

Genotipagem de polimorfismos associados com sistemas de macho-esterilidade em acessos de cebola adaptados ao Brasil

Carlos Francisco Ragassi¹; Maria do Desterro M dos Santos²; Maria Esther de N Fonseca¹; Valter R Oliveira¹; Anne Giselle R Buzar¹; Cyro P da Costa³; Leonardo S Boiteux¹

¹Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70351-970 Brasília-DF; ²UnB, Depto. Fitopatologia, 70910-970 Brasília-DF; ³USP-ESALQ, C. Postal 09, 13418-900 Piracicaba-SP; carlos.ragassi@embrapa.br

RESUMO

A produção em escala comercial de sementes híbridas de cebola (*Allium cepa*) tem sido conduzida com o emprego de dois sistemas de macho-esterilidade do tipo genética-citoplasmática (CMS-S e CMS-T) em associação ao citoplasma normal (macho-fértil). No entanto, a análise molecular desses diferentes tipos citoplasmáticos ainda não está disponível para um grande número de acessos de cebola adaptados para cultivo em regiões tropicais. Além de adaptação às condições edafoclimáticas do Brasil, muitos desses acessos apresentam tolerância a doenças, sendo de potencial valor como genitores de híbridos. O presente trabalho visou identificar os tipos citoplasmáticos de acessos de cebola de diferentes grupos morfoagronômicos de interesse para o melhoramento genético no Brasil, usando a reação da polimerase em cadeia (PCR) com 'primers' específicos para regiões polimórficas do genoma mitocondrial de cebola. Foi observada, nos 66 acessos amostrados, a presença dos três principais tipos de citoplasma descritos para cebola (S, N e T). Foi constatada maior frequência do citoplasma S (56%) seguido do citoplasma T (25,8%). Em 18,2% das amostras, foi encontrado exclusivamente o citoplasma N. Essa caracterização pode ser útil para guiar a escolha de materiais genéticos dentro dos programas de melhoramento com objetivo de desenvolver cultivares híbridas adaptadas às condições tropicais.

Palavras-chave: *Allium cepa*, marcadores moleculares, genoma mitocondrial, macho-esterilidade genética-citoplasmática, melhoramento genético.

ABSTRACT

Genotyping of polymorphisms associated with male-sterility systems in onion accessions adapted for cultivation in Brazil

The synthesis of onion (*Allium cepa*) hybrids relies upon the use of two genetic-cytoplasmic male-sterility systems, CMS-S and CMS-T, in association to the normal male-fertile (N) cytoplasm. However, the molecular phenotyping of male-sterility-inducing and normal cytoplasm of many onion accessions adapted for cultivation under tropical conditions is not available. Some of these accessions were reported as presenting tolerance to diseases and adaptation to tropical and subtropical regions. Therefore, these accessions are potential sources of parental lines for the Brazilian onion hybrid breeding programs. In the present work, polymerase chain reaction (PCR) assays were conducted using mitochondria-derived markers in order to characterize the cytoplasm type present in different morpho-agronomic onion types cultivated in Brazil. The S cytoplasm appeared to be the most frequent one among the 66 evaluated accessions with a frequency of 56%. The T male-sterility-inducing cytoplasm was observed in 25.8% of the accessions. Of the samples, 18.2% displayed exclusively the cytoplasm N. This information could be useful to guide the onion breeding programs in the selection of parental lines aiming to develop hybrid cultivars adapted to tropical and subtropical areas of the world.

Keywords: *Allium cepa*, molecular markers, mitochondrial genome, genetic-cytoplasmic male-sterility, crop breeding.

(Recebido para publicação em 9 de setembro de 2011; aceito em 6 de junho de 2012)

(Received on September 9, 2011; accepted on June 6, 2012)

O agronegócio brasileiro de cebola (*Allium cepa*) é de grande importância socioeconômica para o país, tendo sido produzido 1,75 milhão de toneladas em 2010 (IBGE, 2012). As principais áreas de produção estão distribuídas nas Regiões Sul, Nordeste e Sudeste, onde predomina a agricultura de base familiar com o emprego de cultivares de polinização aberta (Santos & Oliveira, 2001). No entanto, novas fronteiras de produção baseadas em fazendas-empresas têm apresentado uma notável expansão no Nordeste (Chapada Diamantina, BA) e em áreas do Cerrado em Goiás (Cristalina) e Minas Gerais (São Gotardo) onde se observa o predomínio de híbridos

(Freitas & Ribeiro, 2011).

