

pesquisa

SANTOS CAF; LEITE DL; COSTA ND; OLIVEIRA VR; SANTOS ICN; RODRIGUES MA. 2008. Identificação dos citoplasmas “S”, “T” e “N” via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira* 26:308-311.

Identificação dos citoplasmas “S”, “T” e “N” via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco

Carlos Antonio F Santos¹; Daniela L Leite²; Nivaldo D Costa¹; Valter R Oliveira³; Ierla Carla N dos Santos⁴; Marciene A Rodrigues⁴

¹Embrapa Semi-Árido, C. Postal 23, 56302-970 Petrolina-PE; ²Embrapa Clima Temperado, C. Postal 403, 96001-970 Pelotas-RS;

³Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; ⁴Bolsistas Embrapa Semi-Árido; casantos@cpatsa.embrapa.br; daniela@cpart.embrapa.br; valter@cnpn.embrapa.br

RESUMO

A identificação do tipo de citoplasma em cebola foi facilitada com a publicação de *primers* de DNA específicos para os tipos “S”, “T” e “N”. O objetivo do presente trabalho foi identificar, por meio de marcadores moleculares, o tipo de citoplasma presente na cultivar de cebola BRS São Francisco e numa população experimental em desenvolvimento na Embrapa Semi-Árido, de forma a orientar o desenvolvimento de híbridos de cebola adaptados à região. Na amostra de 19 plantas da ‘BRS Alfa São Francisco’ observou-se a amplificação de fragmentos de 180 pb, ausência do fragmento de 414 pb com os *primers* 5’ *cob* e a amplificação do fragmento de 473 pb dos *primers* *OrfA501*, indicando que o citoplasma presente nesta população é o citoplasma T. Foi também identificada a presença de citoplasma N na população BRS Alfa São Francisco. Na amostra de 44 plantas da população experimental cascuda-bronzeada observou-se a amplificação de produtos consistentes com os fragmentos de 180 e 414 pb dos *primers* 5’ *cob*, bem como a amplificação de fragmento de 473 pb dos *primers* *OrfA501*, indicando que o citoplasma presente na população é o citoplasma S. Não foi identificada a presença de citoplasma N na população cascuda-bronzeada. Estes resultados indicam a possibilidade do desenvolvimento de híbrido tropical, tendo como base a cultivar BRS Alfa São Francisco, enquanto que, na população cascuda-bronzeada será necessário a introgressão do citoplasma “N” para o desenvolvimento de linhagens mantenedoras.

Palavras-chave: *Allium cepa*, macho-esterilidade, PCR, híbrido.

ABSTRACT

Identification of “S”, “T” and “N” cytoplasm via PCR in onion populations in the Sao Francisco river Valley, Brazil

The identification of the onion cytoplasm was obtained by the development of DNA specific *primers* to “S”, “T” and “N” types. The goal of this work was the identification of the cytoplasm type in two different onion populations in the São Francisco river Valley, in order to facilitate the development of onion hybrids from Northeast Brazil. In the sample of 19 plants of the BRS Alfa São Francisco cultivar was observed the amplification of fragments of 180 bp and absence of the fragment of 414 bp of the 5’ *cob* primers and the presence of fragment of 473 bp of the *orfA501* primers, indicating that the cytoplasm of the population is the “T”. Plants with cytoplasm N were also identified in the BRS Alfa São Francisco population. The amplification of consistent fragments with the 180 and 414 bp of 5’ *cob* primers was observed in the sample of 44 plants of a Valenciana type population and, the presence of a fragment of 473 bp of *orfA501 primers*, indicating that the cytoplasm of the population is the “S”. No plant with cytoplasm N was identified in the Valenciana population. The development of a tropical onion hybrid is possible, based on the BRS Alfa São Francisco cultivar, while in the Valenciana type, the introgression of N cytoplasm will be necessary.

Keywords: *Allium cepa*, male-sterility, PCR, hybrids.

