

**Identificação de Tipo de Citoplasma  
em Germoplasma de Cebola com  
Base em Marcadores Moleculares**



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2016

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Semiárido  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 130***

## **Identificação de Tipo de Citoplasma em Germoplasma de Cebola com Base em Marcadores Moleculares**

*Carlos Antonio Fernandes Santos  
Jucieny Ferreira de Sá  
Renata Natália Cândido de Souza Gama  
Antonio Esmael Silva de Oliveira  
Valter Rodrigues Oliveira*

Embrapa Semiárido  
Petrolina, PE  
2016

Esta publicação está disponibilizada no endereço:

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

**Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:**

**Embrapa Semiárido**

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros: Diana Signor Deon

Fernanda Muniz Bez Birolo

Francislene Angelotti

Gislene Feitosa Brito Gama

José Maria Pinto

Juliana Martins Ribeiro

Mizael Félix da Silva Neto

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Rafaela Priscila Antonio

Roseli Freire de Melo

Saete Alves de Moraes

Supervisor editorial: Sidinei Anunciação Silva

Revisor de texto: Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva

Foto da Capa: Carlos Antonio da Silva

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

**1ª edição** (2016):

#### **Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

#### **CIP - Brasil. Catalogação na publicação**

#### **Embrapa Semiárido**

---

Identificação de tipo de citoplasma em germoplasma de cebola com base em marcadores moleculares / Carlos Antonio Fernandes Santos... [et al.] – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

p. 16 p. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 130).

1. Agricultura – pesquisa. 2. Recurso genético. 3. Hibridação. 4. Melhoramento vegetal. 5. *Allium cepa* L. I. Santos, Carlos Antonio Fernandes dos. II. Sá, Jucieny Ferreira de. III. Gama, Renata Natália Cândido de Souza. IV. Oliveira, Antonio Esmael Silva de. V. Oliveira, Valter Rodrigues. VI. Título. VII. Série.

---

CDD 635.25

© Embrapa 2016

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	8
<b>Resultados e Discussão</b> .....	10
<b>Conclusões</b> .....	15
<b>Referências</b> .....	15

# Identificação de Tipo de Citoplasma em Germoplasma de Cebola com Base em Marcadores Moleculares

---

*Carlos Antonio Fernandes Santos<sup>1</sup>*

*Jucieny Ferreira de Sá<sup>2</sup>*

*Renata Natália Cândido de Souza Gama<sup>3</sup>*

*Antonio Esmael Silva de Oliveira<sup>4</sup>*

*Valter Rodrigues Oliveira<sup>5</sup>*

## Resumo

A identificação de diferentes tipos de citoplasmas associados à macho-esterilidade em cebola foi facilitada com a aplicação de marcadores de DNA em reações de reação em cadeia da polimerase (PCR), auxiliando no desenvolvimento de híbridos. O objetivo deste trabalho foi identificar, por PCR, o tipo de citoplasma presente em acessos brasileiro de cebola, de forma a facilitar o desenvolvimento de híbridos. O DNA de cinco plantas de cada acesso foi extraído de acordo com o protocolo do CTAB 2x. Entre os 30 acessos analisados, observou-se a presença dos três tipos de citoplasma. Doze acessos apresentaram tipo de citoplasma exclusivamente 'N', sete exclusivamente 'S' e apenas um exclusivamente 'T'. Seis acessos apresentaram mistura entre os tipos

---

<sup>1</sup>Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Bióloga, mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB), Cruz das Almas, BA.

<sup>3</sup>Bióloga, D.Sc. em Recursos Genéticos Vegetais.

<sup>4</sup>Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em Melhoramento de Plantas.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

de citoplasma 'N' e 'T', dois acessos mistura de 'N' e 'S' e outros dois acessos mistura de 'S' e 'T'. Os pares dos acessos 30 A CNPH e 30 B CNPH, 55 A CNPH e 55 B CNPH, e 54 A CNPH e 54 B CNPH são boas opções para o desenvolvimento de híbridos, pois não apresentaram misturas nas linhas 'A' e 'B', enquanto a população 17 CA 10, por apresentar plantas de diferentes citoplasmas, tem potencial para a identificação de linhas 'A' e 'B'.