A utilização de híbridos, no contexto da produção de cebola, é uma estratégia muito interessante, visto que a produtividade pode ser bastante superior em relação a algumas cultivares de polinização aberta. No entanto, a produção de sementes híbridas de cebola só se tornou economicamente viável a partir da identificação e caracterização de sistemas de macho-esterilidade do tipo genética-citoplasmática (CMS). Dois sistemas de CMS têm sido utilizados para essa finalidade: CMS-S e CMS-T (Engelke *et al.*, 2003).

No sistema CMS-S, o fenótipo macho-estéril é resultante da interação

entre um *locus* nuclear (*Ms*) em homozigose recessiva (*ms/ms*) e um fator citoplasmático S (*sterility*). A fertilidade é restaurada pela presença de um alelo nuclear dominante (*Ms*) (Engelke *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009). A produção de híbridos requer a identificação de linhagens macho-estéreis, linhagens mantenedoras e linhagens polinizadoras com boa capacidade de combinação, sendo essas linhagens conhecidas como A, B e C, respectivamente (Santos *et al.*, 2008). Linhagens macho-estéreis (*S msms*), ou "A", são mantidas por sementes quando cruzadas com uma linhagem mantenedora, ou "B", a qual possui citoplasma normal (N) para

macho-fertilidade e genótipo *msms* para o loco restaurador da fertilidade (Santos *et al.*, 2008). Dessa forma, a presença dos tipos citoplasmáticos, macho-estéril e macho-fértil, é necessária na população base do programa de melhoramento, para que seja possível o estabelecimento de híbridos. A linhagem polinizadora, ou “C”, deve ser endogâmica, superior e macho-fértil para ser utilizada como genitora masculina dos híbridos.

No sistema CMS-T, o fenótipo é determinado pela interação do citoplasma estéril com três *loci* nucleares que segregam independentemente (Schweigsuth, 1973). Na presença do citoplasma T, a fertilidade é restaurada pela expressão de um alelo dominante no *locus A* ou de dois alelos dominantes complementares nos *loci B* e *C*.

O sistema CMS-S tem sido o mais amplamente utilizado em programas de melhoramento e produção de sementes, pois o fenótipo macho-estéril se mostra estável em diversas condições ambientais (Havey, 2000). Além disso, o alelo recessivo correspondente ao *locus Ms* ocorre em frequência relativamente alta, o que possibilita a propagação de linhas macho-estéreis por meio de sementes (Havey, 1995, 2000). O sistema CMS-T, apesar de possuir um sistema restaurador mais complexo, tem sido utilizado para produção de sementes híbridas de cebola na Europa (Havey, 2000).

Polimorfismos associados com o fenótipo de macho-esterilidade foram identificados inicialmente no sistema CMS-S. Essas diferenças genéticas resultam de uma inserção de 100 pares de bases (pb) na região IGS (“*intergenic spacer*”) dos genes “*trnT*” e “*trnL*” do DNA do cloroplasto das plantas com citoplasma N (Engelke *et al.*, 2003). Outro polimorfismo detectado foi a inserção, no genoma da mitocôndria das plantas com citoplasma S, de um fragmento homólogo a *orf1708* do DNA de cloroplasto de *Nicotiana tabacum* posicionado na região 5'-terminal do gene *cob* (Sato, 1998). Esses estudos tornaram possível a identificação dos citoplasmas S e N via ensaios laboratoriais usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). No polimorfismo detectado no genoma do cloroplasto, a PCR amplifica fragmentos de 1.100 pb e 1.000 pb nas plantas

com citoplasma N e S, respectivamente (Havey, 1995). No polimorfismo do genoma mitocondrial, identificado por Sato (1998), um fragmento de 414 bp e um de 180 pb são amplificados na presença, respectivamente, dos citoplasmas S e do grupo citoplasmático M, composto pelos citoplasmas T e N, que, até então, não podiam ser prontamente distinguidos por métodos moleculares (Engelke *et al.*, 2003). Esse cenário se modificou a partir do desenvolvimento de um marcador para a identificação da macho-esterilidade no sistema CMS₁ em cebolinha (*A. schoenoprasum*), cuja sequência é homóloga a uma região quimérica denominada *orfA501*. Esse marcador corresponde a uma banda de 473 pb e é amplificado na presença dos citoplasmas S e T em cebola, mas não na presença exclusiva do citoplasma N, macho-fértil (Engelke *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008). Assim, ao se utilizar a combinação entre os marcadores descritos por Sato (1998) e o par de ‘*primers*’ *orfA501* (Engelke *et al.*, 2003), tornou-se possível a distinção molecular entre os citoplasmas S, T e N em cebola.

