

Diversidade genética em germoplasma tropical de cebola estimada via marcadores RAPD

Maria do Desterro M dos Santos¹; Carlos Francisco Ragassi²; Maria Esther de N Fonseca²; Anne Gizelle R Buzar²; Valter R Oliveira²; Paulo César T de Melo³; Leonardo S Boiteux²

¹UnB, C. Postal 4508, 70910-900 Brasília-DF; mariadsmendes@gmail.com; ²Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70351-970 Brasília-DF; cragassi@gmail.com; mesther@cnph.embrapa.br; valter@cnph.embrapa.br; boiteux@cnph.embrapa.br ³USP-ESALQ, Depto. Prod. Vegetal, C. Postal 09, 13418-900 Piracicaba-SP; pectmelo@esalq.usp.br

RESUMO

A cebola é uma cultura de expressiva importância socioeconômica para o Brasil. Marcantes contribuições para o desenvolvimento da cultura têm sido feitas utilizando-se germoplasma de cebola adaptado às regiões tropicais e subtropicais. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética existente em uma coleção de germoplasma potencialmente útil ao desenvolvimento de cultivares para essas regiões. Para isso, a variabilidade genética de um grupo de 21 acessos foi analisada via marcadores RAPD. Esses acessos ('Red Creole', 'Roxa IPA-3', 'Valenciana 14', 'Beta Cristal', 'Diamante', 'Composto IPA-6', 'Aurora', 'Bojuda Rio Grande', 'Alfa Tropical', 'Pêra IPA-4', 'Primavera', 'Belém IPA-9', 'Crioula Alto Vale', 'Conquista', 'Pira-Ouro', 'Vale-Ouro IPA-11', 'Franciscana IPA-10', 'Serrana', 'CNP 6400', 'Petroline' e 'Baia Periforme') têm sido empregados como germoplasma e/ou foram desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético de cebola conduzidos no Brasil. Dos 520 iniciadores ('primers') utilizados na triagem inicial, somente 38 confirmaram polimorfismos entre os 21 acessos. Esses 38 'primers' produziram 624 amplicons, dos quais 522 (83,7%) foram monomórficos e 102 (16,3%) polimórficos. Com base nos padrões revelados, seis grupos foram formados de acordo com a similaridade média global entre os acessos (= 0,72). Somente um desses seis grupos englobou mais de um acesso. O grupo principal (formado por 16 acessos) incluiu, predominantemente, as cultivares que apresentam no seu pedigree a contribuição de 'Baia Periforme' ('Diamante', 'Composto IPA-6', 'Aurora', 'Bojuda Rio Grande', 'Conquista', 'Pira-Ouro', 'Serrana', 'Vale-Ouro IPA-11', 'Baia Periforme', 'Primavera', 'Franciscana IPA-10', 'Belém IPA-9', 'Crioula Alto Vale', 'Petroline', 'Pêra IPA-4' e 'Alfa Tropical'). As cultivares 'Red Creole', 'Roxa IPA-3', 'Beta Cristal', 'CNP 6400' e 'Valenciana 14' formaram agrupamentos isolados e distintos do grupo 'Baia Periforme', revelando, dessa forma, divergência genética entre essas cinco populações e o grupo principal. Verificou-se que os materiais estudados possuem base genética relativamente estreita, apresentando, em sua grande maioria origem na população 'Baia Periforme'. Existem, no entanto, alguns materiais divergentes, cuja diversidade pode ser explorada em programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Allium cepa*, marcadores moleculares, melhoramento genético.

ABSTRACT

Genetic diversity of tropical-adapted onion germplasm assessed by RAPD markers

Onion is a crop of significant socioeconomic importance to Brazil. Onion germplasm with adaptation to tropical and sub-tropical conditions has played an important role in the development of this crop in the country. In this context, we studied the genetic diversity in a germplasm collection potentially useful for the development of cultivars for tropical and subtropical regions. The genetic variability of 21 accessions/cultivars that have been used as germplasm and/or were developed by onion breeding programs in Brazil was evaluated via RAPD markers. The following accessions were included in the study: 'Red Creole', 'Roxa IPA-3', 'Valenciana 14', 'Beta Cristal', 'Diamante', 'Composto IPA-6', 'Aurora', 'Bojuda Rio Grande', 'Alfa Tropical', 'Pêra IPA-4', 'Primavera', 'Belém IPA-9', 'Crioula Alto Vale', 'Conquista', 'Pira-Ouro', 'Vale-Ouro IPA-11', 'Franciscana IPA-10', 'Serrana', 'CNP 6400', 'Petroline', and 'Baia Periforme'. From the 520 primers used in the initial screening only 38 displayed stable polymorphisms. They produced 624 amplicons, of which 522 (83.7%) were monomorphic and 102 (16.3%) were polymorphic. An average similarity coefficient of 0.72 was calculated among accessions based upon this subgroup of polymorphic amplicons. This allowed the discrimination of this germplasm collection into six groups with only one of them comprising more than one accession. The main group was formed by 16 accessions ('Diamante', 'Composto IPA-6', 'Aurora', 'Bojuda Rio Grande', 'Conquista', 'Pira-Ouro', 'Serrana', 'Vale-Ouro IPA-11', 'Baia Periforme', 'Primavera', 'Franciscana IPA-10', 'Belém IPA-9', 'Crioula Alto Vale', 'Petroline', 'Pêra IPA-4' and 'Alfa Tropical'), for which the genetic origin (with few exceptions) can be traced back to the variety 'Baia Periforme'. The populations 'Red Creole', 'Roxa IPA-3', 'Beta Cristal', 'CNP 6400', and 'Valenciana 14' comprised a set of five isolated groups, showing genetic divergence among them and in relation to main 'Baia Periforme' group. This germplasm displayed a relatively low genetic diversity, with the predominance of materials originated from the base population 'Baia Periforme'. There are, however, some accessions, which can add genetic diversity to this germplasm and they can be exploited by onion breeding programs aiming to develop cultivars for tropical regions of the world.

