

Identificação de citoplasma macho-estéril em acessos do programa de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças.

Carlos Francisco Ragassi¹; Valter R. Oliveira¹; Maria do Desterro M. dos Santos^{1;2}; Maria Esther N. F. Boiteux¹; Leonardo S. Boiteux¹; Alex L. Tosta¹

¹EMBRAPA Hortaliças, Caixa Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; ²Universidade de Brasília – UnB. E-mail: cragassi@cnph.embrapa.br, valter@cnph.embrapa.br, maria@cnph.embrapa.br, mesther@cnph.embrapa.br, boiteux@cnph.embrapa.br, alex.tosta@gmail.com

RESUMO

A síntese de híbridos de cebola depende do emprego de sistemas de macho-esterilidade citoplasmática, que permitem dispensar a prática da emasculação. Nesse contexto, o presente trabalho identificou, por meio da reação da polimerase em cadeia, o tipo citoplasmático em 93 acessos de interesse para o melhoramento genético de cebola para as condições brasileiras, pertencentes à coleção de germoplasma do programa de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças. Foi observada a presença dos três tipos de citoplasma analisados, S, N e T, com frequências de 18, 40 e 42%, respectivamente. Verificou-se, dessa forma, maior ocorrência do citoplasma T em relação aos demais tipos. Essa caracterização será útil, no âmbito do referido programa de melhoramento, cujo objetivo é gerar cultivares adaptadas às condições brasileiras.

Palavras-chave: *Allium cepa*, macho-esterilidade citoplasmática, melhoramento genético.

ABSTRACT

Identification of male-sterile cytoplasm in onion crop breeding program accessions of Embrapa Vegetables

The synthesis of onion hybrids relies upon the use of cytoplasmic male-sterility systems. This work identified, by polymerase chain reaction, the cytoplasm type of 93 accessions employed in the Onion Crop Breeding Program, of Embrapa Hortaliças, Brazil. S, N and T cytoplasm were found, among the accessions, at frequencies of 18, 40 and 42%, respectively. Therefore, the T cytoplasm appeared to be most frequent one. This information is useful in the context of the previously referred crop breeding program, which aims at generating cultivars adapted to Brazilian conditions.

Keywords: *Allium cepa*, cytoplasmic male-sterility, crop breeding.

Guarapari - ES

A produção de sementes híbridas de cebola se tornou economicamente viável a partir do descobrimento da macho-esterilidade citoplasmática (MEC), que dispensou a prática da emasculação. Dois sistemas de MEC são utilizados para essa finalidade: CMS-S (Jones & Clarke, 1943) e CMS-T (Berninger, 1965). Técnicas relativamente novas baseadas na reação da polimerase em cadeia (PCR) podem identificar os citoplasmas S e T e distingui-los do citoplasma normal (N) (Engelke et al. 2003), no entanto, muitos acessos de potencial valor como progenitores de híbridos ainda não foram caracterizados.

Nesse contexto, o presente trabalho identificou o tipo de citoplasma de 93 acessos de interesse para o melhoramento genético de cebola para as condições brasileiras, pertencentes à coleção de germoplasma do programa de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA total de 93 acessos da coleção de germoplasma do programa de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças, sediado em Brasília, DF, foi extraído de folhas jovens por meio do método CTAB 2X modificado (Boiteux et al., 1999). Quantificação, verificação da integridade do DNA e separação dos fragmentos amplificados por PCR foram realizadas por meio de eletroforese em géis de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados sobre luz ultravioleta (302 nm) em sistema de vídeo Eagle Eye™ (StratageneR).

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores GeneAmp PCR System 9700 conforme descrito no trabalho original (Engelke et al., 2003), com uso do marcador 5' *cob* (Sato, 1998), constituído pelos "primers": S específico (5'-GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT-3'), N específico (5'-TCTAGATGTTCGCATCAGTGGAAATCC-3') e comum (5'-CTTTTCTATGGTGACAACCTCCTCTT-3') para identificação do citoplasma S e posterior aplicação do marcador *orfA501* (Engelke et al., 2003), em que se aplicaram os "primers" 1 (5'-ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3') e 2 (5'-CCAAGCATTGGCGCTGAC-3') aos acessos negativos para o citoplasma 'S', de forma a distinguir entre os indivíduos normais (citoplasma 'N') e os portadores do citoplasma T. As reações com os marcadores 5' *cob* constaram de: a) um ciclo inicial de 2,0 minutos a 94°C, b) 40 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 1,0 minuto a 53°C, e 2,0 minutos a 72°C, e c) um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Para o marcador *orfA501* adotou-se: a) um ciclo inicial de 2,0 minutos a 94°C, b) 40 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 1,0 minuto a 60°C e 2,0 minutos a 72°C, e c) um ciclo final de 5 minutos a 72°C.