Análises moleculares utilizando PCR têm sido conduzidas para identificação da frequência e distribuição dos citoplasmas S, T e N em um grupo significativo de cultivares brasileiras de cebola (Santos *et al.*, 2008; 2010). No entanto, a informação sobre a fenotipagem molecular de citoplasmas indutores da macho-esterilidade (S e T) ou normal (N), necessária para o desenvolvimento de híbridos, ainda não está disponível para um número grande de acessos de cebola desenvolvidos e/ou adaptados para cultivo no Brasil e de potencial valor como genitores de híbridos. Nesse contexto, o presente trabalho visou identificar os tipos de citoplasma presentes em uma coleção de diferentes grupos varietais (tipos morfoagronômicos) de interesse para o melhoramento genético de cebola para as condições brasileiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Acessos de cebola, composição das amostras e extração do DNA – foram amostrados 66 acessos de uma coleção de cebola pertencente à Embrapa Hortaliças, Brasília (DF) (Tabela 1).

Um subgrupo de acessos dessa coleção vem sendo avaliado para resistência a doenças (Oliveira *et al.*, 2004) bem como para descritores morfológicos, agrônômicos e bioquímicos (Buzar *et al.*, 2007). O DNA total foi extraído de folhas jovens por meio do tradicional método CTAB 2X em combinação com solventes orgânicos, incluindo algumas modificações de escala (Boiteux *et al.*, 1999). As folhas de 10 plantas de cada acesso foram coletadas e formaram um “bulk” de onde o DNA total foi extraído. A quantificação e a verificação da integridade do DNA foram realizadas por meio de eletroforese em géis de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm) em sistema de vídeo Eagle Eye® (Stratagene®).

Análises dos diferentes tipos de citoplasma de cebola via PCR – as reações de PCR foram realizadas conforme descrito por Engelke *et al.* (2003) em termocicladores GeneAmp PCR System 9700 com uso do marcador 5’*cob* (Sato, 1998) que, com base em polimorfismos nessa região do genoma mitocondrial, pode diferenciar o citoplasma S dos citoplasmas N e T via utilização dos seguintes ‘*primers*’: S-específico (5’-GTC CAG TTC CTA TAG AAC CTA TCA CT-3’), N-específico (5’-TCT AGA TGT CGC ATC AGT GGA ATC C-3’) e comum (5’-CTT TTC TAT GGT GAC AAC TCC TCT T-3’) (Engelke *et al.*, 2003). Aos acessos identificados como não portadores do citoplasma S na análise com o marcador 5’*cob*, foi aplicado o marcador *orfA501* (Engelke *et al.*, 2003), para a diferenciação entre os indivíduos normais (citoplasma N) e os portadores do citoplasma macho-estéril do tipo T. Esse marcador utiliza um par de ‘*primers*’: ‘*primer*’ 1 (5’-ATG GCT CGC CTT GAAAGA GAG C-3’) e ‘*primer*’ 2 (5’-CCA AGC ATT TGG CGC TGAC-3’) (Engelke *et al.*, 2003). As reações com os marcadores 5’*cob* constaram de: (a) um ciclo inicial de 2 min. a 94°C; (b) 40 ciclos de: 30 s a 94°C, 1 min. a 53°C, e 2 min. a 72°C, e (c) um ciclo final de 5 min. a 72°C. Para os marcadores *orfA501* adotou-se: (a) um ciclo inicial de 2 min. a 94°C; (b) 40 ciclos de: 30 s a 94°C, 1 min. a 60°C e 2 min. a 72°C, e (c) um ciclo final de 5

min. a 72°C. A separação dos amplicons foi realizada por meio de eletroforese em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm) em sistema de vídeo Eagle Eye® (Stratagene®).