**Termos para indexação:** *Allium cepa*, CMS, PCR, macho-esterilidade.

# Identification of Cytoplasm Type among Onion Germplasm Based on Molecular Marker

---

## Abstract

The identification of different types of cytoplasm in onion, associated with male sterility, was facilitated by application of DNA markers in Polymerase Chain Reaction (PCR), in order to develop onion hybrids. The combination of 5'cob and orfA501 made possible to distinguish the three main cytoplasm types of onion, two sterile ('S', and 'T') and one fertile ('N'). The goal of this study was to identify, based on PCR markers, the types of cytoplasm present in onion Brazilian accessions, in order to guide and facilitate the development of hybrids at Embrapa Semi-Arid. DNA of five plants of each accession was extracted according to the CTAB 2x protocol. Among 30 evaluated accessions, it was observed the presence of the three-cytoplasm types. Twelve accessions presented exclusively the 'N' cytoplasm, seven presented exclusively 'S' cytoplasm, and only one was exclusively 'T' type. Six accessions presented a mixture of 'N' and 'T', two a mixture of 'N' and 'S' and two a mixture of 'S' and 'T' cytoplasm types. The pair of accessions 30 A CNPH and 30 B CNPH, 55 A CNPH and 55 B CNPH, and 54 A CNPH and 54 B CNPH have a greater potential to be used to hybrid development, since they did not presented cytoplasm mixtures in the lines 'A' (sterile) and 'B' (fertile). The population 17 CA 10 has a greater potential to be screened for 'A' and 'B' lines since it presented both types of cytoplasm.

**Index terms:** *Allium cepa*, CMS, PCR, male sterility.

## Introdução

O agronegócio brasileiro de cebola (*Allium cepa* L.) é de grande importância socioeconômica para o país. Em 2015 foram produzidas 1,61 milhão de toneladas de bulbos (AGRIANUAL, 2016). Dentre as hortaliças, a cebola ocupa, em termos mundiais, o quarto lugar em importância econômica e o terceiro em volume de produção. O Brasil é o oitavo maior produtor de cebola, respondendo por 2% da produção mundial (FAO, 2013). 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.

No Nordeste brasileiro, a cebola é predominantemente produzida no Vale do São Francisco, com os estados de Pernambuco e Bahia produzindo 29.430 e 320.543 toneladas na safra de 2013, respectivamente (AGRIANUAL, 2016). Novas fronteiras de produção baseadas em fazendas-empresas têm apresentado uma notável expansão no Nordeste (Chapada Diamantina, BA), em áreas do Cerrado em Goiás (Cristalina) e Minas Gerais (São Gotardo), onde predominam o plantio de híbridos.

A produtividade de híbridos de cebola tem sido de até 192% a mais em relação ao parental mais produtivo e de até 367% em relação a algumas cultivares de polinização aberta (DOWKER, 1990). Linhas 'A' (macho-estéreis) e 'B' (macho-férteis, mantenedoras da macho-esterilidade) são necessárias para a produção comercial de sementes de cebola híbrida. Técnicas de biologia molecular disponíveis para a caracterização de fatores citoplasmáticos associados a macho-esterilidade estão sendo aplicadas para acelerar a identificação de linhas 'B' (ENGELKE et al., 2003; HAVEY, 1995; SATO, 1998).

Os sistemas de macho-esterilidade-gênico-citoplasmáticas (CMS) são a base para a produção de híbridos de cebola, o que requer a identificação de linhagens 'A', 'B' e polinizadoras ('C'), com boa capacidade de combinação (SANTOS et al., 2008). Linhagens macho-estéreis (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 e Clarke (1943). Em adição ao citoplasma 'N' macho-fértil, dois outros citoplasmas estéreis foram identificados em cebola: a) 'C' – identificado na população *Rijinsburger*, e b) 'T' – identificado na população *Jaune paille des Vertus* (SZKLARCZYK et al., 2002). A fertilidade é restaurada por um alelo dominante (*Ms*) no sistema CMS-(S) e por três locos 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). 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 do loco *male sterile* (*Ms*) ocorre com frequência relativamente alta, o que possibilita a propagação de linhas macho-estéreis por meio de sementes (HAVEY, 2000).