Keywords: *Allium cepa*, molecular markers, plant breeding.

(Recebido para publicação em 9 de setembro de 2011; aceito em 27 de fevereiro de 2012)
(Received on September 9, 2011; accepted on February 27, 2012)

O agronegócio de cebola (*Allium cepa*) é de grande importância socioeconômica para o Brasil. Com base em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), o País produziu cerca de 1,7 milhão de toneladas em 2010, com destaque para as regiões Sul (49,9%), Nordeste (28,4%), Sudeste (16,9%) e Centro Oeste (4,8%). Na última década (2000-2010), foi contabilizado um acréscimo de 51,6% no total produzido que pode ser atribuído, principalmente, ao aumento na produtividade (43%) que saltou de 17,4 t ha⁻¹ para 24,9 t ha⁻¹. O incremento da área plantada no período foi relativamente pequeno (5,9%), passando de 66.515 ha no ano 2000 para 70.464 ha em 2010 (IBGE, 2012).

A cultura da cebola foi introduzida no Brasil no século XVIII por imigrantes açorianos que colonizaram as regiões que englobam os atuais municípios de Rio Grande, São José do Norte, Mostardas e Pelotas no estado do Rio Grande do Sul (Fontoura, 1994; Barbieri & Medeiros, 2005). As introduções utilizadas por esses colonizadores foram posteriormente submetidas a diferentes condições ambientais e formas de seleção. Atualmente, essas variedades/aceessos/populações constituem um valioso germoplasma, que vem sendo utilizado por praticamente todos os programas de melhoramento genético de cebola conduzidos no Brasil (Lisbão, 1993). Esses programas envolveram tanto iniciativas públicas quanto privadas e já desenvolveram inúmeras cultivares, proporcionando ganhos em produtividade, diversidade e adaptações a estresses bióticos e abióticos, beneficiando o setor produtivo dessa hortaliça (Lisbão, 1993; Melo & Boiteux, 2001; Leite *et al.*, 2009).

O conhecimento da diversidade genética de um banco de germoplasma, no contexto do melhoramento, é extremamente útil para a organização das coleções e para guiar esquemas de hibridação. Essa informação pode ser utilizada na identificação de combinações de acessos capazes de produzir progênies com máxima variabilidade para características de interesse (Mohammadi & Prasanna, 2003; Crossa & Franco, 2004). A informação sobre a divergência

genética disponível é valiosa, pois se adequadamente explorada, pode reduzir a vulnerabilidade ('erosão genética') e, ao mesmo tempo, acelerar o progresso genético para determinados caracteres de importância para a cultura (Barbieri *et al.*, 2005).

O sistema de marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) tem sido utilizado em estudos de diversidade genética e na estimativa/identificação de relações de pedigree (Tinker *et al.*, 1993), fornecendo ferramentas capazes de complementar metodologias de classificação com base exclusivamente em caracteres morfológicos. O sistema de marcadores RAPD apresenta um conjunto de interessantes atributos, sendo capaz de revelar a diversidade genética de maneira simples e consistente, gerando um razoável número de polimorfismos e apresentando um custo operacional relativamente baixo (Spooner *et al.*, 2005). Todavia, esse sistema pode apresentar baixa reprodutibilidade caso envolva componentes metodológicos de baixa qualidade ou se alguns procedimentos padrões não forem adotados (Boiteux *et al.*, 1999; Spooner *et al.*, 2005).

No gênero *Allium*, o sistema de marcadores RAPD tem sido utilizado em diferentes estudos filogenéticos e também na estimativa da variabilidade intraespecífica (Wilkie *et al.*, 1993; Maass & Klaas, 1995; D'ennequin *et al.*, 1997; Raamsdonk *et al.*, 1997; Tanikawa *et al.*, 2002; Paredes *et al.*, 2008). Marcadores RAPD previamente detectados em germoplasma de cebola apresentam uma grande potencialidade para uso em sistemas de seleção assistida dentro de programas de melhoramento genético dessa cultura (Bradeen & Havey, 1995). No entanto, existem, comparativamente, poucos marcadores RAPD em mapas genéticos construídos para cebola e espécies afins (Shigyo *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Fischer & Bachmann, 2000; van Heusden *et al.*, 2000). Por sua vez, ainda é escassa a disponibilidade de marcadores para germoplasma de cebola com adaptação para cultivo nos trópicos e sub-trópicos e, assim, justifica-se a disponibilização de marcadores RAPD informativos para identificação e catalogação de populações de cebola de

interesse para o melhoramento genético nessas regiões (Leite *et al.*, 2005; Leite & Anthonisen, 2009). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de marcadores RAPD, a variabilidade genética em uma coleção de germoplasma de cebola compreendendo acessos potencialmente úteis para o desenvolvimento de cultivares adaptadas para cultivo em regiões tropicais e subtropicais.

