

versão
ON LINE

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 81

ISSN 1678-2518
julho, 2009

Divergência genética entre acessos do banco ativo de germoplasma de cebola da Embrapa Clima Temperado revelada por marcadores RAPD



Embrapa

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1678-2518

Maio, 2009

versão
ON LINE

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 81

**Divergência genética entre
acessos do banco ativo de
germoplasma de cebola da
Embrapa Clima Temperado
revelada por marcadores
RAPD**

**Daniela Lopes Leite
Denilson Anthonisen
Rosa Lia Barbieri**

Pelotas, RS
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ariano Martins de Magalhães

Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: José Carlos Leite Reis, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Suplentes: Márcia Vizzotto e Beatriz Marti Emydio

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos
Editoração eletrônica: Oscar Castro
Arte da capa: Miguel Ângelo (estagiário)

1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

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

Leite, Daniela Lopes.

Divergência genética entre acessos do banco ativo de germoplasma de cebola da Embrapa Clima Temperado revelada por marcadores RAPD / Daniela Lopes Leite, Denilson Anthonisen, Rosa Lia Barbieri. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

17 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 81).

ISSN 1678-2518

Cebola – Allium cepa – Cultivar – Recurso genético. I. Anthonisen, Denilson. II. Barbieri, Rosa Lia. III. Título. IV. Série.

CDD 635.25

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	12
Conclusões	14
Referências	15

Divergência genética entre acessos do banco ativo de germoplasma de cebola da Embrapa Clima Temperado revelada por marcadores RAPD

Daniela Lopes Leite¹
Rosa Lia Barbieri²
Denilson Anthonisen³

Resumo

O banco ativo de germoplasma (BAG) de cebola da Embrapa Clima Temperado conta com 172 acessos, sendo composto por cultivares locais de cebola dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, e por cultivares comerciais. Neste BAG são realizados trabalhos de caracterização e avaliação dos acessos. Ao mesmo tempo ele serve de base para o programa de melhoramento genético de cebola. Os acessos vêm sendo sistematicamente caracterizados morfológicamente e molecularmente, através de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RAPD. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da análise de RAPD, a diversidade genética existente em um grupo de vinte e dois acessos do BAG, incluindo cultivares locais e comerciais. Nas

¹ Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS. (daniela@cpact.embrapa.br)

² Bióloga, Dra., Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78, Cx. Postal 403, 96001-970 Pelotas, RS. (barbieri@cpact.embrapa.br)

³ Químico, M.Sc., Analista da Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78, Cx. Postal 403, 96001-970 Pelotas, RS. (denilson@cpact.embrapa.br)

análises foram usados 10 *primers* dos kits da Operon Technologies, Alameda, CA, (OPA-1, OPA-10, OPA-19, OPC-10, OPC-11, OPC-14, OPI-1, OPI-2, OPY-19 e OPY-20). As cultivares foram genotipadas através de uma matriz de presença/ausência de bandas utilizada nas análises de similaridade genética e agrupamento. Os 10 *primers* geraram 152 (75,0 %) bandas polimórficas, sendo que o número de fragmentos por *primer* variou de 12 (OPY-19) até 18 (OPA-10; OPC-11; OPI-1) com uma média de 15 bandas por *primer*. Foi possível separar os genótipos em três grupos maiores, com uma similaridade média em torno de 77%.

Termos para indexação: *Allium cepa*, recursos genéticos, cultivares

Genetic Diversity Among Accessions of the Active Germplasm Bank of Onion of Embrapa Clima Temperado Revealed by RAPD Markers