A identificação de diferentes tipos de citoplasma associados a macho-esterilidade foi facilitada com a aplicação de marcadores de DNA em duas reações de PCR: a) os *primers* desenvolvidos por Sato (1998), *5'cob*, levam em consideração um padrão de transcrição do gene mitocondrial *cob* no citoplasma 'S', que difere do citoplasma 'N', por apresentar uma inserção de uma sequência de DNA de cloroplasto, e b) os *primers* desenvolvidos por Engelke et al. (2003), *orfA501* consideram quiméricas mitocôndrias CMS específicas de cebolinha (*Allium schoenoprasum*).

O objetivo deste trabalho foi identificar por meio de marcadores moleculares, o tipo de citoplasma presente em acessos e populações de cebola, de forma a orientar e facilitar o desenvolvimento de híbridos na Embrapa Semiárido.

## Material e Métodos

Foram coletadas amostras foliares jovens de cinco plantas de 30 acessos de cebola, do programa de melhoramento da Embrapa (Tabela 1), para a extração de DNA, segundo o protocolo CTAB 2x (DOYLE;

DOYLE, 1990). As amostras foliares foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida o macerado vegetal de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL, devidamente identificados, contendo cada um 950  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB 2x, sendo colocados em banho-maria a 60 °C por 30 minutos, com inversão dos microtubos a cada 10 minutos. Após esta etapa, adicionou-se 950  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) em cada microtubo, que foi levado à centrifuga a 7.500 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação observou-se a formação de duas fases, sendo a fase superior (aquosa) alíquotada e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionando-se 467  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico gelado em cada microtubo. A solução foi homogeneizada e os microtubos foram mantidos em gelo por 20 minutos. Após esse período, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos para a deposição do 'pellet' no fundo do tubo, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento posto para secar em capela de exaustão de gases. Em seguida acrescentou-se 30  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA em cada microtubo, armazenando-se em geladeira por 24 horas para a completa dissolução do sedimento. Após esse período, a solução foi tratada com RNase durante 45 minutos em banho-maria a 37 °C. A integridade do DNA total, após o tratamento com RNase, foi observada em gel de agarose 0,8%.

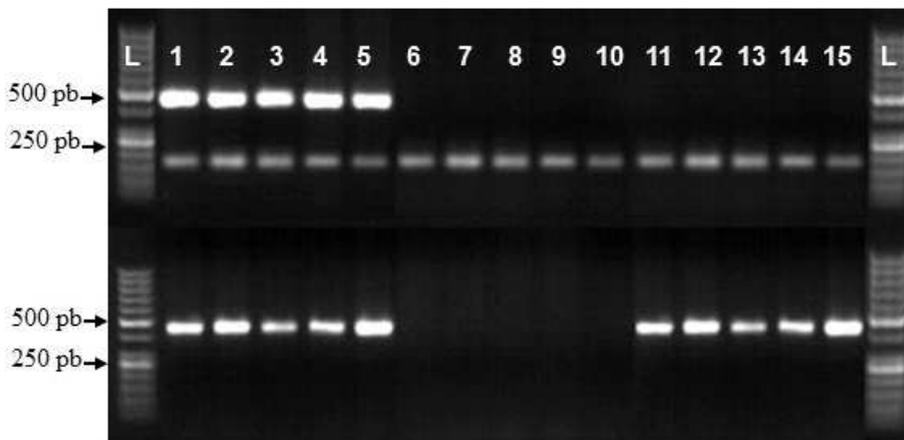
As PCRs foram realizadas conforme metodologia descrita por Engelke et al. (2003), com modificações, para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ : 0,25  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, 150  $\mu\text{M}$  de dNTP, 1x de tampão de PCR, 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase 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'-TCTAGATGTCGCATCAGTGAATCC- 3'; *primer* comum 'N': 5'-CTTTTCTATGGTGACAACCTCCTT-3', que amplificam fragmentos de 180 e 414 pb para citoplasmas 'N' e 'S', respectivamente; e os publicados por Engelke et al. (2003), denominados como marcador *orfA501*: *primer* 1: 5'-ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3', *primer* 2:

5'-CCAAGCATTGGCGCTGAC-3', que amplificam um fragmento de 473 pb. A programação do termociclador para as ampliações com os marcadores *5'cob* consistiu de: a) um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, b) 36 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 53 °C e 2 minutos a 72 °C, e c) um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Para os marcadores *orfa501A* adotou-se: a) um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, b) 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 54 °C e 2 minutos a 72 °C, e c) um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%.

