

## **Análise via PCR de germoplasma de cebola empregando marcadores moleculares derivados de genes análogos de resistência a doenças.**

**Anne Giselle R. Buzar<sup>1,2</sup>; Maria do Desterro M. dos Santos<sup>1</sup>; Maria Esther de Noronha Fonseca<sup>1</sup>; Valter Rodrigues Oliveira<sup>1</sup>; Ailton Reis<sup>1</sup>; Antonio C. Torres<sup>1</sup>; Leonardo S. Boiteux<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília, DF;

<sup>2</sup>Universidade de Brasília(UnB), Faculdade de Agronomia e Veterinária (FAV), 70359-970, Brasília, DF;

<sup>3</sup>Bolsista CNPq. E-mail: boiteux@cnph.embrapa.br

### **RESUMO**

A cultura da cebola é afetada por um grande número de doenças e alguns genes de resistência têm sido descritos nesta espécie. Alguns dos genes de resistência de plantas a patógeno já isolados apresentam homologia entre si e estas similaridades estruturais possibilitaram a estratégia de amplificar via PCR, fragmentos genômicos análogos aos genes de resistência em distintas espécies. Objetivo deste trabalho foi conduzir uma análise do tipo "fingerprinting" de uma coleção germoplasma de cebola utilizando o sistema de marcadores "DR Analogs". Este germoplasma é composto por acessos adaptados a regiões tropicais e com diferentes respostas a antracnose e ao míldio. Foi empregada uma estratégia de amplificação via PCR heterólogo com dez combinações de "primers". Um total 66 amplicons passíveis de serem anotados foram obtidos. O número de amplicons por primer variou de quatro até 12. Diferenças foram observadas para os padrões dos amplicons entre os diferentes acessos, porém em um nível relativamente baixo para uma espécie alógama como a cebola. Uma análise empregando um conjunto mais amplo de "primers" DR está em andamento. Um sub-grupo de amplicons (polimórficos ou não) está sendo purificado e clonado visando uma caracterização mais refinada incluindo análise de seqüência. Todas estas populações possuem adaptação a uma ou mais regiões tropicais e apresentam diferentes tipo de resposta a infecção por patógenos. Desta forma, estes marcadores poderão ser úteis em trabalhos de mapeamento genético e poderão dar subsídios no processo de identificação de materiais com resistência múltipla a doenças.

**Palavras-Chave:** *Allium cepa*, marcadores moleculares, caracterização de cultivares.

**ABSTRACT – Fingerprinting onion germplasm using PCR markers derived from resistance gene analog primers.**

Onion (*Allium cepa* L.) is affected by a large number of diseases and sources of resistance to important pathogens have been identified in cultivated and wild relative accessions. Resistance gene analogs (RGA) is a novel class of PCR-based molecular

markers developed by converting the genetic information of conserved motifs present in resistance genes into universal primers that are potentially able to amplify similar genomic segments in distinct plant species. However, there is so far no report of cloned resistance genes as well as the employment of the RGA marker system in onion. In the present work, the RGA marker system was employed in fingerprinting assay of 24 onion accessions. A total of 66 scorable amplicons were obtained with the number of amplicons per primer ranging from four to 12. It was observed very uniform RGA amplicon patterns. An analysis employing a large set of DR primers is now underway. This is the first report of the usefulness of the RGA marker system in fingerprinting onion cultivars. In addition, the availability of RGA markers (commonly linked to disease resistance gene clusters in several plant species) might be potentially useful in marker-assisted programs aiming for the development of disease resistance onion cultivars.