Fenotipagem (identificação) molecular e interpretação do padrão de amplicons de acordo com os diferentes tipos de citoplasma de cebola – a identificação dos citoplasmas S, T e N baseou-se no sistema de fenotipagem descrito por Engelke *et al.* (2003) que se fundamenta na análise conjunta de amplicons obtidos de duas regiões do genoma mitocondrial (*5'cob* e *orfA501*). As amostras portadoras de citoplasma S foram caracterizadas pela amplificação dos fragmentos de 180 e 414 pb derivados da região *5'cob*. Foram caracterizados como portadores do citoplasma T os acessos que apresentaram apenas o fragmentos de 180 pb derivado da região *5'cob* e um fragmento de 473 pb derivado da região *orfA501*. Acessos portadores somente do citoplasma N apresentaram exclusivamente um fragmento de 180 pb obtido da amplificação de *5'cob* em combinação com a ausência de amplicons derivados da região *orfA501*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados acessos de cebola de diferentes tipos morfoagronômicos incluindo acessos de dias intermediários ('Pêra Norte', 'BRS Cascata', 'Crioula Alto Vale', 'Norte 14', 'Valenciana 14', 'Mayon' e 'Rijnsburger') e acessos de dias curtos (os demais). Os dois tipos de citoplasmas macho-estéreis (S e T) bem como o citoplasma N foram detectados entre os acessos avaliados. Das 66 amostras analisadas, 37 (56,0%) apresentaram o fragmento de 414 pb a partir da aplicação do marcador *5'cob* e foram consideradas portadoras do citoplasma S (Tabela 1 e Figura 1). Dezesete (25,8%) apresentaram apenas o fragmento de 180 pb com o marcador *5'cob* e um fragmento de 473 pb com o marcador *orfA501* e foram caracterizadas como portadoras do citoplasma T (Tabela 1 e Figuras 1 e 2). Doze amostras (18,2%) foram caracterizadas como portadoras do citoplasma N, pois apresentaram

exclusivamente um fragmento de 180 pb (Tabela 1 e Figura 1). É interessante notar que entre os acessos brasileiros, alguns apresentaram citoplasma S e outros apresentaram citoplasma T (Tabela 1). No entanto, nenhum dos acessos estrangeiros presentes na coleção exibiu o citoplasma T.

Os padrões obtidos no presente estudo (Tabela 1) são diferentes dos resultados preliminares que nossa equipe havia apresentado (Santos *et al.*, 2007) para os acessos 'Aurora', 'BRS Cascata', 'Beta Cristal', 'Excel', 'Franciscana

IPA-10', 'Roxa do Barreiro', 'Norte 14' e 'Madrugada'. Esse fato pode indicar que esta característica não está fixada nestas populações. É possível, ainda, que a análise em 'bulk', adotada tanto no presente trabalho quanto em Santos *et al.* (2007), possa ter mascarado a presença de indivíduos com citoplasma N dentro de populações em que os citoplasmas S ou T também estavam presentes. Esse fato explica as diferenças ocorridas entre os dois trabalhos com relação aos materiais 'Excel', 'Franciscana IPA-10' e 'Norte 14'. Ressalta-se,

