

Seleção molecular assistida para identificação de alelo para cor rósea na cebola ‘Brisa IPA 12’

Jonas Araújo Candéia¹; Soniane Rodrigues da Costa²; Carlos Antonio Fernandes Santos²; Maria Cristina Lemos da Silva¹; Mina Karasawa¹

¹Instituto Agrônômico de Pernambuco. Caixa Postal 1022. 50761-000 Recife-PE, jonas.candéia@ipa.br

²Embrapa Semiárido. Caixa Postal 23. 56302-970 Petrolina- PE, carlos-fernandes.santos@embrapa.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi aplicar os marcadores moleculares ANS para genotipar 270 plantas da Brisa IPA 12 que segregavam para bulbos de cor rósea, que podem ficar ‘escondidos’ nas plantas heterozigotas, de forma a eliminar essa condição que dificulta a aceitação comercial dessa cultivar de cebola. DNA total foi extraído conforme protocolo CTAB 2x, de amostras foliares de plantas coletadas aos 30 dias após a semeadura dos bulbos vernalizados e pré-selecionados para a cor amarela. Foram usados os iniciadores ANS-F: 5’ – TTTGCTCGATCGTTTAGCTGAAGAAGA – 3’ e ANS-R: 5’ – TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGC A – 3’ para genotipar as plantas de cebola. Os fragmentos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Das 270 plantas da Brisa IPA-12 analisadas foram eliminadas, antes da floração, 87 plantas que apresentavam o alelo ‘p’, sendo 13 plantas homozigotas ‘pp’ e 74 plantas heterozigotas ‘Pp’. O lote residual de plantas ‘PP’ possibilitou a produção de 600 g de sementes genéticas, sendo que 400 g foram semeadas para produção de bulbos. Foram avaliados a cor do bulbo de 28730 plantas, das quais apenas 15 bulbos apresentaram a cor rósea, ou 0,052%. A frequência de bulbos róseos na população Brisa IPA 12 foi reduzida de 3,5% para 0,052%, que é aceitável do ponto de vista comercial.

PALAVRAS-CHAVE: *Allium cepa* L., seleção assistida, ANS.

ABSTRACT

Molecular assisted selection for pink allele identification in onion plants ‘Brisa IPA- 12’

The objective of the present study was to apply the ANS primers to 270 plants of Brisa IPA 12 cultivar to make possible to eliminate de recessive alleles to pink color that used to be ‘hidden’ in the heterozygote plants, in order to eliminate this kind of segregation that difficult the acceptance of this cultivars for commercial purposes. Total DNA was extracted according the CTAB 2x DNA protocol from leaves of plants 30 days old after sowing of vernalized and pre-selected yellow bulbs. The primers ANS-F: 5’ – TTTGCTCGATCGTTTAGCTGAAGAAGA – 3’ and ANS-R: 5’ –

CANDEIA JA; COSTA SR; SANTOS CAF; SILVA MCL; KARASAWA M. 2014. Seleção molecular assistida para identificação de alelo para cor rósea na cultivar Brisa IPA 12. Horticultura Brasileira 31: S1962- S1966.

TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGCA – 3' were used to genotype all onion plants. The PCR fragments were visualized in agarose gel 1%. Among the 270 plants of Brisa IPA 12 analyzed, eighty-seven were eliminated before the flowering time, being 13 of 'pp' genotype and 74 of 'Pp' genotype. With the selected 'PP' plants it was possible to produce 600 g of genetic seeds. Four hundred g were sowed for bulb production. They were evaluated bulbs of 28,730 plants, and only 15 presented pink bulbs, or the frequency of 0.052%. The pink bulbs frequency of 3.5%, presented in the original Brisa IPA-12 cultivar, was reduced for only to 0.052%, what is acceptable to commercial purposes.

Keywords: *Allium cepa* L., assisted selection, ANS.

Cinco *locus* principais são responsáveis pela coloração do bulbo da cebola, envolvendo interações epistáticas complexas, por exemplo: bulbo branco pode ser determinado por apenas um alelo dominante do *loco I*, bem como, pelos alelos recessivos do *loco C*. Compostos flavonóides são responsáveis por bulbos coloridos em cebola, sendo a cor vermelha atribuída a compostos derivados de cianidina. Bulbos de cor rósea, resultantes da redução da 'anthocyanidin synthase' (ANS), são indesejados em cultivares de cebola, derivadas de cruzamentos entre cebola de bulbos vermelhos x bulbos amarelos, principalmente. Para identificação de alelos para a cor rósea (P), no melhoramento clássico, são necessários testes de progênes F₂ e F₃ em cultivares derivadas de cruzamentos entre bulbos vermelhos x bulbos amarelos, como revisado por Kim et al. (2005).