MATERIAL E MÉTODOS

Acessos de cebola (*Allium cepa*) – o material biológico consistiu de 21 acessos do banco de germoplasma de cebola da Embrapa Hortaliças: 'Red Creole', 'Roxa IPA-3', 'Valenciana 14' (também denominado 'Valcatorce INTA'), 'Beta Cristal', 'Diamante', 'Composto IPA-6', 'Aurora', 'Bojuda Rio Grande', 'Alfa Tropical', 'Pêra IPA-4', 'Primavera', 'Belém IPA-9', 'Crioula Alto Vale', 'Conquista', 'Pira-Ouro', 'Vale-Ouro IPA-11', 'Franciscana IPA-10', 'Serrana', 'CNPH 6400' (também conhecida como 'Baía Cascuda'), 'Petrolina' e 'Baía Periforme'. Esses acessos foram escolhidos para o presente estudo por terem sido empregados como germoplasma e/ou por representarem cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético de cebola conduzidos no Brasil.

Extração de DNA e sistema de marcadores RAPD – o DNA genômico foi extraído de folhas jovens, obtidas de plantas cultivadas em vasos em condição de casa de vegetação. O método CTAB 2X modificado (Boiteux *et al.*, 1999) foi empregado para purificação do DNA. A quantificação e a verificação da integridade do DNA foram realizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. A reação da polimerase em cadeia ('*Polymerase Chain Reaction*' ou PCR) foi conduzida com os seguintes componentes, volumes e concentrações: 3,0 µL de DNA genômico (3 ng/µL); 1,30 µL de tampão 10X para Taq DNA Polimerase; 1,04 µL de dNTPs 2,5 mM; 1,5 µL de iniciadores ('*primers*') a 10 ng/µL e 0,2 µL de enzima Taq DNA Polimerase. O volume final foi completado para 13

μL com 4,92 μL de água deionizada (processo milli-Q[®]) e autoclavada. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9700) programado para 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 37°C, 2 minutos a 72°C, com extensão final de 7 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em géis de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm) em sistema de vídeo Eagle Eye[®] (Stratagene).

Estratégia de seleção de iniciadores ('primers') capazes de revelar polimorfismos e geração da matriz de similaridade – inicialmente, foi feita uma triagem utilizando 520 iniciadores (Operon Technologies, EUA) para a seleção daqueles capazes de gerar bandas (amplicons) polimórficas, reproduzíveis e de alta intensidade. Essa triagem exploratória foi conduzida mediante análise comparativa das cultivares 'Roxa IPA-3', 'Valenciana 14' e 'Beta Cristal', as quais pertencem a grupos morfoagronômicos distintos (Buzar *et al.*, 2007). Os iniciadores que apresentaram polimorfismos reproduzíveis e de alta intensidade foram selecionados e posteriormente utilizados na caracterização dos 21 acessos/cultivares de cebola. Com os dados de presença (1) ou ausência (0) de bandas, foi gerada a matriz de similaridade baseada no Coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), utilizada para obtenção de um dendrograma pela opção UPGMA (método de agrupamento não ponderado com base na média aritmética) do software NTSYS – PC (Rohlf, 2000). Também por meio desse software, a correlação entre a matriz de valores co-fenéticos e a matriz de similaridade foi estimada para verificar a adequação do dendrograma obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 520 iniciadores utilizados na triagem inicial, apenas 53 (10,1%) foram selecionados por apresentarem polimorfismos e somente 38 (7,3%) confirmaram os polimorfismos após a utilização com os 21 acessos/cultivares (Tabela 1). Esse conjunto de 38 inicia-

dores produziu 624 bandas, das quais 522 (83,7%) foram monomórficas e 102 (16,3%) polimórficas. A média de bandas capazes de serem anotadas por

cada iniciador foi de 11,5. Esse valor é inferior ao obtido por Leite & Anthonisen (2009) que, com utilização de 11 iniciadores, obtiveram 86,4%