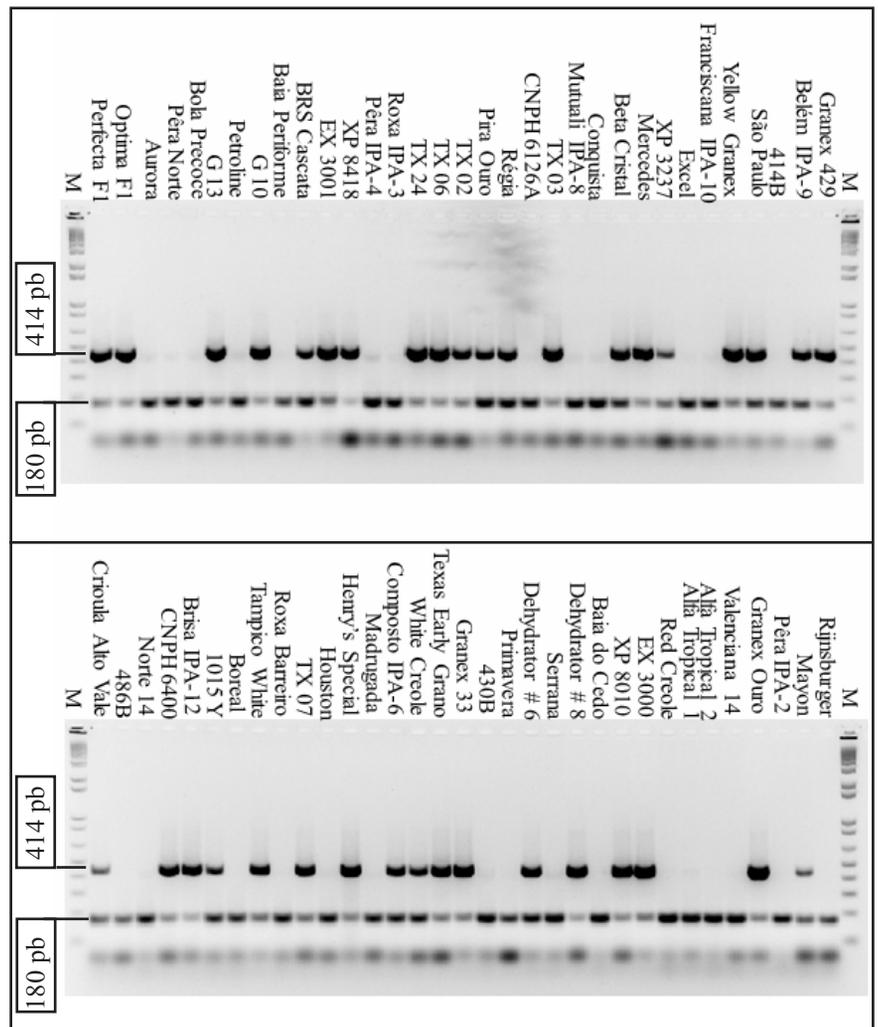


Figura 1. Acessos de cebola avaliados com o marcador molecular *5'cob* (Sato, 1998), capaz de diferenciar o citoplasma S (indutor de macho-esterilidade) dos citoplasmas N e T (macho-fértil e indutor de macho-esterilidade, respectivamente). A presença da banda de 414 pb indica que o acesso é portador do citoplasma S. A presença exclusiva da banda de 180 pb indica que o material apresenta citoplasma N ou T (onion accessions assessed through the molecular marker *5'cob* (Sato, 1998), which distinguishes the cytoplasm S (male-sterility-inducing) on the one hand and the cytoplasms N and T (male-fertile and male-sterility-inducing, respectively) on the other hand. The presence of the amplicon with 414 pb indicates one accession presents the cytoplasm S, whereas the presence of the amplicon with 180 pb, only, indicates one accession presents N or T cytoplasm]. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2010.

Tabela 1. Acessos de cebola avaliados com os marcadores moleculares 5'cob (Sato, 1998) e orfA501 (Engelke *et al.*, 2003) que, utilizados em conjunto, são capazes de discriminar os citoplasmas N (macho-fértil), S e T (indutores de macho-esterilidade). O símbolo (*), na linha, indica qual tipo citoplasmático está presente em dado acesso [onion accessions evaluated for the cytoplasm types S, T and N via the molecular markers 5'cob (Sato, 1998) and orfA501 (Engelke *et al.*, 2003) that when applied together are able to discriminate the cytoplasm types N (male-fertile), S and T (male-sterility-inducing). The symbol (*), in the line, indicates the cytoplasm type present in each accession]. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2010.

| Acesso ¹ | Citoplasma | | | Acesso | Citoplasma | | |
|--------------------------|------------|---|---|----------------------------------|------------|---|---|
| | S | T | N | | S | T | N |
| 'Perfecta F1' (i) | * | | | 'Crioula Alto Vale' (n) | * | | |
| 'Optima F1' (i) | * | | | 486B (n) | | | * |
| 'Aurora' (n) | | * | | 'Norte 14' (n) | | * | |
| 'Pêra Norte' (n) | | * | | CNPH 6400 (n) | * | | |
| 'Bola Precoce' (n) | | * | | 'Brisa IPA-12' (n) | * | | |
| 13-Doce (G 13) (i) | * | | | '1015Y' (i) | * | | |
| 'Petroline' (n) | | * | | 'Boreal' (n) | | * | |
| 10-Doce (G 10) (i) | * | | | CNPH 6327 ('Tampico White') (i) | * | | |
| 'Baia Periforme' (n) | | * | | 'Roxa do Barreiro' (n) | | | * |
| 'BRS Cascata' (n) | * | | | TX 07 (i) | * | | |
| 'EX 3001' (i) | * | | | Texas Grano 6300 ('Houston') (i) | | | * |
| 'XP 8418' (i) | * | | | 'Henry's Special' (i) | * | | |
| 'Pêra IPA-4' (n) | | | * | 'Madrugada' (n) | | * | |
| 'Roxa IPA-3' (n) | | | * | 'Composto IPA-6' (n) | * | | |
| TX 24 (i) | * | | | 'White Creole' (i) | * | | |
| TX 06 (i) | * | | | 'Texas Early Grano' (i) | * | | |
| TX 02 (i) | * | | | 'Granex 33' (i) | * | | |
| 'Pira-Ouro' (n) | * | | | 430B (n) | | | * |
| 'Régia' (n) | * | | | 'Primavera' (n) | | | * |
| CNPH 6126A (n) | | * | | CNPH 6336 ('Dehydrator # 6') (i) | * | | |
| TX 03 (i) | * | | | 'Serrana' (n) | | * | |
| 'Mutualli IPA-8' (i) | | * | | CNPH 6324 ('Dehydrator # 8') (i) | * | | |
| 'Conquista' (n) | | * | | 'Baia do Cedo' (n) | | * | |
| 'Beta Cristal' (n) | * | | | 'XP 8010' (i) | * | | |
| 'Mercedes' (i) | * | | | 'EX 3000' (i) | * | | |
| 'XP 3237' (i) | * | | | 'Red Creole' (i) | | | * |
| 'Excel' (i) | | | * | 'Alfa Tropical' 1 (n) | | * | |
| 'Franciscana IPA-10' (n) | | * | | 'Alfa Tropical' 2 (n) | | * | |
| 'Yellow Granex' (i) | * | | | 'Valenciana '14' (i) | | | * |
| 'São Paulo' (n) | * | | | 'Granex Ouro' (i) | * | | |
| 414B (n) | | | * | 'Pêra IPA-2' (n) | | * | |
| 'Belém IPA-9' (n) | * | | | 'Mayon' (i) | * | | |
| 'Granex 429' (i) | * | | | 'Rijnsburger' (i) | | | * |

