

Identificação molecular de alelos para cor rósea em cultivares de cebola no Vale do São Francisco.

Laerte da Silva Diniz¹; Carlos Antonio Fernandes Santos¹; Soniane Rodrigues da Costa¹; Aliandra Graña de Medeiros¹

¹ Embrapa Semiárido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE., laertediniz@hotmail.com
casantos@cpatsa.embrapa.br.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi testar os marcadores moleculares *ANS* para genotipar 11 cultivares e/ou populações de cebola para alelos de bulbo róseo, de forma a orientar trabalhos de melhoramento de cebola na região do vale do São Francisco. DNA total foi extraído de amostras foliares de cinco plantas coletadas aos 30 dias após a semeadura em Petrolina, PE, para constituir uma amostra de cada cultivar, conforme protocolo CTAB 2x. Foram usados os iniciadores ANS-F: 5' – TTTGCTCGATCGTTTAGCRGAAGAAGA – 3' e ANS-R: 5' – TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGCA – 3' para genotipar as cultivares de cebola. Os fragmentos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Das cultivares de cebola analisadas com os marcadores para alelos do gene *ANS*, as cultivares T1613CR15, T11Boto, 17CAI-1, Alfa São Francisco e Valeouro-IPA11 apresentaram alelos *pp*, fragmento de 818 pb, duas apresentaram alelos *PP*, fragmento 428 pb, quais sejam Mutualli-IPA 8 e Caeté, e as cultivares T811CR13, 25CA10, Franciscana-IPA10 e Brisa-IPA 12 foram heterozigotas. Foram observadas plantas homozigotas da Franciscana IPA-10, tanto para *PP* como *pp*. Das cinco plantas de Brisa-IPA 12 analisadas, três apresentaram os alelos recessivos *pp*. O uso desse marcador poderá ser vantajoso para eliminar alelos da cor rósea (*pp*) de cultivares de cebola.

Palavras-chave: *Allium cepa* L., seleção assistida, ANS.

ABSTRACT

Molecular pink allele identification in onion cultivars in the São Francisco river Valley, Brazil.

The objective of the present study was to evaluate the *ANS* primers to genotype 11 onion cultivars or populations for alleles responsible for the pink color bulb, in order to guide breeding activities to this crop in the São Francisco river Valley. Total DNA was extracted according the CTAB 2x DNA protocol from leaves of five plants 30 days after sowing, in Petrolina, PE, Brazil, to compose a bulk for each population. The primers ANS-F: 5' – TTTGCTCGATCGTTTAGCRGAAGAAGA – 3' and ANS-R: 5' – TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGCA – 3' were used to genotype all onion populations. The PCR fragments were visualized in agarose gel 1%. Among the onion population evaluated with markers for *ANS* alleles, the population T1613CR15, T11Boto, 17CAI-1, Alfa São Francisco and Valeouro-IPA11 presented the *pp* genotype, with 818 bp, two other, Mutualli-IPA 8 and Caeté, presented the *PP* genotype, with 428 bp, and the populations T811CR13, 25CA10, Franciscana-IPA10 and Brisa-IPA 12 were heterozygotes, presenting both alleles. Some plants of Franciscana-IPA 12 cultivar were homozygotes for *PP* or *pp* alleles. Among the five Brisa-IPA 12, three presented the recessive alleles *pp*. The *ANS* primers should be very useful to eliminate pink alleles (*pp*) in onion population.

Keywords: *Allium cepa* L., assisted selection, ANS.

A preferência do consumidor brasileiro é pela cebola do bulbo amarelo, sendo que cebola de bulbos vermelhos tem o seu consumo restrito a algumas regiões do país. O nordeste brasileiro é responsável por cerca de 22% da produção nacional de cebola, sendo que desse total, em torno de 90%, são bulbos de cebola amarela.

Cinco locus principais são responsáveis pela coloração do bulbo da cebola, envolvendo interações epistáticas complexas, por exemplo: bulbo branco pode ser determinado por apenas um alelo dominante do loco *I*, bem como, pelos alelos recessivos do loco *C*. Compostos flavonóides são responsáveis por bulbos coloridos em cebola, sendo a cor vermelha atribuída a compostos derivados de cianidina. Bulbos de cor rósea, resultantes da redução da 'anthocyanidin synthase' (*ANS*), são indesejados em cultivares de cebola, derivadas de cruzamentos entre cebola de bulbos vermelhos x bulbos amarelos, principalmente. Para 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 co-dominantes que possibilitaram a identificação molecular de alelos *P* em cultivares de cebola, facilitando o melhoramento e a eliminação dessa cor 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.