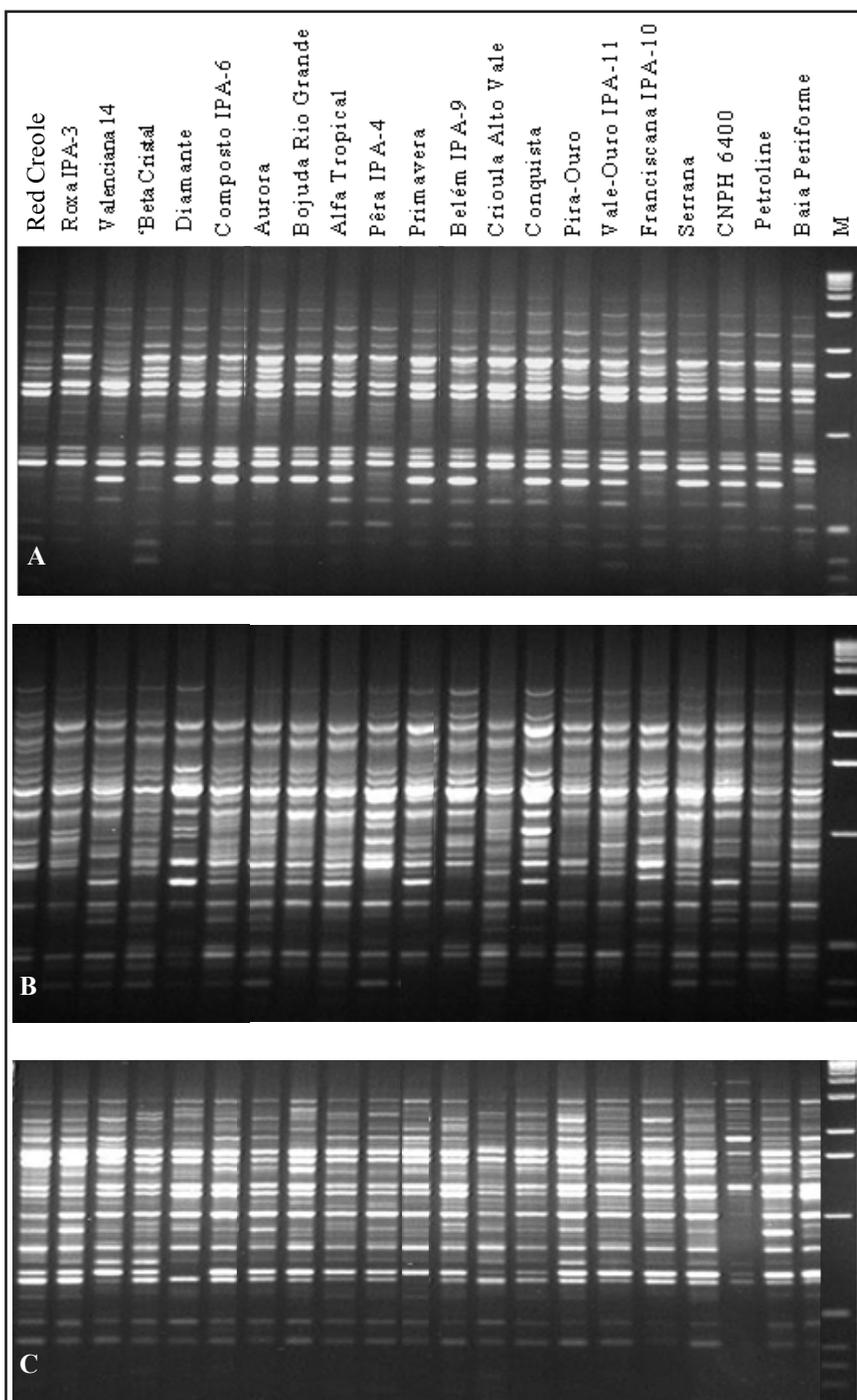


Figura 1. Perfil de amplicons RAPD de acessos de uma coleção brasileira de germoplasma de cebola, obtido por meio dos seguintes 'primers' (Operon Technologies, EUA): (A) OP-J11; (B) OP-K09 e (C) OP-N07. Os nomes na vertical correspondem aos acessos avaliados e a letra "M" indica o marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Invitrogen[™]) (RAPD amplicon profiles of accessions from a Brazilian onion germplasm collection obtained by using the following primers (Operon Technologies, USA): (A) OP-J11; (B) OP-K09 and (C) OP-N07. The name of the accessions were vertically positioned and the "M" letter indicates the 1 kb Ladder (Invitrogen[™]) molecular weight marker). Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008.