A identificação de citoplasmas 'N', 'S' e 'T' foi realizada com base na metodologia de Engelke et al. (2003): a) citoplasma 'N' – presença do fragmento de 180 pb e ausência dos demais fragmentos; b) citoplasma 'S' – presença dos fragmentos de 180 pb, 414 pb e 473 pb e c) citoplasma 'T' – presença dos fragmentos de 180 pb e de 473 pb e ausência do fragmento de 414 pb.

## Resultados e Discussão

Foram necessárias duas reações de PCR para a identificação do citoplasma 'S', 'N' ou 'T': uma com os *primers* 'N' + 'S' + 'C' (SATO, 1998) e outra com os *primers* publicados por Engelke et al. (2003). Nos géis de agarose foi possível verificar a presença dos fragmentos de 180 pb, 414 pb e 473 pb e não foram observadas ampliações inespecíficas (Figura 1). Estes resultados demonstram que os protocolos utilizados são adequados para a amplificação do fragmento do DNA mitocondrial, onde a mutação para a macho-esterilidade citoplasmática é encontrada, corroborando com os resultados apresentados por Engelke et al. (2003), Santos et al. (2008) e Sato (1998).



**Figura 1.** Fragmentos de DNA de 15 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com o *primers*5' *cob* e *orfA501*. Acesso 30 A CNPH (citoplasma 'S', fragmentos com 414, 180 e 473 pb) = colunas 1, 2, 3, 4 e 5. Acesso 39 B CNPH (citoplasma 'N', fragmentos 180 pb) = 6, 7, 8, 9 e 10. Acesso 55 A CNPH (citoplasma 'T', fragmentos 180 e 473 pb) = 11, 12, 13, 14 e 15. L = Ladder 50 pb (Thermo Scientific). Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 2015.

Para alguns acessos, o número de plantas analisadas foi menor que cinco por causa de problemas na reação de PCR, situação que não comprometeu as análises dos resultados (Tabela 1).

Os acessos 30 B CNPH, 39 B CNPH, 80 B CNPH, 65 B CNPH, 78 B CNPH, 55 B CNPH, 54 B CNPH e 44 B CNPH apresentaram 100% das plantas com citoplasma 'N' (Tabela 1). Esses acessos foram previamente identificados como linhas macho-férteis e têm excelente potencial para serem usadas como linhagens mantenedoras para a produção de híbridos de cebola.

Os acessos 30 A CNPH, 81 A CNPH e 54 A CNPH apresentaram 100% das plantas analisadas com citoplasma 'S', enquanto o acesso 55 A CNPH apresentou 100% das plantas com citoplasma 'T' (Tabela 1). Esses acessos foram previamente identificados por cruzamentos testes como linhas macho-estéreis e têm grande potencial para serem usadas como linhas 'A' para a produção de híbridos de cebola. Segundo Santos et al. (2008), a identificação do CMS tipo 'T' é rara, pois até 2003 não era possível distinguir o citoplasma 'T' do citoplasma 'N' por métodos moleculares.

**Tabela 1.** Acessos de cebola (*Allium cepa* L.), número de plantas com diferentes tipos de citoplasma quando analisadas com iniciadores de DNA específicos para tipos estéril 'S', normal 'N' e estéril 'T'.

Acesso	Número de Plantas analisadas	Tipo de Citoplasma		
		S	N	T
17 CA 10	5	3	2	
25 CA 10	4	4		
30 A CNPH	5	5		
30 B CNPH	5		5	
39 A CNPH	5	4	1	
39 B CNPH	5		5	
44 B CNPH	4		4	
54 A CNPH	4	4		
54 B CNPH	5		5	
55 A CNPH	5			5
55 B CNPH	5		5	
6109 B CNPH	5		4	1
6268 A CNPH	4	1		3
65 A CNPH	5		1	4
65 B CNPH	5		5	
78 A CNPH	5		1	4
78 B CNPH	5		5	
80 A CNPH	5		1	4
80 B CNPH	5		5	
81 A CNPH	5	5		
81 B CNPH	4		2	2
Cascuda amarela SI	5		5	
IPA 10	5		2	3
IPA 11	5		5	
IPA 12	5	5		
T 11 Botucatu	4		4	
T 11 Botucatu B	5		5	
T6 13 CR 15	4	4		
T8 11 CR 13	5	3		2
T8 11 CR 15 A	5	5		

Os pares dos acessos 30 A CNPH e 30 B CNPH (citoplasmas 'N' e 'S', respectivamente), 55 A CNPH e 55 B CNPH (citoplasmas 'T' e 'N', respectivamente), e 54 A CNPH e 54 B CNPH (citoplasmas 'N' e 'S', respectivamente) (Tabela 1) são boas opções para o desenvolvimento de híbridos, pois não apresentaram misturas nas linhas A e B, confirmando estudos de cruzamentos testes que estão sendo realizados nas condições de Brasília, DF pela Embrapa Hortaliças.