(Recebido para publicação em 26 de novembro de 2006; aceito em 4 de julho de 2008)

No Nordeste, mais especificamente nos estados da Bahia e Pernambuco, são produzidas cerca de 185 mil toneladas de cebola por ano, o que equivale a cerca de 18% da produção nacional, numa área de aproximadamente 10 mil ha. Mais de 70.000 pessoas da região, direta e indiretamente, vivem desta cultura. O programa de melhoramento genético de cebola da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), iniciado em 1972, resultou na substituição de cerca de 90% das sementes importadas usadas na região (Costa *et al.*, 1999), tendo-se con-

centrado no desenvolvimento de populações de cebola amarela e de cebola roxa.

Dowker (1990) relata que a produtividade dos híbridos de cebola tem sido de até 192% em relação ao parental mais produtivo e de até 367% em relação a algumas cultivares de polinização aberta. Apesar desta superioridade, o plantio de híbridos de cebola é bastante reduzido no Nordeste brasileiro, em consequência do alto preço das sementes, que é pelo menos quatro vezes maior que o das sementes de cultivares de polinização aberta. A maioria dos híbridos

foi desenvolvida em outros países, podendo apresentar suscetibilidade a doenças, como o mal-de-sete-voltas, causado pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os sistemas de macho-esterilidade gênico-citoplasmáticas (CMS) são a base para a produção de híbridos de cebola, que requer a identificação de linhagens macho-estéreis, linhagens mantenedoras da macho-esterilidade e de linhagens polinizadoras com boa capacidade de combinação, sendo essas linhagens conhecidas como A, B e C, respectivamente. Linhagens macho-es-

téreis (Smsms) podem ser mantidas por sementes quando cruzadas com uma linhagem mantenedora, a qual possui citoplasma normal (N) para macho-fertilidade e genótipo msms para o loco restaurador da fertilidade, no sistema CMS-(S) descrito por Jones & Clarke (1943).

Em adição ao citoplasma N macho-fértil, três outros macho-estéreis foram 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* (Breninger, 1965). 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). Pouco tem sido reportado sobre o sistema CMS-(C) (Szkłarczyk *et al.*, 2002).

A identificação de diversos tipos de citoplasma associados à macho-esterilidade em cebola foi facilitada com a aplicação de marcadores de DNA utilizando-se a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Havey, 1995; Sato, 1998; Engelke *et al.*, 2003). O marcador *orfA501* (Engelke *et al.* 2003), que foi desenvolvido a partir de uma sequência específica para identificação de citoplasma macho estéril em cebolinha, é amplificado na presença dos citoplasmas S e T em cebola, mas não na presença do citoplasma N, macho fértil. Utilizando-se a combinação dos marcadores 5'cob (Sato, 1998) e *orfA501* pode-se distinguir entre os três citoplasmas (S, T ou N) em plantas individuais poucas semanas após a semeadura (Engelke *et al.*, 2003).

O sistema de macho-esterilidade gênico-citoplasmática (CMS), baseado no citoplasma S, vem sendo utilizado há muito tempo, seja com os laboriosos e demorados cruzamentos testes de campo, ou com apoio de reações de PCR pós 1998. Porém, dados de CMS com citoplasma T são raros, pois até 2003 não era possível distinguir o citoplasma T do citoplasma N por métodos moleculares.

O objetivo do presente trabalho foi identificar, por meio de marcadores

moleculares, o tipo de citoplasma presente na cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco e numa população experimental de cebola, em desenvolvimento na Embrapa Semi-Árido e Hortaliças, de forma a orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos de cebola para o Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas plantas de duas populações de cebola, como descrito:

População da ‘BRS Alfa São Francisco’ – foram analisadas 19 plantas de um segundo cruzamento teste para macho-esterilidade. Para formação dos pares no campo adotou-se o procedimento descrito por Banga & Petit (1958), que consiste na identificação de plantas estéreis e cruzamento controlado ao acaso com a umbela de uma planta fértil. Na observação visual das inflorescências no campo foram identificados pares, entre os quais o par P16E1 x P16F1, que apresentava a situação necessária para a produção de híbridos de cebola, qual seja: 1) planta macho-estéril produzindo progênies macho-estéreis, resultantes do cruzamento com a planta macho-fértil ou mantenedora da macho-esterilidade, e 2) planta macho-fértil ou mantenedora produzindo progênies macho-féteis. As plantas analisadas foram provenientes dos seguintes cruzamentos testes: a) do cruzamento teste P16E1 (estéril) x P16F1 (fértil) foram avaliados os pares 6E (estéril) x 6F (fértil), 7E x 7F, 5E x 5F e as plantas 17E, 18E, 16F, 14F e 15F; b) de outros cruzamentos testes os pares 3E x 3F, 4E x 4F 3 e 8E x 8F (Fig. 1).

População experimental cascuda-bronzeada – foram analisadas ao acaso 44 plantas, sem seleção prévia para macho-esterilidade. Esta população é resultado da seleção de quinze bulbos, efetuada dentro de uma população segregante ‘Baia’ x ‘Valcatorce’.

DNA genômico total foi isolado de folhas de cebola, segundo protocolo CTAB 2x (Doyle & Doyle, 1990): em torno de 0,2 g de folhas, mantidas a -80°C, foram pulverizadas 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% β-mercaptoethanol; 20 mM de EDTA) e incubado a 65°C por 50 minutos. O precipitado contendo o DNA total foi colocado para secar à temperatura ambiente, adicionando-se em seguida 120 µL de tampão TE (Tris 0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0) para armazenamento a -20°C. A integridade do DNA total, após tratamento com RNase, foi observada em gel de agarose 1,5%.

As reações de PCR, que seguiram a metodologia sugerida por Engelke *et al.* (2003), foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 0,25 µM de cada *primer*, 150 mM de cada dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 unidades da enzima DNA polimerase da Biometrix na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 50 ng de DNA total. Os *primers* usados para a identificação dos citoplasmas foram os publicados por Sato (1998), marcador 5'cob: *primer* S específico:

5' - GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT-3'; *primer* N específico: 5' - TCTAGATGTGCGATCAGTGGAAATCC-3'; *primer* comum: 5' - CTTTTCTATGGTGACAACCTCTT-3', que amplificam os fragmentos de 180 pb e 414 pb; e os publicados por Engelke *et al.* (2003), denominados como marcador *orf501A*: *primer* 1: 5' - ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3', *primer* 2: 5' - CCAAGCATTTGGCGTGAC-3', que amplificaram o fragmento de 473 pb. 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 os marcadores *orf501A* 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 min a 72°C.

A identificação de citoplasmas N, S e T baseou-se em Engelke *et al.* (2003): 1) citoplasma N – presença do fragmento de 180 pb e ausência dos demais fragmentos; 2) citoplasma S – presença dos fragmentos de 180 pb, 414 pb e 473 pb; e 3) citoplasma T – presença dos fragmentos de 180 pb e de 473 pb e ausência do fragmento de 414 pb.