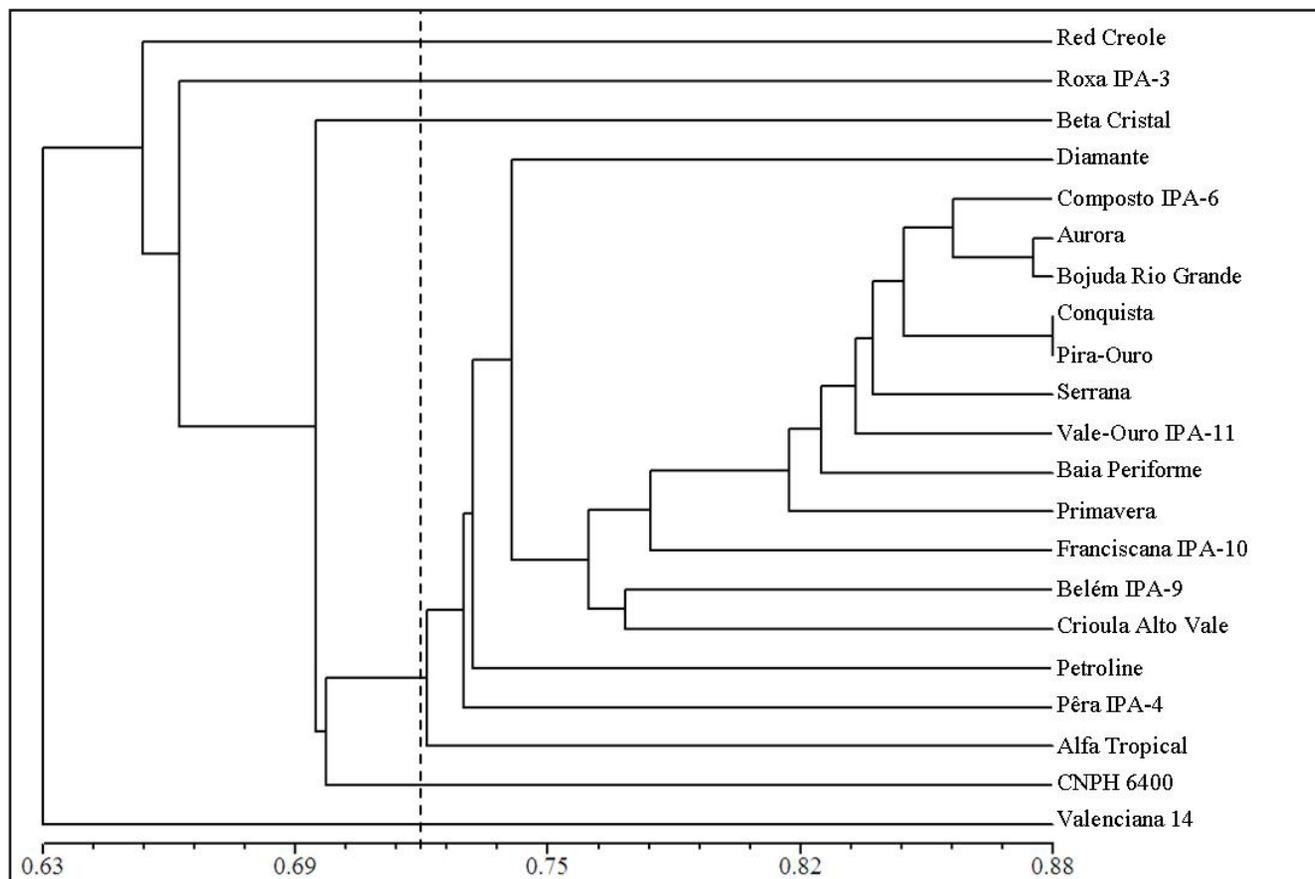


Figura 2. Dendrograma de similaridade entre 21 acessos de cebola, cuja variabilidade genética foi analisada por meio de 38 'primers' RAPD. O corte vertical corresponde ao valor médio de similaridade entre os materiais (= 0,72) (dendrogram of similarity among 21 onion accessions, of which, the genetic variability was assessed through 38 RAPD primers. The vertical line corresponds to the overall average similarity among the accessions (value = 0.72). Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008.

de bandas polimórficas e uma média de 15 bandas por iniciador. A baixa quantidade de polimorfismos obtida no presente estudo é corroborada por outro trabalho, que utilizou 100 iniciadores RAPD em 22 cultivares de cebola do Japão e obteve frequência de amplicons monomórficos também em torno de 83% (Tanikawa *et al.*, 2002).

A técnica RAPD tem sido útil para revelar diferenças mesmo para espécies de bases genéticas estreitas ou em espécies autógamas (Williams & Saint-Clair, 1993). Por esse motivo, esperava-se, no presente estudo, que a análise via RAPD revelasse diferenças mais acentuadas para os materiais avaliados, devido à natureza alógama da espécie estudada (presença predominante de protandria e ocorrência natural de macho-esterilidade) em associação com a elevada variabilidade fenotípica previamente observada entre alguns dos acessos amostrados (Buzar *et al.*, 2007). No

entanto, a análise via RAPD não revelou essa esperada variabilidade.

Alguns iniciadores geraram perfis de RAPD complexos, com um ou mais amplicons polimórficos. Exemplos ilustrativos são os padrões de bandas obtidos com os 'primers' OP-J11, OP-K09 e OP-N07 (Figura 1). A análise das bandas obtidas com diferentes 'primers' permitiu revelar perfis de ampliações únicos para algumas das cultivares, podendo configurar como marcadores moleculares úteis na identificação desses acessos de cebola (i.e. marcadores cultivar-específicos). Além disso, o presente esforço de triagem permitiu a identificação de um grupo de marcadores RAPD que podem ser empregados (sozinhos ou em combinação) para caracterização de grupos agrônomicos e até de algumas populações ou cultivares específicas. A lista dos 38 primers RAPD capazes de gerar amplicons polimórficos nessa coleção de acessos

de cebola está apresentada na Tabela 1.

Com base no padrão revelado pelas 102 bandas polimórficas, realizou-se o agrupamento dos acessos e seu correspondente dendrograma de similaridade (Figura 2). A correlação entre a matriz de valores co-fenéticos e a matriz de similaridade foi de 0,88, indicando um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o gráfico. Seis grupos foram formados ao se considerar o valor de corte correspondente à similaridade média global entre os materiais (= 0,72). Somente um desses seis grupos englobou mais de um acesso. Esse grupo principal (formado por 16 acessos) incluiu, predominantemente, as cultivares que apresentam no seu pedigree a contribuição de 'Baia Periforme' (a saber: 'Diamante', 'Composto IPA-6', 'Aurora', 'Bojuda Rio Grande', 'Conquista', 'Pira-Ouro', 'Serrana', 'Vale-Ouro IPA-11', 'Baia Periforme', 'Primavera', 'Franciscana IPA-10', 'Belém IPA-9', 'Crioula Alto

Tabela 1. Código e sequência de 38 ‘primers’ RAPD (Operon Technologies, EUA) que geraram amplicons polimórficos em uma coleção de 21 acessos de cebola (code and sequence of 38 RAPD primers (Operon Technologies, USA), which were able to generate polymorphic amplicons in a collection of 21 onion accessions). Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008.

Ordem	Primer	Seqüência	Ordem	Primer	Seqüência
1	OPA17	GACCGCTTGT	20	OPK10	GTGCAACGTG
2	OPB01	GTTTCGCTCC	21	OPK11	AATGCCCCAG
3	OPB02	TGATCCCTGG	22	OPK12	TGGCCCTCAC
4	OPB17	AGGGAACGAG	23	OPK13	GGTTGTACCC
5	OPD01	ACCGCGAAGG	24	OPK14	CCCCTACAC
6	OPD12	CACCGTATCC	25	OPK15	CTCCTGCCAA
7	OPD15	CATCCGTGCT	26	OPK16	GAGCGTCGAA
8	OPE11	GAGTCTCAGG	27	OPK17	CCCAGCTGTG
9	OPF02	GAGGATCCCT	28	OPK18	CCTAGTCGAG
10	OPG11	TGCCCGTCGT	29	OPK19	CACAGGCGGA
11	OPG12	CAGCTCACGA	30	OPM19	CCTTCAGGCA
12	OPI01	ACCTGGACAC	31	OPN01	CTCACGTTGG
13	OPI04	CCGCCTAGTC	32	OPN07	CAGCCCAGAG
14	OPI10	ACAACGCGAG	33	OPP10	TCCCGCCTAC
15	OPI16	TCTCCGCCCT	34	OPU10	ACCTCGGCAC
16	OPJ11	ACTCCTGCGA	35	OPU11	AGACCCAGAG
17	OPK02	GTCTCCGCAA	36	OPV04	CCCCTCACGA
18	OPK08	GAACACTGGG	37	OPW03	GTCCGGAGTG
19	OPK09	CCCTACCGAC	38	OPZ14	TCGGAGGTTT

Vale’, ‘Petroline’, ‘Pêra IPA-4’ e ‘Alfa Tropical’). As populações ‘Red Creole’, ‘Roxa IPA-3’, ‘Beta Cristal’, ‘CNPH 6400’ e ‘Valenciana 14’ não foram incluídas no grupo principal e formaram grupos individuais.