Kim et al. (2004; 2005) desenvolveram marcadores co-dominantes que possibilitaram a identificação molecular de alelos P em cultivares de cebola, facilitando o melhoramento e a eliminação dessa cor indesejável em cultivares comerciais de cebola. A cor rósea de bulbos é condicionada por alelos recessivos P, sendo de difícil eliminação em cultivares de cebola que apresentam essa característica. Essa situação tem sido relatada na população comercial Brisa IPA 12, recomendada para a região do Vale do São Francisco, cuja frequência de bulbos róseos de 3,5%, dificultando a sua aceitação pelo mercado consumidor.

O objetivo do presente trabalho foi aplicar os marcadores moleculares ANS para genotipar 270 plantas da Brisa IPA 12 para possibilitar a eliminação de alelos recessivos

CANDEIA JA; COSTA SR; SANTOS CAF; SILVA MCL; KARASAWA M. 2014. Seleção molecular assistida para identificação de alelo para cor rósea na cultivar Brisa IPA 12. Horticultura Brasileira 31: S1962- S1966.

da cor rósea ‘escondidos’ em plantas heterozigotas, de forma a eliminar essa segregação que dificulta a aceitação comercial dessa cultivar de cebola.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA total foi extraído de amostras foliares individuais de 270 plantas da cultivar Brisa IPA 12, cujo bulbos foram vernalizados e pré-selecionados para a cor amarela, conforme protocolo CTAB 2x (Santos et al., 2010). As amostras foliares foram coletadas antes da floração para possibilitar a eliminação daquelas que apresentavam o alelo para cor rósea.

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 μ L, que continha em torno de 30 ng de DNA total, 1x de Tampão para *Taq* DNA Polimerase, 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,15 mmol L⁻¹ de cada dNTP, 0,25 μ mol L⁻¹ M de cada iniciador, 0,25 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase. Os iniciadores publicados por Kim et al. (2005) foram: ANS-F: 5' – TTT GCT CGA TCG TTT AGC TGA AGA AGA – 3' e ANS-R: 5' – TGA GGA TGA TGA CAA AGT TAG CGG AGC A – 3'. O programa de PCR utilizado foi descrito por Kim et al. (2005): desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos, e uma extensão ao final dos 40 ciclos de 7 minutos a 72°C.

Os fragmentos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. A interpretação dos fragmentos amplificados por PCR foram como descrito por Kim et al. (2005): *pp* (fragmento de 428 pb), *Pp* (fragmentos de 818 e 428 pb) e *PP* (fragmento de 818 pb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 270 plantas da Brisa IPA 12 analisadas foram eliminadas antes da floração 87 plantas que apresentavam o alelo ‘*p*’, sendo 13 plantas homozigotas ‘*pp*’ e 74 plantas heterozigotas ‘*Pp*’. Dessa forma apenas plantas na condição ‘*PP*’ (Fig. 1) foram deixadas no campo para produção de semente genética.

O lote residual de plantas ‘*PP*’ possibilitou a produção de 600 g de sementes genéticas, sendo que 400 g foram semeadas para produção de bulbos. Foi avaliada a cor do bulbo de 28730 plantas, das quais apenas 15 bulbos apresentaram a cor rósea, ou 0,052%. Deve ser destacado que a frequência de bulbos róseos na população Brisa IPA 12 é de 3,5%, sendo que a identificação e eliminação molecular possibilitaram a redução quase total dos alelos ‘*p*’ na população de plantas analisadas. A presença de 15 plantas de

CANDEIA JA; COSTA SR; SANTOS CAF; SILVA MCL; KARASAWA M. 2014. Seleção molecular assistida para identificação de alelo para cor rósea na cultivar Brisa IPA 12. *Horticultura Brasileira* 31: S1962- S1966.

bulbos róseos pode ser atribuída a algum de tipo de mutação genética no *locus* da ‘anthocyanidin synthase’ (*ANS*), que codifica para bulbo de cor rósea.

Segundo Diniz et al. (2010), cultivares derivadas do cruzamento de bulbo roxo x bulbo amarelo, como no caso da Brisa IPA 12 (Roxa IPA 3 x Texas Grano 1015Y), existe a possibilidade do aparecimento de bulbos róseos, sendo que os alelos recessivos permanecem ‘escondidos’ nas plantas heterozigotas, dificultando a sua eliminação por testes de progênes ou autofecundações. A seleção assistida com o marcador do gene *ANS* comprovou nessa situação ser eficiente para a quase total eliminação dos alelos ‘*p*’ na população de Brisa IPA 12 em apenas um ciclo de seleção, eliminando a presença de bulbos róseos (*pp*) e tornando possível a comercialização de sementes dessa cultivar para os produtores.

REFERÊNCIAS

DINIZ LS; SANTOS CAF; COSTA SR; MEDEIROS AG. Identificação molecular de alelos para cor rósea em cultivares de cebola no Vale do São Francisco. 2010. *Horticultura Brasileira* 28: S2593-S2597.