¹i= acesso introduzido de outros países; n= germoplasma nacional (¹i= accessions introduced from other countries; n= Brazilian germplasm).

no entanto, que a banda de 180 pb indicadora do citoplasma N no marcador 5'cob (Sato, 1998) está presente em todos os tipos citoplasmáticos S, T e N (Engelke *et al.*, 2003) e, portanto, um acesso só foi marcado como portador do citoplasma N no presente trabalho

quando negativo para os citoplasmas S e T (Tabela 1). Registra-se, também, que, para maior confiabilidade dos resultados apresentados neste estudo, as análises foram repetidas duas vezes, obtendo-se repetidamente os padrões de bandas retratados nas Figuras 1 e 2.

Todas as amostras que apresentaram o fragmento de 414 pb apresentaram, também, amplificação do fragmento de 180 pb, referente ao citoplasma N (Figura 1). Este dado está de acordo com os obtidos em todos os acessos com citoplasma S analisados por Engelke *et*

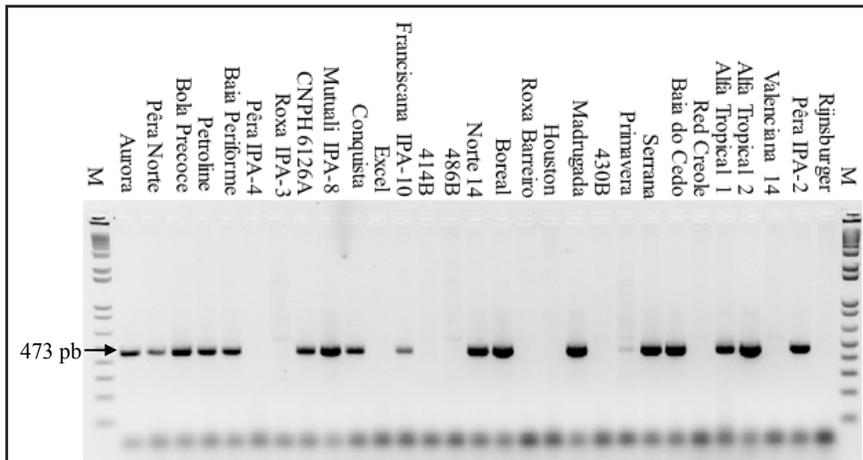


Figura 2. Acessos de cebola avaliados com o marcador molecular *orfA501* (Engelke *et al.*, 2003), capaz de diferenciar o citoplasma N (macho-fértil) dos citoplasmas S e T (macho-estéreis). A presença do amplicon de 473 pb indica que o acesso possui citoplasma macho-estéril do tipo T ou S. Sua ausência indica que o acesso é portador do citoplasma N (onion accessions assessed through the molecular marker *orfA501* (Engelke *et al.*, 2003), which can distinguish the cytoplasm N (male-fertile) on the one hand and the cytoplasms S and T (male-sterility-inducing) on the other hand. The presence of the amplicon with 473 pb indicates one accession presents the male-sterility-inducing cytoplasm T or S (Engelke *et al.*, 2003). The absence of this amplicon indicates the presence of the N cytoplasm). Brasília, Embrapa Hortaliças, 2010.

al. (2003). Como cada amostra foi proveniente de um “bulk” de 10 plantas, a presença concomitante das duas bandas pode também indicar que a população amostrada possuía mistura de plantas com citoplasmas S e N. Szklarczyk *et al.* (2002) também observaram a presença de uma banda de 180 pb, normalmente mais fraca, nas amostras de plantas portadoras do citoplasma S e afirmaram se tratar da presença de sequências de citoplasma N, em quantidades subestequiométricas no genoma mitocondrial das plantas com o citoplasma S. O genoma mitocondrial das plantas geralmente é composto por mais de uma molécula circular, contendo sequências em diferentes quantidades estequiométricas (Kim *et al.*, 2009). Desta forma, não se descarta a possibilidade de que um mesmo indivíduo possa apresentar uma mistura de tipos citoplasmáticos.