O objetivo do presente trabalho foi testar os marcadores moleculares *ANS* para genotipar diferentes cultivares de cebola para alelos *P*, de forma a orientar trabalhos de melhoramento de cebola na região do vale do São Francisco.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA total foi extraído de amostras foliares de cinco plantas coletadas aos 30 dias após a sementeira em Petrolina, PE, para constituir uma amostra de cada cultivar e/ou populações (Tabela 1), conforme protocolo CTAB 2x (Santos et al., 2010). Amostras individuais de DNA, além da amostra de cinco plantas/cultivar e/ou população, foram constituídas para as cultivares Franciscana IPA 10 e Brisa-IPA 12, por apresentarem relatos da presença de bulbos róseos nessas cultivares, principalmente na Brisa-IPA 12.

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 μ L, que continha em torno de 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 μ 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 RGA AGA AGA – 3' e ANS-R: 5' – TGA GGA TGA TGA CAA AGT TAG CGG AGC A – 3'. O programa de PCR utilizado foi 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%. A interpretação dos fragmentos amplificados por PCR foram como descrito por Kim et al. (2005): *PP* (fragmento de 428 pb), *Pp* (fragmentos de 818 e 428 pb) e *pp* (fragmento de 818 pb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cultivares e/ou populações de cebola analisadas com os marcadores para alelos do gene *ANS*, cinco foram homozigotas para os alelos *pp*, fragmento de 818 pb, quais sejam, T1613CR15, T11Boto, 17CAI-1, Alfa São Francisco e Valeouro-IPA11, duas foram homozigotas para os alelos *PP*, fragmento 428 pb, quais sejam Mutualli-IPA 8 e Caeté, e as cultivares T811CR13, 25CA10, Franciscana-IPA10 e Brisa-IPA 12 foram heterozigotas (Figura 1 e Tabela 1). As duas amostras formadas por 10 plantas de Franciscana IPA-10 foram heterozigotas, sendo que alguns indivíduos dessas amostras foram homozigotas para os dois alelos (Fig.1, linhas 10, 11 e 17). Da mesma forma, foi observada a presença dos dois alelos do gene *ANS* na amostra composta por cinco plantas da Brisa-IPA 12, sendo que três plantas dessa amostra apresentaram os alelos recessivos (Fig.1, linhas 20, 21 e 22).

Segundo Kim et al. (2005) a reação enzimática antes da *ANS* na cadeia biosintética da 'anthocyanin' é bloqueada em bulbos brancos ou amarelos, sendo que a composição genotípica do loco *P* só pode ser detectada em testes de progênies, quando um cruzamento é realizado com uma cebola vermelha.

Em cultivares derivadas do cruzamento de bulbo vermelho x bulbo amarelo, como no caso da Brisa IPA-12, os alelos recessivos permanecem 'escondidos' nos heterozigotos, dificultando a sua eliminação por testes de progênies ou autofecundações. A seleção assistida com o marcador do gene *ANS* poderá ser vantajosa para facilitar a eliminação dos alelos *p* na população de Brisa-IPA12, eliminando a presença de bulbos (*pp*) na população, que tem limitado a sua aceitação comercial.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a Facepe pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- KIM S; BINZEL ML; YOO KS; PARK S; PIKE LM. 2004. *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* 272: 18–27.
- KIM S; YOO KS; PIKE LM. 2005. 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* 104: 628-633
- SANTOS CAF; OLIVEIRA VR de; RODRIGUES MA; RIBEIRO HLC. 2010. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 49-55.

Tabela 1. Origem e padrão alélico de cultivares de cebola de bulbos de diferentes cores, avaliados com iniciadores de DNA ‘anthocyanidin synthase’ – ANS. (Origin and allelic composition of onion populations, with different bulb colors, evaluated with the ‘anthocyanidin synthase’ - ANS primers). Petrolina, PE, 2010.