KIM S; BINZEL ML; YOO KS; PARK S; PIKE LM. 2004. *Pink (P)*, a new *locus* responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa*) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 18–27.

KIM S; YOO KS; PIKE LM. 2005. Development of a co-dominant, PCR-based marker for allelic selection of the pink trait in onions (*Allium cepa*), based on the insertion mutation in the promoter of the anthocyanidin synthase gene. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 628-633.

SANTOS CAF; OLIVEIRA VR; RODRIGUES MA; RIBEIRO HLC. 2010. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 49-55.

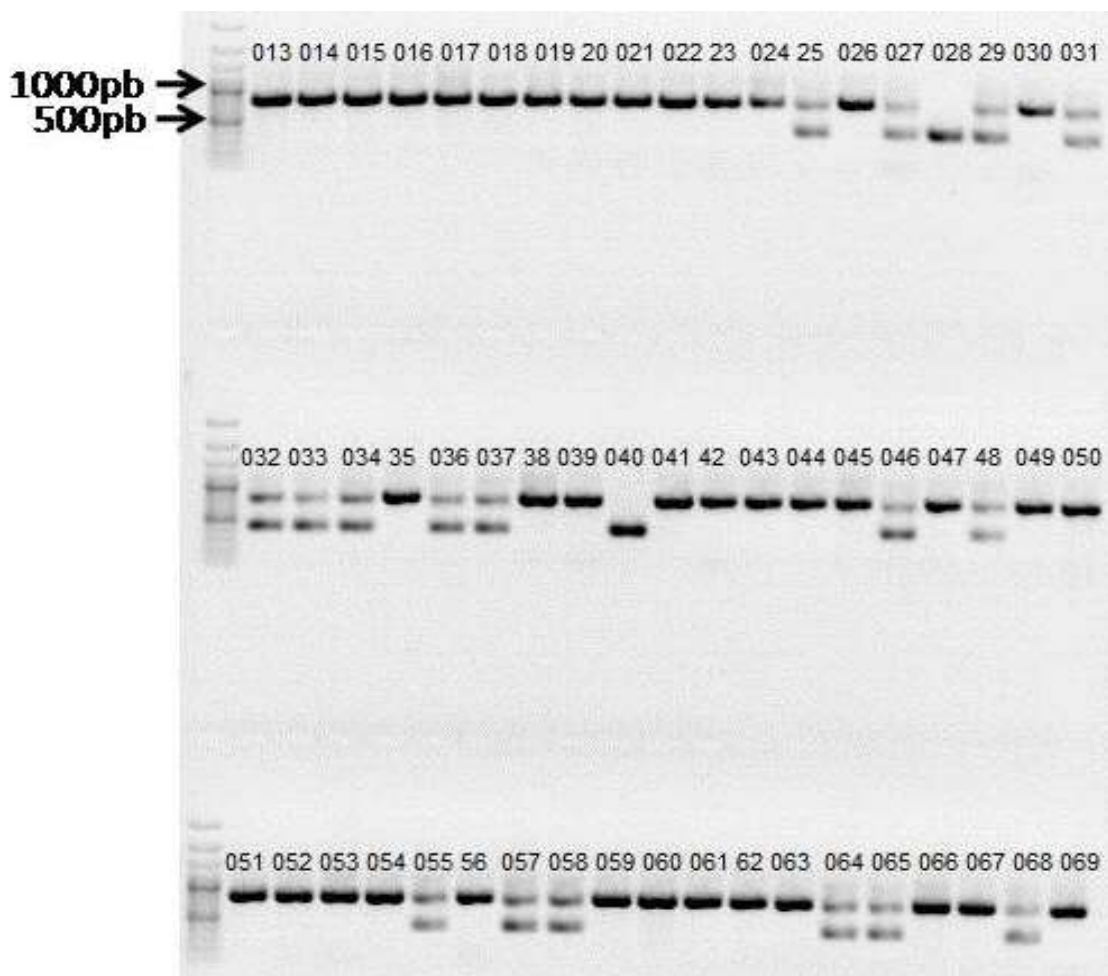


Figura 1. Padrão alélico para o gene da ‘anthocyanidin synthase’ – ANS em plantas da cultivar Brisa IPA 12. Da esquerda para a direita: M=marcador generuler 100 bp Plus DNA (Fermentas) e plantas 13^a a 69^a da Brisa IPA 12. (Allelic fingerprinting for ‘anthocyanidin synthase’ – ANS gene in Brisa IPA 12 plants. From left to right: M=generuler DNA Ladder 100 bp Plus DNA (Fermentas) and plants 13th to 69th).

28 de julho a
01 de agosto de 2014

UFV

Palmas-Tocantins