A cultivar IPA 10 apresentou mistura de citoplasmas 'N' e 'T', enquanto a população 17 CAI 1 apresentou misturas de citoplasmas 'N' e 'S' (Tabela 1), sendo opções para a seleção de linhas 'A' e 'B' para o desenvolvimento de híbridos de bulbos de coloração roxa e do tipo valenciano, respectivamente. A presença dos tipos citoplasmáticos macho-estéril e macho-fértil é necessária na população base quando se objetiva o desenvolvimento de novos híbridos de cebola.

As cultivares IPA 11 e IPA 12 apresentaram tipos únicos de citoplasma, 'N' e 'S', respectivamente, indicando dificuldades para a seleção de linhas 'A' e 'B' nessas cultivares (Tabela 1). Uma opção para essas cultivares será o uso da IPA 11 como mantenedora da IPA 12, objetivando a produção de híbridos.

As populações T6 13 CR 15, T8 11 CR 15 A e 25 CA 10 apresentaram, exclusivamente, citoplasma estéril 'S', enquanto T 11 Botucatu e T11 Botucatu B apresentaram citoplasma fértil 'N' (Tabela 1). Essas populações, todas do tipo valenciano, podem ser usadas considerando-se as populações do tipo 'N' como mantenedoras das populações dos tipos 'S', após estudos para identificação dos alelos recessivos da macho-esterilidade, em esquemas de cruzamentos testes.

Cinco plantas de cada acesso é um número adequado para identificar a presença de diferentes tipos de citoplasmas, como as identificadas nos acessos 39 A CNPH, 81 B CNPH, 80 A CNPH, 65 A CNPH, 78 A CNPH, 6109 B CNPH e 6268 A CNPH, bem como para identificar populações e/ou cultivares com diversidade no tipo de citoplasmas que facilitem a identificação de linhas 'A' e 'B', como as identificadas em IPA 10 e 17 CAI 1 (Tabela 1). Considerando-se a frequência de um tipo de citoplasma como sendo igual a 0,5 numa determinada população, a probabilidade de que todas as cinco plantas sejam férteis, devido ao acaso e não a constituição genética, é de apenas 3,1% (0,5<sup>5</sup>). Essa probabilidade é satisfatória para avaliações preliminares, pois permite a identificação de populações e/ou acessos candidatos para a identificação dos citoplasmas 'S' ou 'T' e 'N' com um mínimo de plantas, economizando tempo e recursos.

A presença de um único tipo de citoplasma nas cinco plantas avaliadas indica que um grande número de plantas deverá ser avaliado, sem a garantia de se encontrar outro tipo diferente do que foi identificado na amostra inicial.

Trabalhando com diferentes frequências de citoplasma 'N' e do alelo 'ms', Havey (1995) estimou que a aplicação da seleção assistida para citoplasma em cebola pode reduzir o número de plantas avaliadas em campo em até 85%. Deve ser enfatizado que a identificação de linhas mantenedoras (linha 'B') é o grande desafio no desenvolvimento de híbridos de cebola, pois plantas macho-estéreis (linha 'A') podem ser facilmente identificadas no campo, como descrito por Santos et al. (2010).

O sistema CMS-T é considerado uma fonte secundária de macho-esterilidade e é utilizado para a produção de sementes híbridas de cebola na Europa. O sistema CMS-S é amplamente utilizado por produtores de sementes (HAVEY, 2000), pois nesse tipo a macho-esterilidade é resultante da interação de apenas um loco nuclear com o fator citoplasmático, enquanto no sistema CMS-T, o fenótipo é determinado de forma mais complexa, pela interação do citoplasma estéril com três loci nucleares, que segregam independentemente (SCHWEISGUTH, 1973), sendo, portanto, mais difícil de ser manejada no âmbito de um programa de melhoramento genético.