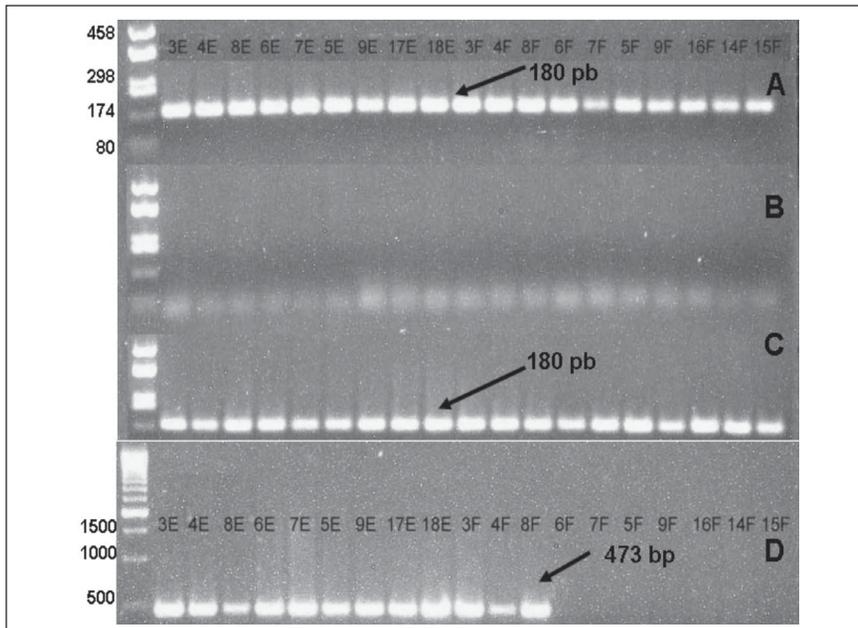


Figura 1. Fragmentos de 19 amostras de cebola de ‘BRS Alfa São Francisco’ amplificados com os *primers* 5’*cob* (painéis A, B e C) e *primers orfA501* (painel D). A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Amresco DNA MicroMarker (painéis A, B e C) e padrão de 500 da Invitrogen (painel D), com os tamanhos das bandas em pares de bases (pb) (Fragments of 19 samples of ‘BRS Alfa São Francisco’ onion plants amplified with the *primers* 5’*cob* (panels A, B and C) and *primers orfA501* (panel D). The left first column is the Amresco 50 bp DNA marker size (panels A, B, and C) and the Invitrogen 500 bp DNA marker size (panel D)). Petrolina, PE, Embrapa Semi Arido, 2006.

clusivamente macho-estéreis. Estes resultados indicam que a introdução de citoplasma N na população cascuda-bronzeada deverá ser feita de outros genótipos para o desenvolvimento de linhagens B ou mantenedora da macho-esterilidade.

Apenas duas reações de PCR são necessárias para a correta identificação do citoplasma T ou S: uma com os *primers* N + S + Comum de Sato (1998) e outro com os dois *primers* publicados por Engelke *et al.* (2003) (Figura 2). As reações com as combinações dos *primers* do Sato permitiram apenas a confirmação da eficiência da reação de PCR com os três *primers* nas plantas da ‘BRS Alfa São Francisco’, não se observando nenhuma amplificação indesejada, seja devido a pareamento entre *primers* ou amplificação preferencial de outros segmentos não específicos de DNA (Fig. 1).

Ao contrário de Szklarczyk *et al.* (2002), que trabalharam com DNA mitocondrial, não foi observada nenhuma banda “fantasma” nas reações de PCR realizadas com DNA total (nuclear + mitocondrial + cloroplasto), com o marcador 5’*cob*, nas duas populações de cebola, confirmando os resultados de Engelke *et al.* (2003). Esses dados sugerem que os 40 ciclos de PCR foram suficientes para amplificar a pequena quantidade do DNA mitocondrial, onde a mutação para a macho-esterilidade citoplasmática é encontrada, não sendo necessário os laboriosos e onerosos protocolos para extração de DNA do citoplasma, conforme demonstrado originalmente por Engelke *et al.* (2003).

Os resultados apresentados concordam parcialmente com os obtidos por Leite (1999), que trabalhando com a caracterização molecular citoplasmática da cultivar Alfa Tropical, através de polimorfismos nos DNAs de cloroplasto que distinguem citoplasma N e S, pela técnica de RFLP, encontrou a presença apenas do citoplasma N. No presente trabalho foi utilizada a população ‘BRS Alfa São Francisco’, que foi derivada de ‘Alfa Tropical’, sendo encontrado 12 de 19 plantas com citoplasma T. Apesar destes dados não serem passíveis de comparação direta, evidencia-se a utilidade de PCR com os *primers* descritos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento de seleção para planta macho-estéril em campo resultou na formação de 90 pares entre plantas macho-estéreis e plantas macho-férteis, numa frequência de, aproximadamente, 2% de plantas macho-estéreis dentro da população ‘BRS Alfa São Francisco’ e de 1,7 inflorescência/planta macho-estéril.