Historicamente, o melhoramento genético de cebola no Brasil iniciou-se com a introdução de materiais europeus, realizada por imigrantes provenientes da Ilha dos Açores, que colonizaram a região de Rio Grande, estado do Rio Grande do Sul. A partir desse material, diversas populações foram desenvolvidas por seleção natural e pela ação dos agricultores, sendo um exemplo mais expressivo a população ‘Baia Periforme’. Esse acesso é originário da cultivar portuguesa ‘Garrafal’ e tem sido um dos materiais genéticos mais utilizados nos programas de melhoramento conduzidos no Brasil (Leite & Anthonisen, 2009). Melo & Boiteux (2001) apresentam uma lista de aproximadamente 50 cultivares de cebola obtidas no Brasil a partir de ‘Baia Periforme’ no período de 1938 a 2000. Em 1972, a população ‘Baia Periforme’ foi levada para o estado de Pernambuco sendo, então, selecionada para latitudes de 8 a 9° (ou seja, para

bulbificação em dias ainda mais curtos) e para resistência a fatores bióticos bem como para condições de calor constante (Leite *et al.*, 2009). Originaram-se, assim, as diversas cultivares da chamada série IPA, tais como ‘Pêra IPA-4’, ‘Composto IPA-6’, ‘Belém IPA-9’ e ‘Vale-Ouro IPA-11’. A partir de ‘Roxa do Barreiro’, desenvolveram-se, também em Pernambuco, cultivares de cebola de bulbos roxos que vieram a integrar a série IPA, tais como ‘Roxa IPA-3’ e ‘Franciscana IPA-10’, avaliadas no presente trabalho.

Todas as cultivares da série IPA, com exceção da cultivar de bulbo roxo ‘Roxa IPA-3’, foram reunidas no grupo principal pela análise de RAPD (Figura 2). A discriminação de ‘Roxa IPA-3’ das demais cultivares da série IPA (‘Pêra IPA-4’, ‘Composto IPA-6’, ‘Belém IPA-9’, ‘Franciscana IPA-10’ e ‘Vale-Ouro IPA-11’) também foi observada com marcadores AFLP® (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), refletindo a origem distinta desses materiais (Santos *et al.*, 2011). Não era esperado, a princípio, que as cultivares ‘Franciscana IPA-10’ e ‘Roxa IPA-3’ fossem alocadas em grupos distintos, visto que

a primeira é derivada de seleção em uma população oriunda do cruzamento entre as cultivares ‘Roxa IPA-3’ e ‘Red Creole’. No entanto, a discriminação das cultivares ‘Franciscana IPA-10’ e ‘Roxa IPA-3’ tem sido corroborada em outros trabalhos usando descritores morfológicos, agrônômicos e bioquímicos (Buzar *et al.*, 2007) e marcadores AFLP® (Santos *et al.*, 2011), onde foi também verificada uma acentuada divergência genética entre essas duas cultivares. É interessante destacar que, embora ‘Franciscana IPA-10’ seja derivada de ‘Roxa IPA-3’, essa última é essencialmente derivada de ‘Roxa do Barreiro’, o que pode explicar sua separação em relação ao grupo das demais cultivares da série IPA avaliadas. Por essa mesma linha de análise, não era esperado que ‘Franciscana IPA-10’ estivesse presente no agrupamento contendo acessos derivados de ‘Baia Periforme’, como foi observado no presente estudo (Figura 2).

As cultivares ‘Conquista’, ‘Alfa Tropical’ e ‘Beta Cristal’ foram todas disponibilizadas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Hortaliças (Melo & Boiteux, 2001; Leite *et al.*, 2009). Dessas três, apenas ‘Beta Cristal’ não foi reunida no grupo principal contendo acessos derivados de ‘Baia Periforme’. A cultivar ‘Conquista’ pertence, de fato, ao grupo derivado de ‘Baia Periforme’ e foi desenvolvida visando à introdução da característica de resistência, no escapo (haste) floral, ao oomiceto *Peronospora destructor*, causador do mildio da cebola (Melo & Boiteux, 2001). ‘Alfa Tropical’ é originária do intercruzamento múltiplo entre plantas procedentes de dez cultivares brasileiras. Essa cultivar apresenta bulbos de coloração amarela/baia, predominantemente globulares e é adaptada para o cultivo no verão, sendo a única cultivar de cebola disponível no Brasil para cultivo durante essa estação do ano nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (Leite *et al.*, 2009). Por sua vez, ‘Beta Cristal’ se distingue das outras duas cultivares por possuir bulbos brancos, com teores mais elevados de açúcares totais, sendo indicada para desidratação, produção de pasta e conserva (Melo & Boiteux, 2001). Essa cultivar foi desenvolvida a partir de vários ciclos de seleção com

base em famílias de meio-irmãos e ciclos de seleção massal em população originada do cruzamento envolvendo as cultivares comerciais de cebola branca ‘Dehydrator #2’, ‘Dehydrator #5’, ‘Dehydrator #8’, ‘Primero’ e ‘White Creole’, todas desenvolvidas por instituições estrangeiras (Barbieri *et al.*, 2005). Esse *background* genético distinto explica a exclusão de ‘Beta Cristal’ do grupo principal pela análise de RAPD.