A utilização da PCR para a identificação do tipo de citoplasma em cebola foi introduzida por Havey (1995), necessitando de ajustes que requerem apenas uma reação para identificação dos três tipos de citoplasma (KIM et al., 2009). Santos et al. (2010) identificaram linhas mantenedoras na cultivar Alfa São Francisco, com apoio dos sistemas de *primers* de DNA desenvolvidos por Sato (1998) e Elgelke et al. (2003), possibilitando o desenvolvimento de híbridos de cebola tropical, do tipo CMS-T, de maior complexidade quando comprado com o tipo CMS-S, pois no sistema T, três locos nucleares segregam independentemente.

Neste trabalho foram identificados acessos com potencial para o desenvolvimento de híbridos do tipo CMS-S e CMS-T, bem como cultivares de cebola que apresentam mistura de citoplasmas 'N' e 'S' ou 'N' e 'T', o que poderá auxiliar no desenvolvimento de híbridos específicos para o Nordeste brasileiro. Deve ser destacado que recentemente foram desenvolvidos marcadores para a identificação dos alelos Msms, do sistema CMS-S, (HUO et al., 2015) que, associado com os sistemas que possibilitam a identificação do tipo de citoplasma, facilitará o desenvolvimento de híbridos de cultivares de cebola, reduzindo ainda mais o tempo e o trabalho de campo para a identificação das linhas macho estéreis e macho férteis.

## Conclusões

Observou-se a presença dos três tipos de citoplasma ('S', 'N' e 'T') nos 30 acessos de cebola analisados. Doze acessos apresentaram tipo de citoplasma exclusivamente 'N', sete foram exclusivamente 'S', um exclusivamente 'T' e 10 apresentaram mistura entre os tipos de citoplasma 'N' e 'T', 'N' e 'S' e 'S' e 'T'.

Os pares dos acessos 30 A CNPH e 30 B CNPH, 55 A CNPH e 55 B CNPH, e 54 A CNPH e 54 B CNPH são boas opções para o desenvolvimento de híbridos, pois não apresentaram misturas nas linhas 'A' e 'B', enquanto a população 17 CA 10, por apresentar plantas de diferentes citoplasmas, tem potencial para a identificação de linhas 'A' e 'B'.

## Referências

AGRIANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, 2016. p. 233-238.

DOWKER, B. D. Onion breeding. In: RABINOWITCH, H. D.; BRESTER, J. L. (Ed.). **Onions and allied crops**. Baton Route: CRC Press, 1990. p. 125-232.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v. 12, p. 13-15, 1990.

ENGELKE, T.; TEREFE, D.; TATLIOGLU, T. A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Cham, v. 107, p. 162-167, 2003.

FAO. **Statistical Yearbook**: 2013: world food and agriculture. Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 15 maio 2016.

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

HAVEY, M. J. Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. **Theoretical and Applied Genetics**, Cham, v. 101, p. 778-782, 2000.

HUO, Y. M.; LIU, B. J.; YANG, Y. Y.; LI, J. M.; GAO, M.; KONG, S. P.; WANG, Z. B.; KITANO, H.; WU, X. AcSKP1, a multiplex PCR-based co-dominant marker in complete linkage disequilibrium with the male-fertility restoration (Ms) locus, and its application in open-pollinated populations of onion. **Euphytica**, Cham, v. 204, p. 711-722, 2015.

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

KIM, S.; LEE, E.T.; CHO, D. Y.; HAN, T.; BANG, H.; PATIL, B. S.; AHN, Y. K.; YOON, M. K. 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**, Cham, v. 118, p. 433-441, 2009.

SANTOS, C. A. F.; LEITE, D. L.; COSTA, N. D.; OLIVEIRA, V. R.; SANTOS, I. C. N.; RODRIGUES, M. A. Identificação dos citoplasmas "S", "T" e "N" via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 26, p. 308-311, 2008.

SANTOS, C. A. F.; LEITE, D. L.; OLIVEIRA, V. R. de; RODRIGUES, M. A. Marker-assisted selection of maintainer lines within an onion tropical population. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 67, p. 223-227, 2010.

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

SCHWEISGUTH B. Etude d'un nouveau type de stérilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L. **Annales de l'Amélioration des Plantes**, Paris, v. 23, p. 221-233, 1973.

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



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



CGPE 13509