

**CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUÇÃO DE  
ALHO-SEMENTE DA CULTIVAR AMARANTE POR  
MEIO DE MARCADORES RAPD**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimázio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Souza Dias*

Chefe -Geral

*Maurício Antonio Lopes*

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*

Chefe-Adjunto de Administração

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 61***

## **CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUÇÃO DE ALHO-SEMENTE DA CULTIVAR AMARANTE POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

Gláucia Salles Cortopassi Buso

Martinho Rabelo Paiva

Allen Araújo Cerqueira

Jaqueline Ceolin de Amorim

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral

André Nepomuceno Dusi

Antonio Carlos Torres

José Amauri Buso

Brasília, DF

2004

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61)  
340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

**Presidente:** *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

C 764 Controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar  
Amarante por meio de marcadores RAPD / Gláucia Salles  
Cortopasi Buso ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos  
e Biotecnologia, 2004. 15 p. – (Boletim de Pesquisa e  
Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia, 1676-1340; 61)

1. Alho. 2. Marcadores moleculares. 3. Germoplasma. 4. Erradicação  
de vírus. I. Buso, Gláucia Salles Cortopasi. II. Série.

635.26 - CDD 21

# **CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUÇÃO DE ALHO-SEMENTE DA CULTIVAR AMARANTE POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

Gláucia Salles Cortopassi Buso<sup>1</sup>

Martinho Rabelo Paiva<sup>2</sup>

Allen Araújo Cerqueira<sup>2</sup>

Jaqueline Ceolin de Amorim<sup>2</sup>

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral<sup>1</sup>

André Nepomuceno Dusi<sup>3</sup>

Antonio Carlos Torres<sup>3</sup>

José Amauri Buso<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Estudante de graduação

<sup>3</sup> Embrapa Hortaliças

## SUMÁRIO

Resumo .....	7
Abstract .....	8
Introdução .....	9
Material e Métodos .....	11
Resultados e Discussão .....	12
Conclusões.....	13
Agradecimentos .....	13
Referências Bibliográficas .....	14

# CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUÇÃO DE ALHO-SEMENTE DA CULTIVAR AMARANTE POR MEIO DE MARCADORES RAPD

## RESUMO

A produção mundial de alho é de aproximadamente oito milhões de toneladas. No Brasil, o alho é uma das principais hortaliças em área cultivada (17.640 ha), detendo também expressivo volume de produção, com cerca de 120 mil toneladas anuais. Sendo o alho uma espécie propagada vegetativamente, as viroses assumem um papel preponderante na redução da produção e qualidade do alho produzido, acarretando uma perda gradual da capacidade produtiva da planta e na longevidade dos bulbos em armazenamento. Praticamente todo o alho-semente utilizado no Brasil está contaminado com um ou mais patógenos, notadamente vírus. Objetivando um melhoramento da qualidade sanitária do alho-semente, foram obtidos estoques de material livre de vírus da cultivar Amarante (aproximadamente 400.000 bulbilhos). A capacidade de distinção de cultivares de alho, visando à detecção de mistura varietal após multiplicação *in vitro* é extremamente importante, já que no segundo ciclo de multiplicação, em casa de vegetação, a correta identificação não é possível até que os bulbos sejam produzidos. Marcadores obtidos através da amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) podem ser utilizados para diferenciar cultivares quando estas não são ou não estão em uma fase morfológicamente distinguível. Estes marcadores são rápidos de se obter e têm custo acessível, podendo ser uma alternativa para uso no controle de qualidade de lotes iniciais de alho-semente após as fases de termoterapia e cultura de ápices caulinares. Foram comparados grupos de cinco plantas de algumas cultivares: Mossoró, Quitéria, Chonan, Caçador, Amarante (este último, positivo para presença de vírus), com dez grupos de 20 indivíduos cada de plantas da cultivar Amarante comprovadamente livres de vírus. Foram identificados dezesseis marcadores RAPD que só amplificaram nos grupos da cultivar Amarante, distinguindo-os dos grupos das demais cultivares. Além disso, nenhuma diferença foi constatada entre o perfil eletroforético dos grupos de indivíduos livres de vírus e do grupo positivo para a presença de vírus, na cultivar Amarante, confirmando-se que não houve mistura na manipulação do material na fase de limpeza clonal. Os 16 marcadores RAPD são adequados para a identificação da cultivar Amarante quando comparada com as cultivares avaliadas, todas sendo manipuladas em laboratório de biologia celular da Embrapa Hortaliças no processo de erradicação de vírus.

