem sido muito problemática após a obtenção do híbrido F_1. Uma alternativa encontrada para evitar este problema tem sido a utilização de *A. roylei* com espécie ponte. Análises citogenéticas de híbridos triplos *A. cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*) indicaram a presença de eventos de recombinação dos três genomas permitindo a introgressão em *A. cepa* de segmentos cromossômicos derivados de *A. fistulosum* (Khrustaleva e Kik, 1997). Esta estratégia pode permitir a introgressão de novos genes/alelos de resistência a doenças economicamente importantes nas condições brasileiras, tais como míldio, antracnose, mancha foliar de *Stemphylium* e podridão radicular de *Fusarium*.

Cultura de tecidos e transformação genética de cebola

Linhagens duplo haplóides (DH) *in vitro* têm sido obtidas mediante um processo de ginogênese, envolvendo um protocolo em duas etapas com cultivo de flor e ovário (Bohanec et al., 1995). Análise usando marcadores indicaram níveis de homozigosidade entre 63-100% nestes DH. A manutenção de linhas A e B via propagação clonal *in vitro* é uma estratégia aplicável na produção de híbridos. As culturas iniciais podem ser estabelecidas a partir de botões florais imaturos e/o eixo das inflorescências. Protocolos para o cultivo *in vitro* e regeneração de plantas a partir de calos obtidos de embriões zigóticos estão também disponíveis (Zheng et al., 1999) e constituem a base experimental necessária para diversos estudos genéticos básicos e no melhoramento, incluindo a obtenção de plantas transgênicas e geração de mutantes. A transformação genética de cebola usando bombardeamento de partículas (biolística) e *Agrobacterium tumefaciens* foi durante muito tempo inexeqüível devido à limitações metodológicas. Estudos recentes, no entanto, identificaram calos de embriões imaturos como um tecido competente para incorporação genômica de T-DNA e posterior regeneração de plantas. A metodologia de transformação via *A. tumefaciens* usando, também, embriões imaturos como explantes tem se mostrado eficiente (Eady et al. 2000). Foram necessários cerca de 3-5 meses para produzir regenerantes primários a partir de explantes infectados. Metodologias biolísticas foram aperfeiçoadas usando tecido embriônico cultivado por cerca de 3-14 dias em um meio para indução embriogênica seguido por cultivo em meio de indução de brotação contendo o agente seletivo. Após seis semanas propágulos potencialmente transgênicos são analisados via PCR.

DISCUSSÃO

Os programas públicos de melhoramento, delineados e executados para atender às demandas das regiões produtoras, têm contribuído, de forma efetiva, na geração de novas cultivares. Estes materiais genéticos constituiram a base para o desenvolvimento e sustentação da cebolicultura no Brasil. Desse modo, garantir a continuidade e melhoria da infra-estrutura com maiores investimentos em capacitação de pessoal são ações imprescindíveis para assegurar este consistente fluxo de lançamento de novas variedades com elevado potencial produtivo, com maior flexibilidade de adaptação e com características requeridas pelo mercado consumidor (plantas bulbos globosos, tamanho mediano, cor bronzeada uniforme, boa retenção de escamas e sabor suave). As novas estratégias e tecnologias discutidas aqui representam ferramentas promissoras que, em conjunto com procedimentos tradicionais, poderão acelerar ainda mais o desenvolvimento desta nova geração de cultivares melhoradas de cebola no Brasil. Levando em consideração as peculiaridades brasileiras e o caráter imediatista das companhias privadas de sementes, a maioria com atividades globalizadas, não se espera que estas empresas conduzam importantes ações de pesquisa que requeiram prazos longos de execução, demanda intensa de recursos de laboratório e pessoal treinado para produzir cultivares para nichos restritos e/ou de relevância econômica periférica. Por estas razões, o setor público deve continuar investindo em cebola a fim de manter a liderança do processo de geração de ciência e tecnologia. Tal iniciativa poderá beneficiar toda a cadeia produtiva de cebola no país.

De outro lado, a segmentação de mercado é apontada como fator chave no desenvolvimento do agronegócio brasileiro de hortaliças, nos anos 90. A cebola, no entanto, foi um dos produtos que não mostraram inovação em termos de diversificação varietal. Deste modo, constituem oportunidades pouco ou nada exploradas e que demandam ações de pesquisa na área de melhoramento a obtenção de cultivares de diferentes cores (brancas,

rosadas, roxas), de sabor suave, cascuda bronzeada, para o mercado doméstico e de exportação, além de materiais para usos específicos (picles, desidratação, flocos). Todavia, isso não é suficiente para tornar a produção de cebola do país mais eficiente e competitiva dentro do processo de integração do MERCOSUL. É imprescindível, também, a melhoria dos sistemas de cultivo das diversas regiões brasileiras produtoras de cebola, pela incorporação de novas técnicas de manejo cultural que conduzam ao incremento de produtividade e da qualidade aliado à redução de custos. Daí, é imperativo que as instituições públicas do país voltem a ter recursos para investir na geração e aplicação de técnicas que possam ser incorporadas pelos pequenos e médios produtores, responsáveis pela maior parte da produção de cebola no país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bohanec, B. et al. (1997). In: Proc. 2nd Int´l. Symp. Edible Alliaceae, Australia.

Bradeen, J.M., Havey, M.J. (1995). J. Am. Soc Hort Science 120: 752-758.

Buso, J. (1981). In: Sem. Nac. "Dr. Floriano Guimarães" Melh. Genet. Prod. Sem. Cebola, Brasília.

Campion, B.; Bohanec, B.; Javornik, B. (1995). Theor. Appl. Genet. 91: 598-602.

Eady, C.C.; Weld, R.J.; Lister, C.E. (2000). Plant Cell Reports 19: 376-381.

Fonseca, G.F. (1977). In: IPAGRO Informa, Boletim #19.Gov. Estado Rio Grande do Sul.

Havey, M.J. (1995). Theor. Appl. Genet. 90: 263-268.

Heusden, A.W.-van, et al. (2000). Theor. Appl. Genet. 100: 118-126.

Jones, H.; Clarke, A. (1943). Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 43: 189-194.

Klaas, M. (1998). Plant Breeding 117: 297-308.

King, J.J. et al. (1998a). Theor. Appl. Genet. 96: 52-62.

King, J.J. et al. (1998b). J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 1034-1037.

Khrustaleva, L.I.; Kik, C. (1997). In: Proc. 2nd Int´l Symp.Edible Alliaceae, Australia.

Leite, D.L.; Galmarini, C.R.; Havey, M.J. (1999). Allium Improvement Newsletter 9: 1-4.

Melo, P.C.T. de & Ribeiro, A. (1990). In: Castellane, P. D.; Walkiria, M. N.; Hasegawa, M. Jaboticabal. FCAV/UNESP, 1990, p. 15-76.

Muro, T; Satoh, Y; Itoh, K, (1997). In: Proc. 2nd Int´l Symp. Edible Alliaceae, Australia.

Schwisguth, B. (1973). Ann. Amerior. Plant 23: 221-233.

Tashiro, Y. et al. (1997). Proc. Second International Symposium on Edible Alliaceae, Australia.

Van der Meer, Q.P.; de Vries, J.N. (1990). Euphytica 47: 29-31.

Zheng, S.J. et al. (1999). Euphytica 108: 83-90.