

Comparação de sistemas de marcadores moleculares para distinção de citoplasma normal (N) e macho-estéril (S) em cebola.

Anne Giselle Roma Buzar¹; Maria Esther de Noronha Fonseca¹; Valter Rodrigues Oliveira¹; Leonardo S. Boiteux^{1,3*}

¹Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Agronomia e Veterinária (FAV), 70910-900 Brasília (DF); ²Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970 Brasília-DF; ³Bolsista CNPq; E-mail: boiteux@cnph.embrapa.br

RESUMO

A estrutura floral da cebola (*Allium cepa* L.) demanda a utilização de linhagens com macho-esterilidade (ME) citoplasmática produção comercial de híbridos. Marcadores moleculares baseados em PCR têm sido desenvolvidos para detectar polimorfismos entre citoplasmas macho-estéril (S) e normal (N) tanto no DNA mitocondrial (mtDNA) quanto no DNA de cloroplasto (cpDNA). O presente estudo apresentou uma análise comparativa da eficiência na determinação do tipo de citoplasma dos três principais sistemas de marcadores moleculares disponíveis em cebola [(HAVEY, 1995; SATO, 1998 e ENGELKE *et al.* (2003)]. Cinco variedades de cebola ('Alfa Tropical'; 'Diamante'; 'Roxa IPA-3'; 'Beta Cristal' e 'São Paulo'), as quais os tipos de citoplasma não haviam sido ainda caracterizados, foram utilizadas neste estudo. De modo geral, o emprego da metodologia de Engelke *et al.* (2003) mostrou-se a mais confiável e de mais fácil interpretação/distinção de plantas com citoplasma S e N. Sua utilização poderá facilitar o desenvolvimento de híbridos para estas regiões de cultivo, embora melhorias neste sistema de marcador possam ainda ser implementadas.

Palavras-chave: *Allium cepa*, cebola, metodologia, macho-esterilidade, híbridos.

ABSTRACT – Comparison of molecular markers systems for identification of male-sterile cytoplasm in onion.

The employment of male sterile lines is crucial for onion (*Allium cepa* L.) hybrid seed production. Distinct molecular marker systems employing polymerase chain reaction (PCR) are able to identify mitochondrial DNA (mtDNA) as well as chloroplast DNA (cpDNA) polymorphisms between normal (N) and sterile (S) onion lines. However, the comparative analysis of the relative efficiency of the three

major molecular markers systems for identification of male-sterile cytoplasm in onion [(HAVEY, 1995; SATO, 1998 and ENGELKE et al. (2003)]. has not been extensively done. Five onion cultivars ('Alfa Tropical'; 'Diamante'; 'Roxa IPA-3'; 'Beta Cristal' and 'São Paulo'), with uncharacterized cytoplasm types, were employed in the present study. Overall, the employment of the PCR primers designed by Sato (1998) in a methodology essentially as described by Engelke *et al.* (2003) was found to be the most reliable approach for large scale detection of male-sterile cytoplasm. The prompt identification of S cytoplasm in Brazilian cultivars adapted to tropical regions will be an important tool aiming to development of hybrids for these areas, even though improvements in this marker system methodology could be implemented.

Keywords: *Allium cepa*, methodology, hybrid, male-sterility, onion.

INTRODUÇÃO

Em cebola (*Allium cepa* L.), linhagens macho-estéreis (ME) são indispensáveis na produção comercial de híbridos permitindo obter sementes sem a necessidade de emasculação. O método convencional para distinguir o citoplasma e o genótipo nuclear de uma planta fértil envolve cruzamentos com plantas ME seguido de testes de progênie. Sendo o fator citoplasmático da ME maternalmente transmitido, polimorfismos nos genomas do cloroplasto e da mitocôndria podem ser empregados para distinguir os citoplasmas N e S. Uma nova geração de marcadores moleculares de menor custo operacional foi obtida via PCR com "primers" desenhados para anelar nas regiões polimórficas do cpDNA (HAVEY, 1995) e mtDNA [(SATO, 1998 e ENGELKE *et al.* (2003)] de cebolas N e S. No presente estudo foi conduzida uma análise comparativa destes três sistemas de marcadores moleculares disponíveis para análise da ME em cebola visando identificar o mais apropriado para análise destes citoplasma em nossas condições.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de 40 plantas das cultivares 'Alfa Tropical'; 'Diamante'; 'Roxa IPA-3'; 'Beta Cristal' e 'São Paulo', cujos os tipos de citoplasma não haviam sido caracterizados, foram coletadas para extração de DNA. Foram utilizados nas reações de PCR os "primers" 'A' e 'B' na metodologia de Havey (1995); os