Termos para indexação:

Marcadores moleculares, germoplasma, erradicação de vírus, *Allium sativum*

## Quality control of garlic-seed production of Amarante cultivar through RAPD markers

### ABSTRACT

The world production of garlic is approximately eight millions metric tons. In Brazil, garlic is one of the most important vegetable crops in cultivated area (17.640 ha), also having an expressive production volume, around 120 thousand metric tons, yearly. As a vegetatively propagated species, virus diseases are a key problem regarding production and quality of bulbs, causing a gradual loss of yield and decrease in storage capacity. Almost all garlic-seed used in Brazil is contaminated with one or more pathogens, mainly viruses. With the aim to improve the sanitary quality of garlic-seed, a virus free stock of garlic cultivar Amarante was obtained (approximately 400.000 bulbs). The capacity of distinction of garlic cultivars, aiming the detection of varietal mixing after *in vitro* multiplication, is extremely important, since in the second multiplication cycle, under green house conditions, the correct identification is not possible until the production of bulbs. Markers obtained through the random amplification of polymorphic DNA (RAPD) may be used to differentiate the cultivars while they are not in a stage that allows morphological distinction. These markers are easy to obtain and have accessible costs and they may be an option for quality control of the initial lots of garlic-seeds after thermotherapy and shoot tip culture. Bulks of DNA of five plants of some cultivars were compared: Mossoró, Quitéria, Chonan, Caçador, Amarante (this last one, positive for the virus presence), with ten DNA bulks of 20 individuals of each plant of Amarante cultivar free of viruses. Sixteen RAPD markers were identified which were amplified only in the Amarante cultivar bulks, differentiating them from the other cultivars used in this study. Additionally, no difference was identified between the fingerprints of the bulks free of virus and the bulks positive for the virus presence, in the Amarante cultivar, confirming that there was no mixing in the material manipulation in the phase of clonal multiplication. The 16 RAPD markers are suitable for identification of the cv. Amarante when compared with the other studied cultivars, all being evaluated in the Embrapa Hortaliças cellular biology laboratory in the eradication virus process.

Index terms:

Molecular markers, germplasm, virus eradication, *Allium sativum*

## 1- INTRODUÇÃO

A produção mundial de alho é de aproximadamente oito milhões de toneladas (FAO, 2003). No Brasil, o alho é uma das principais hortaliças em área cultivada (17.640 ha), detendo também expressivo volume de produção, cerca de 120 mil toneladas anuais (IBGE, 2001). O rendimento médio das lavouras ainda é baixo, cerca de sete t/ha em 2001 (IBGE, 2001). A variação regional de produtividade é muito grande, com alguns produtores chegando a produzir mais de 13 t/ha, enquanto outros não colhem nem uma t/ha em igual área. Naturalmente que fatores como clima e solo concorrem para essa variação, mas a questão está mais relacionada às cultivares plantadas e às técnicas de cultivo diferenciadas (Menezes Sobrinho, 1997), destacando-se a baixa tecnologia que, muitas vezes, é adotada do plantio à colheita. O alho tem grande importância econômica e social no Brasil. O valor total da produção é estimado em mais de R\$ 234 milhões por ano (IBGE, 2001). É uma hortaliça cultivada, na grande maioria, por pequenos produtores, com utilização intensa de mão-de-obra (Embrapa, 1984; Emater, 1995). Estima-se que sejam criados cerca de 25.000 empregos diretos na cadeia produtiva, considerando-se os segmentos de produtores e de trabalhadores rurais empregados nas lavouras. O Brasil produz, atualmente, cerca de 60% do alho que consome e importa o restante da Argentina, Espanha, Chile e mais recentemente, da China. As regiões Sul e Sudeste produzem 80% do alho nacional, e os estados que mais produzem são Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Espírito Santo, havendo também produção de cultivares nobres na região Centro-Oeste (Menezes Sobrinho, 1997).