A cultivar ‘Crioula Alto Vale’ apresenta um histórico distinto, sendo originada no estado de Santa Catarina e tendo, possivelmente, germoplasma de ‘Baia Periforme’ em sua origem (Leite *et al.*, 2005). Posteriormente, seleções feitas em grande parte usando ‘Baia Periforme’ geraram diversas cultivares, tais como ‘Petrolina’ e ‘Pira-Ouro’ (Leite *et al.*, 2009), que também foram reunidas no grupo principal pela análise de RAPD (Figura 2). ‘Serrana’, outra cultivar pertencente ao grupo principal, é uma cultivar de dias curtos adaptada às condições de cultivo do estado de São Paulo e, assim como ‘Petrolina’ e ‘Pira-Ouro’, também foi selecionada a partir de uma população de ‘Baia Periforme’ proveniente do Rio Grande do Sul. A presença de ‘Aurora’ e ‘Primavera’, também no grupo principal, pode ser explicada pelo fato de as duas cultivares terem sido obtidas por meio de seleção massal de uma mesma população de origem, do tipo ‘Baia Periforme’, proveniente do sul do estado do Rio Grande do Sul, com variabilidade genética para precocidade (Leite *et al.*, 2005).

As cultivares ‘Baia Periforme’ e ‘Primavera’ foram alocadas de forma próxima dentro do grupo das cultivares de maior semelhança, apresentando um coeficiente de similaridade genética de 0,82 entre si. A elevada proximidade entre esses materiais também foi verificada via RAPD por Leite & Anthonisen (2009), o que possivelmente se explica pelo fato de ‘Primavera’ ser derivada de uma população de ‘Baia Periforme’ do sul do Rio Grande do Sul (Leite & Anthonisen, 2009).

A cultivar ‘Diamante’ foi desenvolvida para atender à indústria de conservas na forma de picles. Esse material se originou da seleção de mutantes de bulbos brancos comumente encon-

trados dentro de populações de ‘Baia Periforme’ (Cardoso *et al.*, 1995), o que pode explicar a sua inclusão no grupo principal pela análise conduzida no presente trabalho (Figura 2). ‘Bojuda Rio Grande’ é uma antiga variedade do Rio Grande do Sul, tardia, pungente, com uma típica coloração baia-bronzeada, formato periforme/bojudo, com alta capacidade de conservação pós-colheita. Essa cultivar também foi incluída no grupo principal pela análise de RAPD, confirmando, assim, sua proximidade com os materiais derivados de ‘Baia Periforme’.

De maneira similar ao reportado no presente estudo, o trabalho de Barbieri *et al.* (2005) com marcadores morfológicos revelou uma maior semelhança entre as cultivares ‘Aurora’, ‘Crioula Alto Vale’ e ‘Petrolina’ do que entre essas três cultivares e as cultivares ‘Diamante’ e ‘Beta Cristal’. Três grupos de similaridade foram estabelecidos: (1) incluindo todas as cultivares com bulbos de coloração marrom (‘Aurora’, ‘Crioula Alto Vale’ e ‘Petrolina’); (2) grupo formado por apenas uma cultivar local de bulbo roxo e (3) grupo formado pelas cultivares ‘Diamante’ e ‘Beta Cristal’ (bulbos brancos), que são altamente desuniformes e de péssima conservação pós-colheita (Barbieri *et al.*, 2005). No presente estudo, ‘Diamante’ e ‘Beta Cristal’ ficaram em grupos distintos.

As cultivares ‘Red Creole’ e ‘Valenciana 14’ foram os acessos mais divergentes, confirmando dados anteriores obtidos exclusivamente via análise de características morfológicas, agrônomicas e bioquímicas (Buzar *et al.*, 2007). Vale ressaltar que ‘Valenciana 14’ é uma cultivar derivada do grupo ‘Sweet Spanish’, sendo a típica cebola de padrão argentino, cascuda bronzeada com excelente retenção de catáfilos (escamas), de dias longos, pungente, folhas pouco cerosas, bulbos grandes (200 a 250 g) e globosos (Galmarini, 2000). Essa cultivar é vigorosa, resistente ao florescimento prematuro, de alta capacidade de conservação pós-colheita e ciclo muito tardio. ‘Valenciana 14’ não apresenta, no entanto, adaptação às latitudes das zonas de cultivo de cebola do Brasil, inclusive nas latitudes mais altas (estado do Rio Grande do Sul). Esse

conjunto de características fenotípicas distintas pode explicar a divergência encontrada, no presente trabalho, entre ‘Valenciana 14’ (que formou um grupo exclusivo) e as demais cultivares estudadas. Outra observação correlata é o fato de ‘CNPH 6400’, que é uma cultivar resultante do cruzamento entre ‘Baia Periforme Precoce’ e ‘Valenciana 14’, também ser discriminada pela análise de RAPD em um grupo exclusivo. Dessa forma, a separação de ‘CNPH 6400’ do grupo formado predominantemente pelas cultivares derivadas de ‘Baia Periforme’ deve-se, possivelmente, ao fato de ‘CNPH 6400’ ser descendente de ‘Valenciana 14’, um dos acessos mais divergentes.