Da amostra de 19 plantas da ‘BRS Alfa São Francisco’ observou-se a amplificação dos fragmentos de 180 pb em todas as plantas (Fig. 1A e 1C), ausência do fragmento de 414 pb em todas as plantas (Fig. 1B) e a amplificação do fragmento de 473 pb (2003) nas nove plantas estéreis e em três férteis (3F, 4F e 8F) (Figura 1D), indicando que o citoplasma presente nesta população é o citoplasma T. Identificou-se a presença de citoplasma N em sete plantas, todas provenientes da planta fértil do par P16E1 x P16F1 (Fig. 1D). A seleção assistida pelos marcadores moleculares possibilitou a eliminação de plantas que

estavam sendo trabalhadas como mantenedoras (3F, 4F e 8F) (Fig. 1D), devido provavelmente à presença do alelo Ms no *loci* restaurador da fertilidade, bem como a confirmação da seleção visual nas plantas macho-férteis (F) dos pares 6E x 6F, 7E x 7F, 5E x 5F e 9E x 9F e nas plantas 16F, 14F e 15F, todas descendentes do par original P16E1 x P16F1 (Fig. 1). A existência dos citoplasmas N e T em ‘BRS Alfa São Francisco’ deve ser decorrente do processo de geração da população base que envolveu o intercruzamento de diferentes populações, incluindo ‘Baia Periforme’, ‘Chata IPA 5’, ‘Roxa IPA 3’, entre outras.

Na amostra de 44 plantas da população experimental cascuda-bronzeada observou-se a amplificação dos fragmentos de 180 e 414 pb (Fig. 2A) e do fragmento de 473 pb (Fig. 2B), indicando a presença do citoplasma S nesta população. A presença exclusiva de citoplasma estéril era esperada, visto que o parental feminino, derivado de ‘Baia Periforme’, usado no cruzamento com ‘Valcatorce’ para obtenção desta população, foi composto de plantas ex-

por Engelke para revelar a presença de plantas com citoplasma T. Além disso, a técnica de PCR é mais barata e menos laboriosa que RFLP.

Nas condições tropicais do semi-árido brasileiro é possível um ciclo de semente a semente em um ano, considerando quatro meses para a obtenção do bulbo, três meses para vernalização dos bulbos em câmara fria e outros quatro meses do plantio dos bulbos para obtenção de sementes. A identificação da mantenedora dentro da ‘BRS Alfa São Francisco’ foi possível num período de três anos associando-se seleção visual e pareamento ao acaso (Banga & Petiet, 1958), com reações de PCR para a identificação do tipo de citoplasma presente nos pareamentos formado em campo. A utilização da técnica de PCR numa população de cebola já florescendo em campo, pode reduzir este tempo para dois anos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao BNB-ETENE-Fundeci pela concessão de recursos financeiros para a execução do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

BANGA O; PETIET J. 1958. Breeding male sterile lines Dutch onion varieties as preliminary to the breeding of hybrid varieties. *Euphytica* 7: 21-30.

BERNINGER E. 1965. Contribution à l'étude de la stérilité mâle de l'oignon (*Allium cepa* L.). *Ann Amélior Plant* 15:183-199.

COSTA ND; CANDEIA JA; ARAÚJO MT. 1999. Importância econômica da cebola no Nordeste. In: QUEIROZ MA, GOEDERT CO, RAMOS SRR (eds). *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro*. Disponível em: www.cpatna.embrapa.br/catpub. Acessado em 15 de maio de 2006.

DOYLE JJ; DOYLE JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

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*, 107: 162-167.

DOWKER BD. 1990. Onion Breeding. In: RABINOWITCH HE; BREWSTER JL (eds). *Onions and Allied Crops*. (eds.). baton Route: CRC Press.

HAVEY MJ; BARK OH. 1994. Molecular confirmation that sterile cytoplasm has been introduced into open-pollinated Grano onion cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119: 90-93.

