

Identificação do citoplasma “T” via PCR na cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco

Carlos Antonio F. Santos¹; Daniela Lopes Leite²; Nivaldo D. Costa¹; Valter Rodrigues Oliveira³.

¹Embrapa Semi-Árido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br;

²Embrapa Clima Temperado Caixa Postal 403, Pelotas, RS; ³Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218, 70359-970, Brasília, DF.

RESUMO

A identificação do tipo de citoplasma estéril em cebola foi tremendamente facilitada com a publicação de *primers* que possibilitam a identificação do tipo de citoplasma. O objetivo do presente trabalho foi a identificação do tipo de citoplasma presente na cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco de forma orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola para o nordeste do Brasil. DNA genômico total foi isolado de plantas de cebola segundo protocolo CTAB 2x. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 0,25 µM de cada *primer*, 150 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 unidades da enzima DNA polimerase da Biometrix na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 1,4 µL do DNA total, não quantificado. As seqüências dos *primers* foram: *primer* S: GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT; *primer* N: TCTAGATGTGCGCATCAGTGGAAATCC; *primer* comum: CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT e *primers* do Engelke ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC e CCAAGCATTGGCGCTGAC. Na amostra de 19 plantas da cultivar BRS Alfa São Francisco observou-se a amplificação de produtos consistentes com os fragmentos de 180 pb dos primers do N + Comum, ausência do fragmento de 414 bp dos *primers* S + Comum, bem como a amplificação de fragmento de 473 pb dos *primers* do Engelke, indicando que o citoplasma presente nesta população é o citoplasma T. Foi também identificada a presença de citoplasma N. Estes resultados confirmam as avaliações anteriores e indicam a possibilidade do desenvolvimento de híbrido tropical, tendo como base a cultivar BRS Alfa São Francisco.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, PCR, híbrido.

ABSTRACT- Identification of onion cytoplasm T via PCR in the BRS Alfa São Francisco cultivar.

The identification of the sterile cytoplasm type was facilitated by the development of primers specific to onion cytoplasm type. The goal of this work was the identification of the cytoplasm type in the onion cultivar BRS Alfa São Francisco in order to facilitate the development of onion hybrids to the Northeast Brazil. Total genomic DNA was extracted

according to the CTAB 2x protocol. The PCR reaction was done to a final volume of 25 μ L (0,25 μ M of each primer, 150 μ M of each dNTP, 1,5 mM of MgCl₂, 0,2 units of DNA polymerase in reaction buffer recommended by the supplier and 1,4 μ L of total DNA). The primers sequences were: primer S: GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT; primer N: TCTAGATGTGCGCATCAGTGGAATCC; primer common: CTTTTCTATGGTGACAACCTCCTT and Engelke primers ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC and CCAAGCATTGGCGCTGAC. In the sample of 19 plants of the BRS Alfa São Francisco cultivar was observed the amplification of fragments consistent with the 180 bp of N + C primers, absence of the fragment of 414 bp of S + Common and presence of fragment of 473 bp of Engelke primers, indicating that the cytoplasm of the population is the "T". It is also identified plants with cytoplasm N. These results are consistent with previous works and they suggest the possibility to develop a tropical onion hybrid, based on the BRS Alfa São Francisco cultivar.

Keywords: *Allium cepa*, PCR and hybrids.

INTRODUÇÃO

O sistema citoplasma macho-estéril (CMS) é a base para a produção de híbridos de cebola. Em adição ao citoplasma N macho-fértil, três outros têm sido identificados em cebola: a) S – identificado na população *Italian Red*; b) C – identificado na população *Rijnsburger*, e c) T – identificado na população *Jaune paille des vertus* (Szklarczyk et al. 2002). A fertilidade é restaurada por um alelo dominante (*Ms*) no sistema CMS-(S) e por três loci que segregam independentemente no sistema CMS-(T) (Havey, 1995). Apenas os sistemas CMS-(S) e o CMS-(T) são usados para a produção comercial de híbridos (Engelke et al., 2003).