Sendo o alho uma espécie de propagação vegetativa, há acúmulo, entre gerações de multiplicação, de agentes causais de doenças importantes, que são transportados de um ciclo de produção a outro, via bulbilho-semente contaminado. Praticamente todo o alho-semente utilizado no Brasil está contaminado com um ou mais patógenos, notadamente vírus. Estas doenças causam diminuição da produtividade e da qualidade dos bulbos. Objetivando um melhoramento da qualidade sanitária do alho-semente, foram obtidos estoques de material livres de vírus da cultivar Amaranthe (aproximadamente 400.000 bulbilhos). A capacidade de distinção de cultivares de alho, visando à detecção de mistura varietal após multiplicação *in vitro* é extremamente importante. No segundo ciclo de multiplicação, em casa de vegetação, a correta identificação da cultivar não é possível até que os bulbos sejam produzidos.

Mesmo com a introdução de vários sistemas de marcadores moleculares nos últimos dez anos, a utilização dos mesmos em alho tem sido muito limitada (Lampasona et al., 2003). Espécies com genoma grande como o alho, com conteúdo de DNA por núcleo 2C de 32,7 pg (Evans et al., 1983), fazem com que a análise molecular seja mais laboriosa. Mesmo assim, a geração de um grande número de marcadores se torna possível através de técnicas que utilizam a reação de polimerase em cadeia (PCR). Marcadores obtidos através da amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) podem ser utilizados para diferenciar cultivares quando estas não são ou não estão em uma fase morfológicamente distinguíveis (Welsh & McClelland, 1990). Estes marcadores são rápidos de se obter e têm custo acessível, podendo ser uma alternativa para uso em controle de qualidade de lotes iniciais de alho-semente após as fases de

termoterapia e cultura de ápices caulinares. Neste trabalho avaliou-se a possibilidade de utilização de marcadores RAPD na verificação de mistura varietal, após multiplicação *in vitro*, certificando-se assim a não ocorrência de misturas varietais ou a correta identificação dos clones produzidos.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

Foram comparados conjuntos de cinco plantas de algumas cultivares: Mossoró, Quitéria, Chonan, Caçador, Amarante (este último infectado com vírus), com dez conjuntos de 20 indivíduos cada de plantas da cultivar Amarante comprovadamente livres de vírus, provenientes de termoterapia e multiplicação *in vitro* (Torres et al., 2000). DNA genômico total foi isolado de folhas jovens de acordo com Doyle & Doyle (1987). Para realização do estudo genético, utilizou-se uma mistura eqüitativa de DNA extraído de folhas jovens de cinco indivíduos de cada acesso das diferentes cultivares, e 20 indivíduos de cada conjunto da cultivar Amarante livre de vírus.

As reações de amplificação do DNA foram feitas por PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando um coquetel de reagentes contendo 3,0 µl de DNA genômico a 2,5 ng/µl; 4,92 µl de água milli-Q autoclavada; 1,30 µl de Tampão 10X para Taq DNA Polimerase; 1,04 µl de dNTP 2,5 mM; 1,04 µl de BSA 2,5 mM; 1,5 µl de Primer (Operon Technologies, USA) 10ng/µl e 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl), conforme descrito em Ferreira & Grattapaglia (1998). Cada reação foi realizada em um termociclador MJ, programado para 40 ciclos de: 1 min a 92°C, 1 min a 35°C, 2 min a 72°C. Os produtos das reações foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% usando tampão Tris-Borato-EDTA

(TBE). A seleção dos marcadores se baseou na repetibilidade, clareza e resolução das bandas. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com o marcador 1 Kb. Foram testados 568 primers randômicos (Operon Technologies, USA) e 62 foram selecionados por serem informativos, ou seja, polimórficos, reproduzíveis e de alta intensidade.