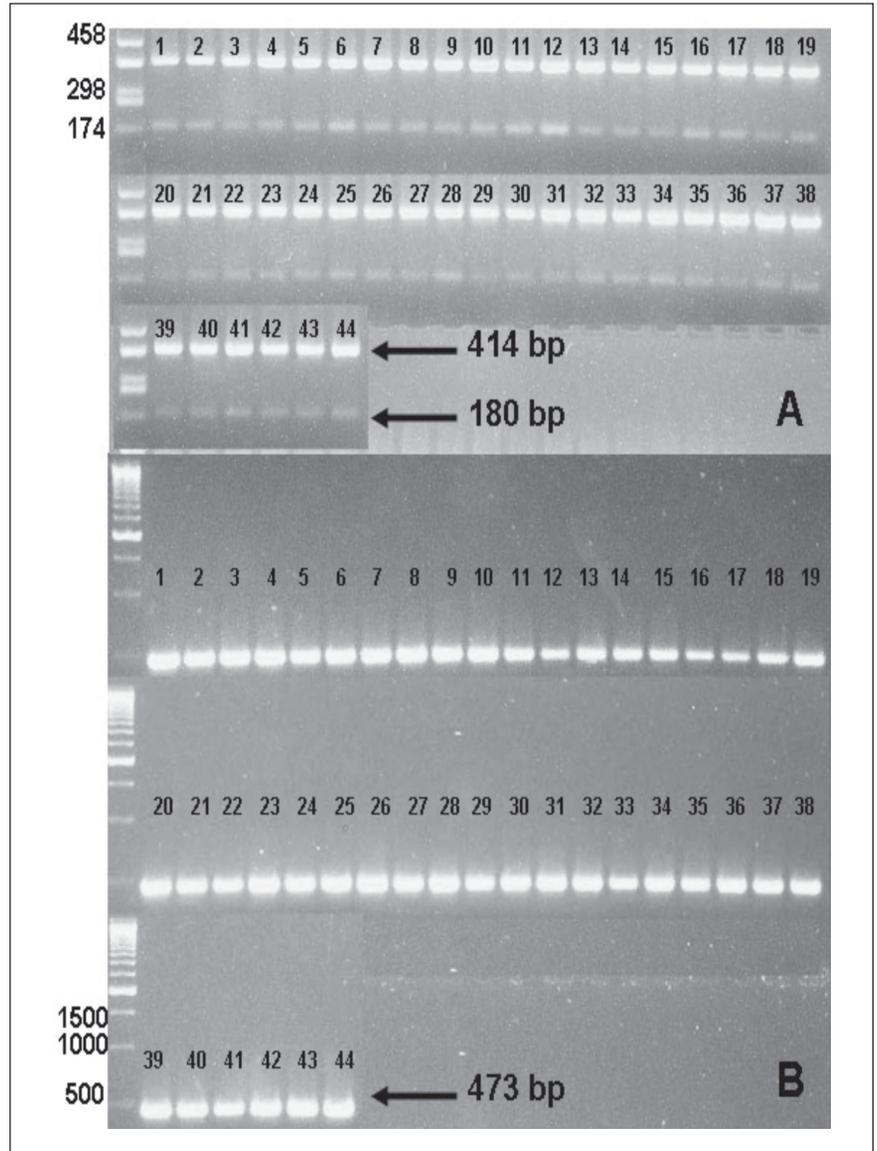


Figura 2. Fragmentos de 44 amostras de cebola de uma população cascuda bronzada amplificados com os primers 5' cob (painel A) e primers orfA501 (painel B). A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Amresco DNA MicroMarker (painel A) e padrão de 500 da Invitrogen (painel B), com os tamanhos das bandas em pares de bases (pb)(Fragments of 44 samples of ‘Valenciana’ type onion plants amplified with the primers 5' cob (panel A) and primers orfA501 (panel B). The left first column is the Amresco 50 bp DNA marker size (panel A) and the Invitrogen 500 bp DNA marker size (panel B)). Petrolina, PE, Embrapa Semi Arido, 2006.

HAVEY MJ. 1995. 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* 90: 263-268.

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

LEITE DL. 1999. *Molecular characterization of cytoplasmic diversity in leek and south-american onion cultivars and sequencing of onion cDNAs*. Madison: University of Wisconsin (Tese doutorado).

SZKLARCZYK M; SIMLAT M; JAGOSZ B; BAG. 2002. The use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 625-634.

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