**Keywords:** *Allium cepa*, molecular markers, fingerprinting, genetic diversity, resistance.

## **INTRODUÇÃO**

A cebola (*Allium cepa* L.) é afetada por um grande número de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides e alguns genes de resistência têm sido descritos nesta espécie (KIK, 2002). Genes de resistência de plantas a patógeno apresentam homologia entre si, particularmente em certos domínios conhecidos, tais como as repetições do aminoácido de leucina, ou LRR ("leucine rich repeats"), e os sítios de adesão de nucleotídeos ou NBS ("nucleotide binding sites") (BENT, 1996). A descoberta destas similaridades estruturais possibilitou a interessante estratégia pela qual a esta informação de seqüência pode ser usada para gerar oligonucleotídeos capazes de amplificar, em distintas espécies, fragmentos genômicos análogos aos genes de resistência via PCR (LEISTER *et al.*, 1996). Objetivo deste trabalho foi conduzir uma análise do tipo "fingerprinting" com o sistema de marcadores "DR Analogs" utilizando uma coleção germoplasma contendo acessos adaptados a regiões tropicais e com diferentes respostas a antracnose e míldio (*Peronospora destructor*).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para o isolamento de "DR analogs", 24 variedades/híbridos de cebola foram utilizados: 'Chata Roxa'; 'IPA 3'; 'Valenciana 14'; 'Beta Cristal'; 'Diamante'; 'IPA 6'; 'Roxa'; 'Aurora'; 'Bojuda de Rio Grande'; 'Alfa-Tropical'; 'IPA 4'; 'São Paulo'; 'Primavera'; 'Mercedes'; 'IPA 9'; 'Crioula'; 'Conquista'; 'Pira Ouro'; 'Vale Ouro'; 'Franciscana'; 'Serrana'; 'CNPH 6400'; 'Petrolina' e 'Baia Periforme'. O DNA total foi purificado a partir de tecido de folhas jovens utilizando-se o método de CTAB 2X com solventes orgânicos. Foi utilizada uma estratégia de amplificação via PCR heterólogo com dez

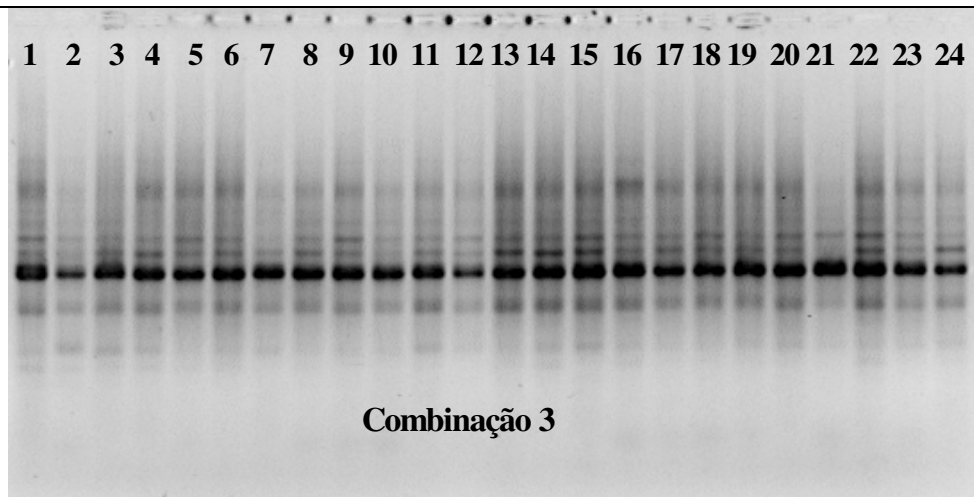
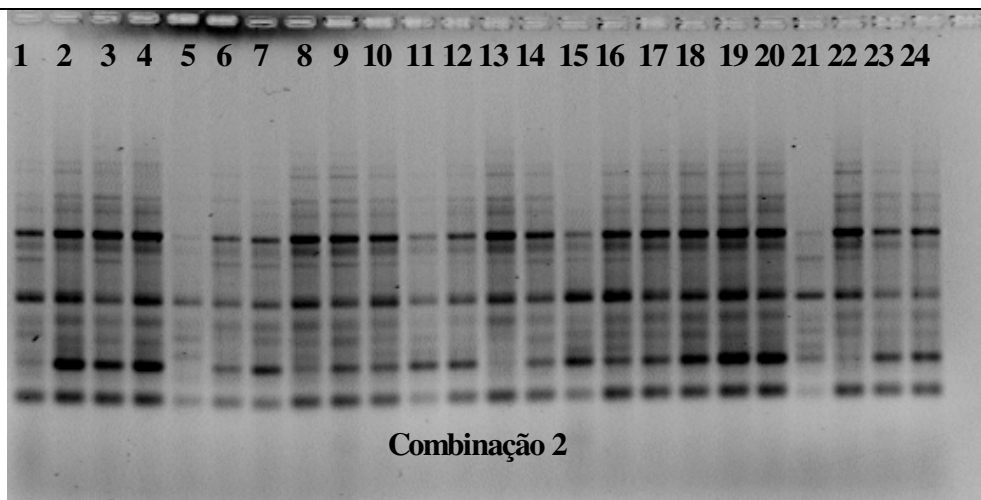
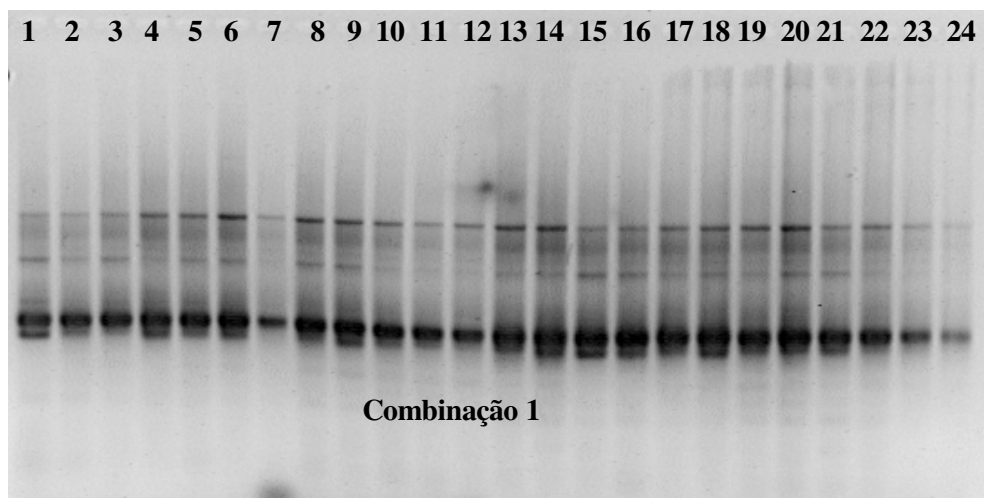
combinações de “primers” do tipo DR Analogs (S2xAs1; S2xAs2; S2xAs3; S2xLM637; S2xR1; F1xAs1; F1xAs2; F1xAs3; F1xLM637; F1xR1) desenhados para o motivo (NBS) (PAN *et al.*, 2000). As reações de amplificação de DNA foram as padrões para PCR, sendo realizadas em um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) programado para um ciclo de cinco minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos repetidos nas seguintes condições: 30 segundos a 95°C (desnaturação), 1 minuto a 45°C (anelamento) com ramp 70% e três minutos a 72°C (extensão). Após, foi efetuado um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) em tampão TAE 1X, fotodocumentados e analisados de acordo com os padrões produzidos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Diferenças foram observadas entre os diferentes acessos, porém em um nível baixo para uma espécie alógama como a cebola (Figura 1). Um subgrupo de amplicons (polimórficos ou não) está sendo purificado e clonado visando uma caracterização de seqüência. A disponibilidade de marcadores moleculares associados com características relevantes para o melhoramento genético da cebola permite facilitar a incorporação de caracteres de interesse em populações elite. Todas as populações avaliadas possuem adaptação a regiões tropicais e apresentam diferentes tipos de resposta a patógenos. Desta forma, estes marcadores poderão ser úteis em mapeamento genético e em sistemas de caracterização de germoplasma. Além disso, poderão subsidiar o processo de definir e/ou maximizar potenciais cruzamentos heteróticos e viabilizar busca de parentais de melhores características agronômicas visando o desenvolvimento de híbridos com resistência múltipla a doenças.