Análises do genoma proveniente das organelas citoplasmáticas sugeriram origens diferentes para os citoplasmas S e T em cebola (Holford *et al.*, 1991). De acordo com esses autores, ambos os genomas (mitocondrial e cloroplastidial) de indivíduos com citoplasma T mostraram-se idênticos ou, ao menos, estreitamente relacionados aos genomas dessas organelas provenientes de plantas

portadoras do citoplasma N. Dessa forma, é possível que o citoplasma T tenha sido originado de uma mutação dentro do citoplasma N sendo então, de origem autoplásmica (Holford *et al.*, 1991). Já, de acordo com os mesmos autores, para o citoplasma S, origem autoplásmica é pouco provável.

No que tange à introdução da característica de macho-esterilidade nas populações de cebola, alguns autores sugerem que o citoplasma S tenha sido inadvertidamente introduzido nas populações a partir da cultivar ‘Italian Red’, em que foi relatado pela primeira vez. Este fato pode ter ocorrido devido à presença concomitante do alelo restaurador da fertilidade (*Ms*) permitindo a introdução do citoplasma S sem expressão da macho-esterilidade. A linhagem de ‘Italian Red’ analisada no trabalho de Jones & Emsweller (1936), por sua vez, pode ter herdado o citoplasma S de um híbrido interestespecífico triplobióide cultivado no noroeste da Índia denominado ‘Pran’ ou, ainda, ‘Pran’ e a referida linhagem podem ser descendentes de um mesmo híbrido interestespecífico (Havey, 1993). Já em relação ao citoplasma T, informações são raramente encontradas, visto que esse sistema não tem sido utilizado no

melhoramento de cebola de maneira tão intensa quanto o CMS-S (Engelke *et al.*, 2003). A pesquisa conduzida por esses autores, no entanto, mostrou que o citoplasma T estava presente em cultivares de origem turca e alemãs. Sendo assim, verificou-se que esse tipo citoplasmático não está presente exclusivamente na cultivar francesa ‘Jaune paille des Vertus’, mas aparentemente disseminada em diferentes regiões do continente Europeu.

Muitas das cultivares brasileiras de cebola apresentam em sua base genética contribuições da cultivar ‘Baia Periforme’ (originária da cultivar Garrafal de origem Portuguesa) e ‘Pêra Norte’ (originária do Egito), que foram introduzidas na Região Sul do país pelos imigrantes açorianos que colonizaram a cidade portuária Rio Grande e região (Costa, 1978). Muitas seleções foram posteriormente conduzidas por agricultores, utilizando como base genética esse germoplasma. No presente trabalho, tanto ‘Baia Periforme’ e ‘Pêra Norte’ quanto diversas seleções destes tipos (ex. ‘Aurora’, ‘Bola Precoce’, ‘Petroline’, ‘Conquista’, ‘Boreal’, ‘Madruga’, ‘Serrana’, ‘Baia do Cedo’, ‘Alfa Tropical’ e ‘Pêra IPA-2’) apresentaram citoplasma do tipo T (Tabela 1, Figuras 1 e 2). A mesma tipagem citoplasmática T foi obtida com diferentes seleções de ‘Alfa Tropical’ (presente trabalho) e com a ‘BRS Alfa São Francisco’, que apresentou uma mistura com citoplasma N (Santos *et al.*, 2008).

Com exceção de ‘Mutalli IPA-8’, ‘Excel’, ‘Houston’, ‘Red Creole’, ‘Valenciana 14’ e ‘Rijsburger’, todos os demais acessos introduzidos de outros países apresentaram citoplasma S (Tabela 1). A identificação de citoplasma S na cultivar ‘Pira-Ouro’ é interessante, uma vez que essa cultivar foi resultante do cruzamento entre a população ‘Roxa do Barreiro’ (citoplasma N) como polinizador e ‘Baia Periforme’ como receptor de pólen (Silva, 1976). Como observado no presente trabalho, grande parte dos acessos derivados de ‘Baia Periforme’ apresentou citoplasma T (Tabela 1). No entanto, cruzamentos envolvendo fontes de citoplasma S podem ter sido conduzidos (inadvertidamente ou não), gerando variabilidade para essa característica entre populações do tipo ‘Baia Perifor-

me'. A cultivar 'Pira-Ouro' apresenta bons níveis de resistência à antracnose (*Colletotrichum* sp.) derivados do germoplasma de 'Barreiro' (Cardoso *et al.*, 1995) e pode ser usada para extração de linhagens visando desenvolver híbridos com essa característica.