Abstract

The active germplasm bank (BAG) of onion at Embrapa Clima Temperado possess 172 accessions and it is composed of onion landraces from Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, and by commercial cultivars. In this BAG are realized works of characterization and evaluation of the accessions and at the same time it serves as a bases for the onion genetic breeding program. The accessions are being systematically characterized morphologically and molecularly, through Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD. The purpose of this study was to evaluate, through the RAPD analysis the existing genetic diversity in a group of twenty-two accessions of the BAG, including local and commercial cultivars. In the analysis were used 10 primers of the kits of Operon Technologies, Alameda, CA, (OPA-1, OPA-10, OPA-19, OPC-10, OPC-11, OPC-14, OPI-1, OPI-2, OPY-19 and OPY-20). The cultivars were genotyped through a matrix of presence/absence of bands, which was utilized in the analyses of genetic similarity and grouping. The 10 primers generated 152 (75,0 %) polymorphic bands, and the number of fragments per primer were from 12 (OPY-19) to 18 (OPA-10; OPC-11; OPI-1) with a mean of 15 bands per primer. It was possible to separate the

genotypes in three big groups with a mean similarity around 77%.

Index terms: *Allium cepa, genetic resources, cultivars*

Introdução

A cebola tem sido cultivada por mais de 5000 anos e acredita-se que tenha sido domesticada nas regiões montanhosas do Turcomenistão, Uzbequistão, Tadjiquistão e Norte do Irã, Afeganistão e Paquistão, não existindo mais como espécie silvestre. Durante sua domesticação, devem ter ocorrido seleções para um desenvolvimento mais rápido, tornando-a bianual e também para produção de bulbos de um tamanho maior. A cebola pertence à família Aliaceae e é classificada botanicamente como *Allium cepa* L. (HANELT, 1990).

No mundo, a cebola está posicionada entre as hortaliças mais importantes. A produção mundial em 2007, foi estimada em 64,47 milhões de toneladas, cultivadas em uma área de 3,45 milhões de hectares, o que proporcionou uma produtividade média de 18,68 ton/ha (FAO, 2008).

O Brasil está entre os dez maiores produtores de cebola do mundo. Em 2008, a previsão de área média de plantio dessa cultura é de 63.481 ha, com produção de 1.292.548 toneladas (IBGE, 2008).

No Brasil a cebola foi introduzida por imigrantes açorianos que colonizaram as regiões de Rio Grande e Pelotas no século XVIII (FONTOURA, 1994). As variedades introduzidas por estes colonizadores foram expostas à seleção natural e humana e constituem-se até hoje num valioso germoplasma o qual vem sendo utilizado por praticamente, todos os programas de melhoramento de cebola no Brasil, tanto de instituições públicas de pesquisa como da iniciativa privada (LISBÃO, 1993).

A Embrapa Clima Temperado conta com um banco ativo de germoplasma de cebola (BAG) que possui 172 acessos, sendo composto por cultivares locais de cebola dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e por cultivares comerciais, onde os acessos são mantidos a médio prazo. Este BAG realiza trabalhos de caracterização e avaliação dos acessos e ao mesmo tempo serve de base para o programa de melhoramento genético de cebola. A Embrapa Clima Temperado lançou três cultivares (Aurora, Primavera e BRS Cascata) desenvolvidas a partir de seleção massal de populações locais conservadas no BAG (BARBIERI et al., 2005; WETZEL et al., 2005).

À longo prazo, a conservação de cebola é realizada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, que armazena coleções de sementes de acessos de várias espécies, constituindo-se na Coleção de Base de Germoplasma Semente – COLBASE. A coleção de germoplasma de sementes de cebola da COLBASE possui 310 acessos. (WETZEL et al., 2005).

Os acessos do BAG de cebola da Embrapa Clima Temperado vem sendo sistematicamente caracterizados morfológicamente utilizando-se dos descritores do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004) e por meio de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares que vêm sendo usados na caracterização dos acessos são os de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RAPD (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O emprego da análise de RAPD em estudos genéticos de cebola e outras espécies de *Allium*, mostrou-se eficiente no trabalho realizado por Wilkie et al. (1993), na investigação do grau de polimorfismo entre sete cultivares de cebola e outras quatro espécies de *Allium*.

Os estudos de diversidade genética baseados em técnicas de análise de RAPD, têm oferecido bons resultados, em função do número ilimitado de marcadores que utilizam (KLAAS e

FRIESEN, 2002).