A identificação de diferentes tipos de citoplasmas foi facilitada com a aplicação de marcadores de DNA em reações de "Polymerase Chain Reaction" (PCR): 1. os *primers* desenvolvidos por Sato (1998) levam em consideração reordenações na proximidade com o gene mitocondrial *cob* e 2) os primers desenvolvidos por Engelke et al. (2003) consideram quiméricas mitocôndrias CMS específicas de cebolinha (*Allium schoenoprasum*).

O objetivo do presente trabalho foi à identificação do tipo de citoplasma presente na cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco de forma a orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola para o nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA genômico total foi isolado de folhas de cebola, segundo protocolo CTAB 2x: em torno de 0,2 g folhas, mantidas a -80 °C, foram maceradas na presença de nitrogênio

líquido em almofariz de porcelana, tratados previamente em ácido clorídrico 3 N. O pó foi transferido para uma solução extratora de 0,9 mL de CTAB 2% (500 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, CTAB 2% (p/v), 0,2 % beta-mercaptoethanol, 20 mM de EDTA) e incubado a 65 °C por 50 minutos. Após os demais procedimentos, o “pellet” de DNA total foi colocado para secar a temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 120 mL de tampão TE. A integridade do DNA total foi observada em gel de agarose 1,5 %, sendo estocada a –20 °C.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 0,25 µM de cada *primer*, 150 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 unidades da enzima DNA polimerase da Biometrix na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 1,4 µL do DNA total (não quantificado). As seqüências dos *primers* publicados por Sato (1998) foram: *primer* S: GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT; *primer* N: TCTAGATGTGCGCATCAGTGGGAATCC e *primer* comum: CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT. Para os *primers* publicados por Engelke et al. (2003) as seqüências dos *primers* foram: *primer* 1: ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC e *primer* 2: CCAAGCATTTGGCGCTGAC. As reações foram incubadas em termociclador segundo o protocolo de Engelke et al. (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de identificação dos citoplasmas N, S e T envolve PCR com os *primers* do Engelke et al. (2003) e do Sato (1998): 1) N – presença do fragmento de 180 pb do *primer* do Sato e ausência dos demais fragmentos; 2) CMS-(S) – presença dos fragmentos de 180 e 414 pb do Sato e de 473 pb do Engelke; e 3) CMS-(T) – presença dos fragmentos de 180 pb do Sato e de 473 pb do Engelke e ausência do fragmento de 414 do Sato.

Na amostra de 19 plantas da cultivar BRS Alfa São Francisco observou-se a amplificação de produtos consistentes com os fragmentos de 180 pb dos *primers* do Sato, bem como a amplificação de fragmento de 473 pb dos *primers* do Engelke (Fig. 1), indicando que o citoplasma presente nesta população é o citoplasma T. Foi também identificada a presença de citoplasma N.

Estes resultados confirmam as avaliações anteriores (Santos et al., 2005) e indicam a possibilidade do desenvolvimento de híbrido tropical, tendo como base a cultivar BRS Alfa São Francisco.

LITERATURA CITADA

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*, v. 107, p.162–167, 2003.

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

SZKLARCZYK, M; SIMLAT, M; JAGOSZ, B.; BA, G. The use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding. *Cellular & Molecular Biology Letters*, v 7, p.625-634, 2002.

SANTOS, CAF; LEITE, DL; SANTOS, GM; COSTA, ND; ANTHONISEN, D.; QUEIROZ, MA de; OLIVEIRA, VR. Identificação de linhas macho-estéreis e mantenedoras da macho-esterilidade na cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2005, Fortaleza 45°. CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Olericultura, 2005. v. 23. cd-rom

SATO, Y. 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, 1998.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do BNB-Etene-Fundeci