Em resumo, os resultados obtidos permitiram identificar os tipos citoplasmáticos presentes e traçar prováveis rotas de origem de um grupo variado de cultivares de interesse para o melhoramento genético de cebola. Confirmou-se, também, que a metodologia de Engelke *et al.* (2003) é adequada para identificação rápida e precisa de plantas com os três tipos distintos de citoplasma (N, S e T). Essa genotipagem molecular facilita grandemente o desenvolvimento de híbridos dessa cultura a partir de acessos adaptados para regiões tropicais e subtropicais do Brasil (Santos *et al.*, 2008, 2010; Leite *et al.*, 2009). Dessa forma, essa caracterização será útil para guiar a escolha de genótipos em programas de melhoramento com objetivo de gerar cultivares híbridas adaptadas às condições tropicais e subtropicais.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/MCT pela concessão de Bolsas de Produtividade em Pesquisa aos autores Maria Esther de Noronha Fonseca e Leonardo Silva Boiteux.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BUZAR AGR; OLIVEIRA VR; BOITEUX LS. 2007. Estimativa da diversidade genética de germoplasma de cebola via descritores morfológicos, agrônômicos e bioquímicos. *Horticultura Brasileira* 25: 513-518.
- CARDOSO AI; 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.
- COSTA CP. 1978. *Melhoramento de cebola (Allium cepa L.) de dias curtos para sistemas de cultivo*. Piracicaba: USP-ESALQ. 138p (Tese Livre-Docência).
- 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.
- FREITAS JA; RIBEIRO A. 2011. Cebolicultura: Tendências e oportunidades em pesquisa, desenvolvimento e inovação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. *Palestras...* Viçosa: ABH (CD-ROM).
- HAVEY MJ. 1993. A putative donor of S-cytoplasm and its distribution among open-pollinated populations of onion. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 128-134.
- 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.
- HAVEY MJ. 2000. Diversity among male sterility inducing and male fertile cytoplasm of onion. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 778-782.
- HOLFORD P; CROFT JH; NEWBURY HJ. 1991. Differences between, and possible origins of, the cytoplasm found in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 82: 737-744.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012, 29 de fevereiro. *Indicadores*. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>
- JONES HA; EMSWELLER SL. 1936. A male-sterile onion. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 34: 582-585.
- KIM S; LEE ET; CHO DY; HAN T; BANG H; PATIL BS; AHN YK; YOON MK. 2009. Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing among three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 433-441.
- 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 Ciencias Hortícolas* 3: 18-27.
- OLIVEIRA VR; REIS A; BOITEUX, LS; VALENCIO AGRB; MOURA KJ. 2004. Reação de populações de cebola a fase foliar da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Horticultura Brasileira* 22: 354.
- 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.
- SANTOS CAF; LEITE DL; OLIVEIRA VR; RODRIGUES MA. 2010. Marker-assisted selection of maintainer lines within an onion tropical population. *Scientia Agricola* 67: 223-227.
- SANTOS CAF; OLIVEIRA VR. 2011. Melhoramento genético de cebola no Brasil: avanços e desafios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. *Palestras...* Viçosa: ABH (CD-ROM).
- SANTOSMDM; BUZARAGR; FONSECAMEN; OLIVEIRA VR; TORRES AC; BOITEUX LS. 2007. Caracterização molecular do tipo de citoplasma (N, S e T) em acessos de uma coleção brasileira de germoplasma de cebola. *Horticultura Brasileira* 25: S103.
- 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.
- SCHWEISGUTH B. 1973. Etude d'un nouveau type de stérilité mâle chez l'oignon, *Allium cepa* L. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 23: 221-233.
- SILVA N. 1976. *Resistência em cebola (Allium cepa L.) a Colletotrichum gloeosporioides Penz [sensu Arx, 1957]*. Piracicaba: USP-ESALQ. 67p (Dissertação mestrado).
- SZKLARCZYK M; SIMLAT M; JAGOSZ B; BAGY. 2002. The use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 625-634.