Buzar (2005) empregou a técnica de RAPD na estimativa da variabilidade genética de uma coleção de 24 cultivares elite de cebola, representativa de uma fração significativa dos genótipos adaptados para cultivo no Brasil. O estudo comprovou a alta diversidade entre as cultivares com a aplicação de dois *primers*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, através da técnica de RAPD, a diversidade genética entre vinte e dois acessos do banco ativo de germoplasma de cebola da Embrapa Clima Temperado.

Material e Métodos

Foram analisados 22 acessos integrantes do banco ativo de germoplasma de cebola da Embrapa Clima Temperado, incluindo cultivares locais (Baia Periforme 1, Baia Periforme 2, Baia Periforme 3, Baia Periforme 4, Baia Periforme 5, Baia Periforme 6, Baia Periforme 7, Baia Periforme Precoce1, Baia Periforme Precoce 2, Crioula 1, Crioula 2, Crioula 3, Crioula 8, Crioula SC, Crioula Roxa, Roxa SC1, Roxa SC2, Roxa SC3) e comerciais (Alfa Tropical, Aurora, Primavera, Petrolina). Os procedimentos usados na extração de DNA, a partir de amostras foliares, e sua amplificação pelo método de RAPD foram os descritos por Ferreira e Grattapaglia (1998) com algumas modificações: cada mistura de reação foi composta por tampão (1X), MgCl₂ (2mM), dNTPs (0,25mM), BSA purificada (0,2µg), *primer* (0,4 µM), taq polimerase (1U) e DNA genômico (20ng). As amplificações foram realizadas em tubos tipo eppendorf em um termociclador (RoboCycler 96 Temperature Cycler - Stratagene) programado para 40 ciclos repetidos nas seguintes condições: 1 minuto a 92°C (desnaturação), um minuto a 35°C (anelamento) e dois minutos a 72°C (extensão). Após, foi efetuado um passo final de extensão de cinco minutos a 72°C.

Foram usados 10 *primers* dos kits da Operon Technologies, Alameda, CA, (OPA-1, OPA-10, OPA-19, OPC-10, OPC-11, OPC-14, OPI-1, OPI-2, OPY-19 e OPY-20). Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel submerso de agarose a 1,2%, onde migraram sob diferença de potencial de 80 V por um período médio de três horas e trinta minutos. Foram corados com brometo de etídeo (5 µL de uma solução 10 mg.mL⁻¹ para cada gel de 100 mL), e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm).

Os acessos foram genotipados através dos produtos visualizados em gel e uma matriz de presença/ausência de bandas foi utilizada nas análises de similaridade genética e agrupamento. Estas foram efetuadas através do programa NTSYS, versão 2.0 (ROHLF, 1992), utilizando o coeficiente de Jaccard e o método da média aritmética não ponderada.

Resultados e Discussão

Os 10 *primers* geraram 152 (75,0 %) bandas polimórficas. O *primer* OPC-10 gerou 100% de bandas polimórficas enquanto que o *primer* OPY-20 foi o que gerou menor porcentagem de polimorfismo (53%). O número de fragmentos por *primer* variou de 12 (OPY-19) até 18 (OPA-10; OPC-11; OPI-1) com uma média de 15 bandas por *primer*.

Em um trabalho semelhante, de caracterização de diversidade genética através da técnica de RAPD, em genótipos de *Allium*, no caso chalota (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) e cebola Wakegi (*A. x wakegi*), realizado por Arifin et al. (2000), com a utilização de dezesseis *primers*, observou-se 112 bandas polimórficas, com um número de bandas polimórficas por *primer* que variou de 1 a 14. Através de análise de agrupamento entre os acessos formaram-se dois grandes grupos, cada um representando uma das duas espécies estudadas.

A análise de agrupamento permitiu a separação dos genótipos

em três grupos maiores, com uma similaridade média em torno de 77% (Figura 1). O primeiro grupo é composto pelas cultivares Aurora e Primavera (**Figura 1**). A presença de 'Aurora' (GARCIA, 1988) e 'Primavera' (GARCIA, 1992) no mesmo grupo é explicada, pois as duas cultivares foram obtidas através de seleção massal de uma mesma população de origem, população regional do sul do Rio Grande do Sul, do tipo Baia Periforme com variabilidade genética para precocidade.