“primers” ‘S’ (estéril) ‘N’ (normal) e ‘C’ (comum) na metodologia de Sato (1998). Os “primers” de Sato (1998) foram também utilizados conforme a metodologia de Engelke *et al.* (2003). As reações de amplificação com foram essencialmente aquelas descritas nos trabalhos originais As amplificações foram realizadas em um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700). Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de 1,5% de agarose (Gibco-BRL) em tampão TAE 1X e documentados como descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas de ‘Roxa - IPA 3’, ‘Diamante’ e ‘Alfa Tropical’ apresentaram amplicons de 1,2 kb indicando a presença exclusiva de citoplasma N (HAVEY, 1995). Todas as plantas da cultivar ‘São Paulo’ apresentaram bandas com 1,1 kb indicando a presença exclusiva de citoplasma S. O conjunto de “primers” de Sato (1998) confirmou estas informações para ‘São Paulo’. Na cultivar ‘Beta Cristal’, os três sistemas de marcadores foram concordantes em caracterizá-la como tendo uma mistura de plantas com citoplasmas do tipo N e S (Figura 1, Tabela 1). Utilizando a metodologia de Engelke *et al.* (2003), os resultados obtidos em termos de classificação do tipo de citoplasma foram concordantes com aqueles visualizados com os “primers” de Sato (1998) e Havey (1995) para as ‘Roxa IPA-3’, ‘Diamante’ e ‘Alfa Tropical’, confirmando, desta forma, a quase exclusiva presença de citoplasma N nestas cultivares. De modo geral, o emprego da metodologia de Engelke *et al.* (2003) com “primers” desenhados por Sato (1998) mostrou-se a mais confiável e de mais fácil interpretação/distinção de plantas com citoplasma S e N. Um fator complicador é a necessidade de identificação da eventual presença do citoplasma T. De qualquer, forma a utilização desta técnica poderá facilitar o desenvolvimento de híbridos para estas regiões de cultivo.

LITERATURA CITADA

ENGELKE T; TEREFE D; TATLIOGLU T. 2003. A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.107, p. 162-167.

HAVEY MJ. 1995. Identification of cytoplasms using the polymerase chain reaction to aid the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theoretical and Applied Genetics*, v.90, p. 263-268.

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

Tabela 1 – Descrição dos padrões de amplificação do diferentes tipos de citoplasma (N e S) observados na cultivar 'Beta Cristal' quando utilizando os sistemas de marcadores de Havey (1995), Sato (1998) e Engelke *et al.* (2003).

Tipo de Citoplasma	Metodologia, tamanho (pb) e intensidade dos amplicons.			
	Havey (1995)	Sato (1998)	Engelke <i>et al.</i> (2003)	
Citoplasma S	1.100	410	410	Mais intenso
			180	Menos intenso
Citoplasma N	1.200	180	180	Mais intenso
			410	Menos intenso

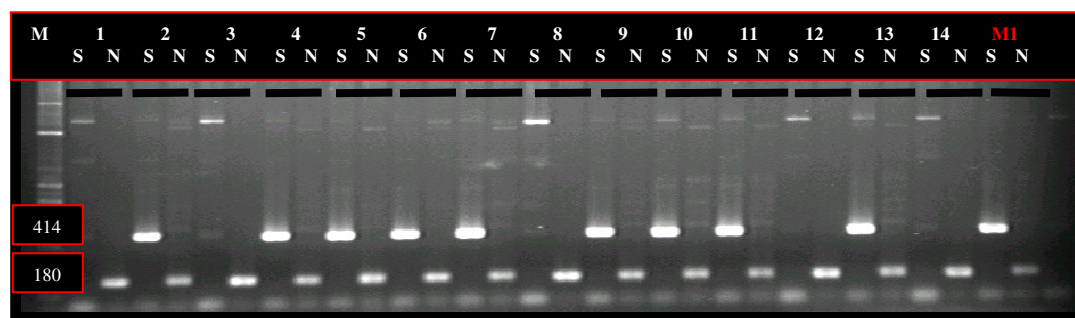


Figura 1 - Perfil em gel de agarose a 1,5%, demonstrando os marcadores citoplasmáticos utilizando os “primers” estéril (S) e fértil (N) de Sato (1998) em 14 plantas de 'Beta Cristal'. M1 = DNA de planta com citoplasma estéril com “primer” S (414pb) e com “primer” N (180pb) e M = Marcador molecular de 100 pb.