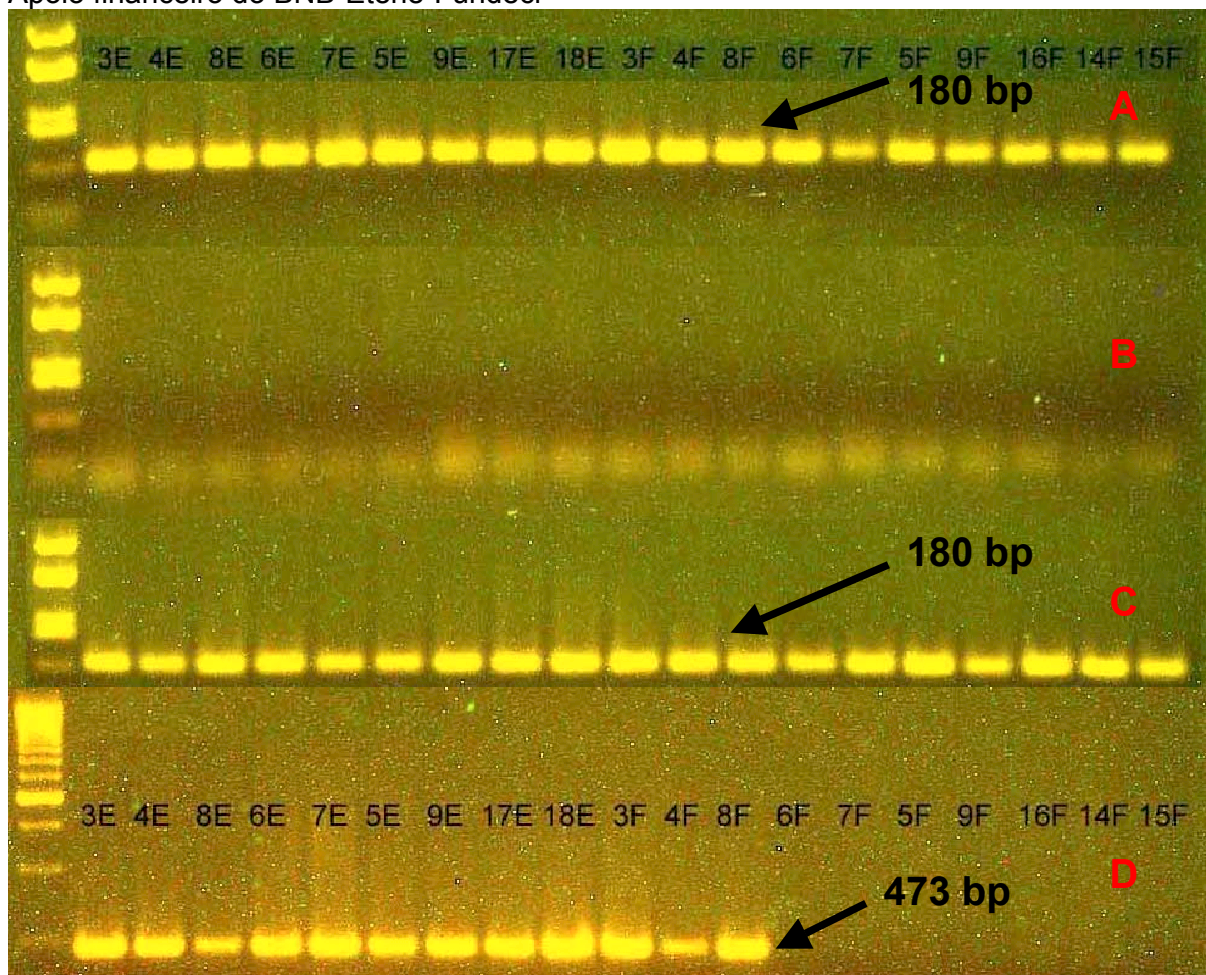


Figura 1. Fragmentos de 19 amostras de cebola amplificados com os primers N + Comum (painel A); S + Comum (painel B); N + S + Comum (painel C) publicados por Sato (1998) e primers publicados por Engelke (2003) (painel D). A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Amresco DNA MicroMarker (painéis A, B e C) e padrão de 500 da Invitrogen (painel D). Petrolina, PE, 2006.