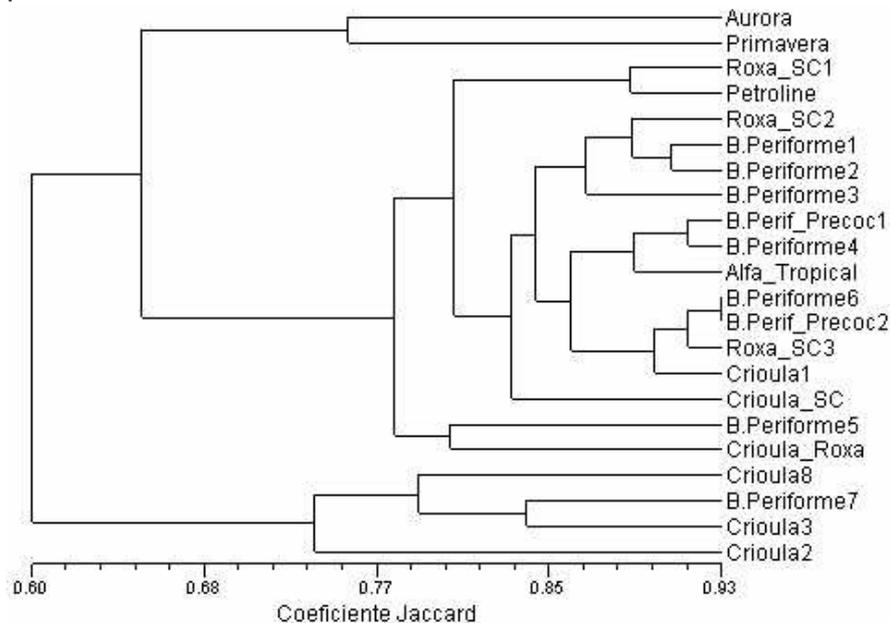


Figura 1. Análise de similaridade genética e de agrupamento (Coeficiente de Jaccard) e de agrupamento (UPGMA) de 22 acessos de cebola. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2005.

O segundo grupo está composto pelas cultivares Alfa Tropical (um acesso), Baia Periforme (seis acessos), Baia Periforme Precoce (dois acessos), Crioula (dois acessos), Crioula Roxa (um acesso), Petroline (um acesso) e Roxa SC (três acessos) (Figura 1). A maioria dos acessos de Baia Periforme ficaram

neste grupo. Todos os acessos de Baia Periforme estudados são de produtores do município de Rio Grande. Baia Periforme é um germoplasma descendente da cultivar portuguesa Garrafal, a qual foi introduzida pelos colonizadores portugueses da Ilha dos Açores na região Sul do Brasil no século XVIII (BARBIERI et al., 2002). Constitui-se em uma população base da maioria dos programas de melhoramento genético de todo o Brasil (GOMES e MALUF, 1995). Melo e Boiteux (2001) listaram aproximadamente 50 cultivares de cebola obtidas no Brasil, por instituições públicas e privadas, a partir de Baia Periforme, no período de 1938 a 2000.

O terceiro grupo é composto por três acessos de Crioula e um de Baia Periforme (Figura 1). Destaca-se que todos os três acessos de Crioula deste grupo são do Estado de Santa Catarina, sendo dois do município de Alfredo Wagner e um de Lages.

Os resultados alcançados de genótipos de Baia Periforme e Crioula em um mesmo grupo explicam-se, pois a população Crioula, originada no Estado de Santa Catarina, possivelmente tem germoplasma de Baia Periforme em sua origem. Provavelmente, ela seja o resultado do cruzamento entre populações do tipo Baia Periforme e Pêra Norte, seguido de seleção realizada pelos produtores locais (BARBIERI e MEDEIROS, 2007). A população Crioula está representada no trabalho por várias cultivares locais com os seguintes nomes: Crioula, Crioula Santa Catarina (SC), Crioula Roxa, Roxa SC .