### **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 62 primers randômicos utilizados, somente 12 apresentaram polimorfismo entre todas as cultivares. Foram identificados 16 marcadores RAPD que só foram amplificados nas amostras da cultivar Amaranite, distinguindo-a das demais cultivares (Figura 1). Recentemente, marcadores moleculares têm sido utilizados para testar a fidelidade genética durante a micropropagação devido à importância crescente desta forma de propagação para algumas plantas cultivadas. Este tem sido o caso do alho, que tem necessidade de ser submetido à termoterapia e micropropagação para produção de alho-semente livre de vírus. Como várias cultivares são manipuladas ao mesmo tempo, existe o risco de mistura varietal após todo o procedimento. Em adição, no processo de erradicação de vírus, cada bulbilho é retirado de um bulbo de um estoque que vem sendo multiplicado em um banco de germoplasma já há várias décadas, com possibilidades de ter ocorrido alguma mistura durante esses ciclos de multiplicação. Nos dez grupos, com vinte indivíduos cada, da cultivar Amaranite produzida por micropropagação nenhuma diferença foi constatada entre o perfil das amostras livres de vírus e infectadas. Confirmou-se, portanto, que não houve

mistura varietal na manipulação do material analisado na fase de limpeza clonal e nem que o estoque inicial continha bulbilhos de outras cultivares. Além disso, os dezesseis marcadores RAPD mostraram-se adequados para a identificação da cultivar Amarante quando comparada às demais cultivares avaliadas, todas sendo manipuladas em laboratório de biologia celular da Embrapa Hortaliças no processo de erradicação de vírus. Mais análises serão necessárias para testar se os mesmos marcadores identificam a cultivar Amarante se comparada com outras cultivares que não foram incluídas neste estudo.

#### **4- CONCLUSÕES**

- Com o uso de marcadores RAPD, confirmou-se que não houve mistura varietal na manipulação do material analisado na fase de limpeza clonal e que o estoque inicial não continha bulbilhos de outras cultivares;
- Dezesseis marcadores RAPD mostraram-se adequados para a identificação da cultivar Amarante quando comparada às demais cultivares avaliadas, todas sendo manipuladas em laboratório de biologia celular da Embrapa Hortaliças no processo de erradicação de vírus.
- Foram utilizados 62 primers randômicos para obtenção de 16 marcadores RAPD específicos para a cultivar Amarante, quando comparada às cultivares avaliadas neste estudo.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

Pesquisa realizada com recursos do Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia – CBAB

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, v.12, p. 13-15, 1987.

EMATER. **Instruções técnicas para o cultivo de alho em Minas Gerais.** Belo Horizonte, 1995. 28p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. **Cultivo do alho (*Allium sativum*).** 2. ed. Brasília: Embrapa-CNPq, 1984. 16p. (Embrapa-CNPq. Instruções Técnicas, 2).

EVANS, I. J.; JAMES, A. M.; EBARNES, S. R. Organization and evolution of repeated DNA sequences in closely related plant genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 170, p. 803-826, 1983.

FAO. **Anuario de producción 4.** Roma, 1994. 141 p.

FAO. **FAOSTAT:** agricultural data. 2003. <<http://apps.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>> Acesso em: maio 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

IBGE. **Banco de dados agregados.** 2001. <[www.sidra.ibge.gov.br/bda.tabela.protabl.asp?z=p&o=11&i=P](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda.tabela.protabl.asp?z=p&o=11&i=P)> Acesso em: maio 2004.