A identificação dos citoplasmas N, S e T baseou-se em Engelke et al. (2003), ou seja, foi caracterizada como portadora do citoplasma N a amostra que apresentou exclusivamente um fragmento de 180 pb na aplicação do marcador 5' *cob* sem a amplificação de outro fragmento na aplicação do marcador *orfA501*. As amostras portadoras de citoplasma S foram caracterizadas pela amplificação dos fragmentos de 180 e 414 pb pelo marcador 5' *cob* e, finalmente, identificaram-se como portadores do citoplasma T os indivíduos que apresentaram os fragmentos de 180 e de 473 pb na aplicação dos marcadores 5' *cob* e *orfA501*, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 93 acessos estudados, foi observada a presença dos três tipos de citoplasma, S, N e T (Tabela 1), com freqüências de 18, 40 e 42%, respectivamente. Dessa forma, verifica-se, nessa população, maior ocorrência do citoplasma T em relação aos demais tipos.

O sistema CMS-T é considerado uma fonte secundária de macho-esterilidade e é utilizado para produção de sementes híbridas de cebola na Europa (Havey, 2000). Já o CMS-S, é amplamente utilizado por produtores de sementes (Havey, 2000), pois o fenótipo

macho-estéril é resultante da interação de apenas um loco nuclear com o fator citoplasmático (Jones & Clarke, 1943) ao passo que no sistema CMS-T, o fenótipo é determinado de forma mais complexa, pela interação do citoplasma estéril com três *loci* nucleares que segregam independentemente (Schweisguth, 1973), sendo, portanto, mais difícil de ser manejada no âmbito de um programa de melhoramento genético.

Finalmente, a caracterização do citoplasma dos 93 acessos promissores para o melhoramento genético de cebola será útil para o planejamento desse programa na Embrapa Hortaliças, no sentido de gerar cultivares adaptadas para as condições brasileiras.

REFERÊNCIAS

BERNINGER E. Contribution a l'étude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa* L.). *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 15: 183-199, 1965.

BOITEUX LS, FONSECA MEN, SIMON PW. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of American Society for Horticultural Science*, 124: 32-38, 1999.

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*, 107: 162-167, 2003.

HAVEY MJ. Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 778-782, 2000.

JONES HA, CLARKE AE. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 43: 189-194, 1943.

SATO Y. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*: 96: 367-370, 1998.

SCHWEISGUTH B. Etude d'un nouveau type de stérilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 23: 221-233, 1973.

Guarapari - ES

Tabela 1. Tipo citoplasmático em acessos de cebola empregados no melhoramento genético para condições brasileiras. Cytoplasm type in onion accessions employed in crop breeding for Brazilian conditions. Embrapa Hortaliças, 2010.

Acesso	Citoplasma			Acesso	Citoplasma			Acesso	Citoplasma		
	N	S	T		N	S	T		N	S	T
485A		X		444B	X			472B	X		
429A			X	450B			X	6152B	X		
427A		X		412B	X			446B	X		
6120			X	462B	X			468B	X		
6138		X		6279	X			6139B	X		
467A			X	438B	X			437A			X
6140A		X		488B	X			496A			X
6126A			X	6257		X		441A			X
425A			X	484B	X			480B	X		
6118			X	6143B	X			442B	X		
471A			X	404B	X			420B	X		
445A			X	6139	X			424B	X		
6110			X	416B	X			6259	X		
6136A		X		6140		X		6145		X	
6260A		X		615A			X	6109		X	
6146		X		403A		X		483A			X
423A			X	6143A		X		482B			X
419A			X	6128			X	491A			X
479A			X	6136		X		3269A		X	
414B	X			411A			X	417A			X
486B	X			449A			X	469A			X
430B	X			443A			X	428B	X		
413A			X	451A			X	458B	X		
481A			X	6258		X		6266		X	
439A			X	487A			X	6137			X
489A			X	6280			X	470B	X		
492B	X			461A			X	6119			X
440B			X	6135	X			496B	X		
490B	X			6117			X	418B	X		
6135	X			6265	X			434B	X		
452B	X			426B	X			3269B			X