Em síntese, verificou-se que o sistema RAPD foi eficaz em traçar um panorama sobre os níveis de relacionamento genético de diferentes cultivares/populações de cebola e que se mostrou, de maneira geral, em concordância com o histórico do pedigree desse grupo de acessos. Os dados também sugerem que o germoplasma amostrado apresenta uma base genética relativamente estreita, sendo formado, em sua grande maioria, de acessos oriundos da população ‘Baia Periforme’, com alguns poucos acessos com maior divergência. De maneira similar ao proposto por Santos *et al.* (2011), é recomendado a introdução de acessos com base genética distinta, visando aumentar a diversidade a ser explorada em programas de melhoramento genético conduzidos no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Maria Esther de Noronha Fonseca e Leonardo S. Boiteux são bolsistas de Produtividade em Pesquisa do CNPq/MCT.

REFERÊNCIAS

- BARBIERI RL; LEITE DL; CHOER E; SINIGAGLIA C. 2005. Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. *Ciência Rural* 35: 303-306.
- BARBIERI RL; MEDEIROS ARM. 2005. A cebola ao longo da história. In: BARBIERI RL (ed). *Cebola: ciência, arte e evolução*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 13-20.

- BOITEUX LS; FONSECA MEN; SIMON PW. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32-38.
- BRADEEN JM; HAVEY MJ. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA in bulb onion and its use to assess inbred integrity. *Journal of American Society for Horticultural Science* 120: 752-758.
- BUZAR AGR; OLIVEIRA VR; BOITEUX LS. 2007. Estimativa da diversidade genética de germoplasma de cebola via descritores morfológicos, agrônômicos e bioquímicos. *Horticultura Brasileira* 25: 527-532.
- CARDOSO AII; DELLA VECCHIA PT; FARIA LP. 1995. Herança da coloração de bulbos em cebola (*Allium cepa* L.) com resistência a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Scientia Agricola* 52: 384-386.
- CROSSAJ; FRANCO J. 2004. Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica* 137: 19-37.
- D'ENNEQUIN MT; PANAUD O; ROBERT T; RICOCH A. 1997. Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity* 78: 403-409.
- FISCHER D; BACHMANN K. 2000. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus Rhizirideum. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 153-164.
- FONTOURALFM. 1994. *As relações de produção e a produção do espaço agrário em São José do Norte*. Porto Alegre: UFRGS. 126 p (Dissertação mestrado).
- GALMARINICR. 2000. Onion cultivars released by La Consulta Experiment Station, INTA, Argentina. *HortScience* 35: 1360-1362.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012, 29 de fevereiro. *Indicadores*. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>
- JACCARD P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44: 223-270.
- KING JJ; BRADEEN JM; BARK O; McCALLUM JA; HAVEY MJ. 1998. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 52-62.
- LEITE DL; ANTHONISEN D. 2009. Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores RAPD. *Horticultura Brasileira* 27: 420-424.
- LEITE DL; BARBIERI RL; ANTHONISEN D. 2005. Divergência genética entre acessos do banco ativo de germoplasma de cebola da Embrapa Clima Temperado revelada por marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45. *Anais...* Fortaleza: ABH (CD-ROM).
- LEITE DL; OLIVEIRA VR; SANTOS CAF; COSTA ND; FONSECA MEN; BOITEUX LS; MELO PE; REISA; UENO B; BAPTISTA MJ. 2009. Melhoramento genético de cebola para as condições tropicais e subtropicais do Brasil. *Revista Colombiana de Ciências Hortícolas* 3: 18-27.
- LISBÃO RS. 1993. Cebola. In: FURLANI AMC; VIÉGAS GP (eds). *O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico*. Campinas: Instituto Agronômico. 524p.
- MAASS HI; KLAAS M. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozymes and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 89-97.
- MELO PCT; BOITEUX LS. 2001. Análise retrospectiva do melhoramento genético de cebola (*Allium cepa* L.) no Brasil e potencial aplicação de novas estratégias biotecnológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1. *Anais...* Goiânia: UFG / Embrapa Arroz e Feijão/Agencia Rural (CD-ROM).
- MOHAMMADI SA; PRASANNA BM. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.
- PEREDES CM; BECERRA VV; GONZALEZ AMI. 2008. Low genetic diversity among garlic (*Allium sativum* L.) accessions detected using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Chilean Journal of Agricultural Research* 68: 3-12.
- RAAMSDONK LWV; SMIECH MP; SANDBRINK JM. 1997. Introgression explains incongruence between nuclear and chloroplast DNA-based phylogenies in *Allium* section *Cepa*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 123: 91-108.
- ROHLF FJ. 2000. *NTSYS-pc*: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter Software. 38p.
- SANTOS CAF; OLIVEIRA VR; RODRIGUES MA; RIBEIRO HLC; SILVA GO. 2011. Similaridade genética entre cultivares de cebola de diferentes tipos e origens, baseada em marcadores AFLP. *Horticultura Brasileira* 29: 32-37.
- SHIGYO M; MIYAZAKI T; ISSHIKI S; TASHIRO Y. 1997. Assignment of randomly amplified polymorphic DNA markers to all chromosomes of shallot (*Allium cepa* L. aggregatum group). *Genes and Genetic Systems* 72: 249-252.
- SPOONER D; VAN TREUREN R; DE VICENTE MC. 2005. *Molecular markers for genebank management*. Roma: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) - Biodiversity International. 126p.
- TANIKAWA T; TAKAGI M; ICHII M. 2002. Cultivar identification and genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 71: 249-251.
- TINKER NA; FORTIN MG; MATHER DE. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 976-984.
- VAN HEUSDEN AW; VAN OOIJEN JW; VRIELINK-VAN GINKEL R; VERBEEK, WHJ; WIETSMA WA; KIK C. 2000. A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP™) markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 118-126.
- WILKIE SE; ISAAC PG; SLATER RJ. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 497-504.
- WILLIAMS CE; SAINT-CLAIR DA. 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome* 36: 619-630.