LAMPASONA, S. G.; MARTINEZ, L. E.; BURBA, J. L. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). **Euphytica**, v. 132, p. 115-119, 2003.

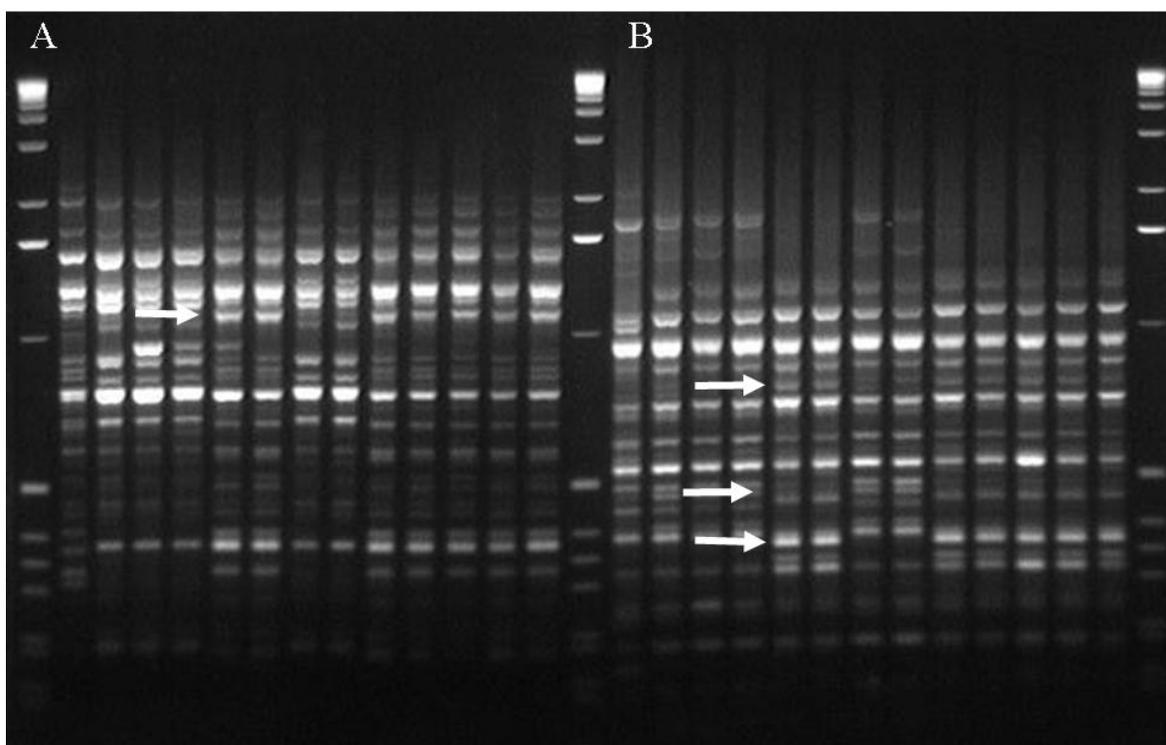
MENEZES SOBRINHO, J. A. **Cultivo do alho (*Allium sativum*).** 3. ed. Brasília: Embrapa-CNPq, 1997. 24p. (Embrapa-CNPq. Instruções Técnicas, 2).

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V. M.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. de O.; BUSO, J. A.

Shoottip culture and thermotherapy in recovering virus free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, v. 3, n. 18, p. 192-195, 2000.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 7213-7218, 1990.

## 7- ANEXO



**Figura 1.** Foto com dois géis (A e B) mostrando o "Fingerprint" molecular de cultivares de alho detectado através da técnica de RAPD. Da esquerda para a direita: marcador 1 Kb, Mossoró, Quitéria, Chonan, Caçador, Amarante, Amarante livre de vírus, Caçador livre de vírus, Chonan livre de vírus, Bulks 1, 2, 3, 4 e 5 de plantas da cultivar Amarante provenientes de termoterapia e cultura "in vitro". As setas indicam marcadores da cultivar Amarante.