Conclusões

Os acessos estudados apresentam variabilidade genética revelada pela técnica de RAPD, que mostrou eficiência tanto na diferenciação como no agrupamento dos mesmos. O germoplasma estudado representa, na maioria, cultivares locais que são mantidas por produtores dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. É importante que este germoplasma

continue sendo preservado e disponibilizado aos programas de melhoramento genético, na busca de cultivares cada vez mais competitivas no mercado.

Referências

ARIFIN, N. S.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Genetic diversity in Indonesian shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) and *Allium x wakegi* revealed by RAPD markers and origin of *A. x wakegi* identified by RFLP analyses of amplified chloroplast genes. **Euphytica**, Wageningen, v. 111, p. 23-31, 2000.

BARBIERI, R.L.; CASTRO, C.M.; MITTELMANN, A.; MAGALHÃES JR. A. M.; PEREIRA, A da S.; LEITE, D.; CHOER, E.; ANTUNES, I.; CASTRO, L.A. S. de; RASEIRA, M do C. B.; MARIOT, M.P.; FAGUNDES, P.R.R.; SILVA, S.D. dos A.; TREPTOW, R. **Conservação 'ex situ' de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 27 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 143).

BARBIERI, R.L.; LEITE, D.L.; CASTRO, C.M.; CHOER, E.; PEREIRA, A.P. Collecting southern Brazil onion genetic resources for use and conservation. In: NATIONAL ALLIUM RESEARCH CONFERENCE, 2002, Pasco. **Abstracts...** Pasco: Washington State University, 2002. p. 55.

BARBIERI, R.L.; MEDEIROS, A.R.M. A cebola ao longo da história. In: BARBIERI, R.L. (org.), **Cebola: ciência, arte e história**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 13-20.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Ato N. 4, de 5 de março de 2004. **Tabela de descritores de cebola**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/

PUBLICACOES_DOU_2004/
PUBLICACOES_DOU_MARCO_2004/DO1_09.03%5B1%5D >.
Acesso em: 19 jun. 2006.

BUZAR, A.G.R. **Diversidade genética e identificação de citoplasma macho-estéril em germoplasma de cebola.** 2005 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Brasília.

FAO. **The statistics division, 2008.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>.
Acesso em: 14 out. 2008.

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

FONTOURA, L.F.M. **As relações de produção e a produção do espaço agrário em São José do Norte.** 1994. 126 f. Dissertação (Mestrado em Sociologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GARCIA, A. **Aurora:** uma nova cultivar de cebola. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1988. 2 p. (EMBRAPA-CNPFT. Comunicado Técnico, 61).

GARCIA, A. Cultivar Primavera: cebola para colheita em épocas de melhores preços. **Hortisul**, Pelotas, v. 2, n. 3, p. 32-37, 1992.

GOMES, L.A.A.; MALUF, W.R. Avaliação de híbridos intervarietais de cebola (*Allium cepa* L.) 'Pira Ouro' x 'Pirana Precoce no sistema de bulbinhos. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, p. 233-240, 1995.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro, 2008. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf>>. Acesso em: 13 out. 2008.

KLAAS, M.; FRIESEN, N. Molecular markers in Allium. In: RABINOWITCH, H.D.; CURRAH, L., (Ed.). **Allium crop science: recent advances**. Wallingford, Oxon : CABI Publishing, 2002. p.159-185.

LISBÃO, R.S. Cebola. In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1993. 524 p.

MELO, P.C.T.; BOITEUX, L.S. 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., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2001. 1 CD-ROM.

ROHLF, F.J. **NTSYS – pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Exeter Software. New York. 1992. 270 p.

WETZEL, M.M.V. da S.; SILVA, D.B. da; NETO, L.G.P. Conservação de germoplasma semente de cebola (*Allium cepa* L.) a longo prazo no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 1, Pelotas. **Resumos e Palestras**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 135). p. 291-294.

WILKIE, SE; ISAAC, PG; SLATER, RJ. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Allium. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, p. 497-504, 1993.



Ministério de
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