## **LITERATURA CITADA**

- BENT AF. 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell*, v.8, p. 1757-1771,
- KIK, C. 2002. The exploration of wild relatives for the breeding of disease and pest resistant onion cultivars. *In: V Jornada Científica de Cebola do Mercosul. Embrapa-Clima Temperado*. p. 12-13.
- LEISTER D; BALLVORA A; SALAMINI F; GEBHARDT C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, v.14, p.421-429.
- PAN Q; LIU YS; BUDAI-HADRIAN O; SELA M; CARMEL-GOREN L; ZAMIR D; FLUHR R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. *Genetics* v.155, p.309-322.



**Figura 1.** Padrão de bandas de DNA de cebola amplificados com combinações de *primers DR-analogs* em gel de agarose 1,4%. Os números correspondem a origem do DNA: (1)Chata Roxa; (2) Roxa IPA 3; (3) Valenciana-14; (4) Beta Cristal; (5) Diamante; (6) Composto IPA 6; (7) Roxa; (8) Aurora; (9) Bojuda Rio Grande; (10) Alfa Tropical; (11) Pêra IPA-4; (12) São Paulo; (13) Primavera; (14) Mercedes amarela; (15) Belém IPA-9; (16) Crioula; (17) Conquista; (18) Pira Ouro; (19) Vale Ouro IPA 11; (20) Franciscana IPA 10; (21) Serrana; (22) CNPH 6400; (23) Petroline e (24) Baia Periforme.