População	Origem	Cor do bulbo	Padrão alélico ANS	
			818 (pp)	428 (PP)
1. T1613CR15	Valcartoce x Baía	Vermelho	+	-
2. T811CR13	Valcartoce x Baía	Vermelho	+	+
3. T11Boto	Valcartoce x Baía	Amarelo	+	-
4. 25CA10	Valcartoce x Baía	Amarelo	+	+
5. 17CAI-1	Valcartoce x Baía	Amarelo	+	-
6. Alfa São Francisco	Alfa Tropical	Amarelo	+	-
7. Franciscana-IPA10 (5 plantas)	IPA-3 x Red Creole	Vermelho	+	+
8. Franciscana-IPA10	IPA-3 x Red Creole	Vermelho	+	+
9. Franciscana-IPA10	IPA-3 x Red Creole	Vermelho	+	+
10. Franciscana-IPA10	IPA-3 x Red Creole	Vermelho	+	-
11. Franciscana-IPA10	IPA-3 x Red Creole	Vermelho	-	+
12. Valeouro-IPA11	IPA-3 x Belém IPA-9	Amarelo	+	-
13. Brisa-IPA 12 (5 plantas)	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	+
14. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	+
15. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	+
16. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	+
17. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	-
18. Brisa-IPA 12 (5 plantas)	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	+
19. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	+
20. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	-
21. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	-
22. Brisa-IPA 12	IPA 3 x TEG 1015Y	Amarelo	+	-
23. Mutualli-IPA 8	Moçambique	Vermelho	-	+
24. Caeté	Rio Grande do Sul	Vermelho	-	+

Cinquenta anos contribuindo para a saúde da população brasileira
Guarapari - ES

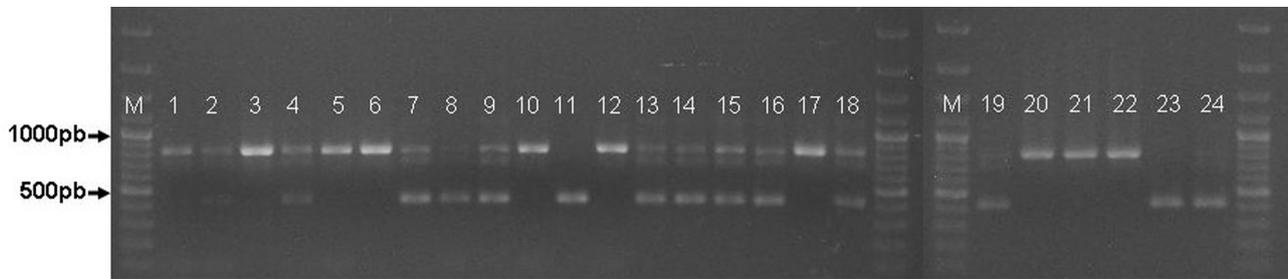


Figura 1. Padrão alélico para o gene da 'anthocyanidin synthase' – ANS em cultivares de cebola. Da esquerda para a direita: M=marcador generuler 100 bp Plus DNA (Fermentas), 1= T1613CR15, 2= T811CR13, 3= T11Boto, 4= 25CA10, 5= 7CAI-1, 6= Alfa São Francisco, 7= Amostra de cinco plantas Franciscana-IPA10, 8= Franciscana IPA-10, 9= Franciscana IPA-10, 10= Franciscana IPA-10, 11= Franciscana IPA-10, 12=Valeouro-IPA11, 13= Amostra1 de cinco plantas Brisa-IPA 12, 14= Brisa-IPA 12, 15= Brisa-IPA 12, 16= Brisa-IPA 12, 17= Brisa-IPA 12, 18= Amostra2 de cinco plantas Brisa-IPA 12, 19= Brisa-IPA 12, 20= Brisa-IPA 12, 21= Brisa-IPA 12, 22= Brisa-IPA 12, 23=Mutualli-IPA, 24=Caeté. (Allelic fingerprinting for 'anthocyanidin synthase' – ANS gene in onion populations. From left to right: M=marcador generuler 100 bp Plus DNA (Fermentas), 1= T1613CR15, 2= T811CR13, 3= T11Boto, 4= 25CA10, 5= 7CAI-1, 6= Alfa São Francisco, 7= Bulk of five plants of Franciscana-IPA10, 8= Franciscana IPA-10, 9= Franciscana IPA-10, 10= Franciscana IPA-10, 11= Franciscana IPA-10, 12=Valeouro-IPA11, 13= Bulk1 of five plants of Brisa-IPA 12, 14= Brisa-IPA 12, 15= Brisa-IPA 12, 16= Brisa-IPA 12, 17= Brisa-IPA 12, 18= Bulk2 of five plants of plantas Brisa-IPA 12, 19= Brisa-IPA 12, 20= Brisa-IPA 12, 21= Brisa-IPA 12, 22= Brisa-IPA 12, 23=Mutualli-IPA, 24=Caeté).

