

Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites

Carlos Antonio Fernandes Santos⁽¹⁾, Valter Rodrigues Oliveira⁽²⁾, Marciene Amorim Rodrigues⁽¹⁾ e Hugo Leonardo Coelho Ribeiro⁽¹⁾

⁽¹⁾Embrapa Semiárido, Rodovia BR 428, Km 152, Zona Rural, Caixa Postal 23, CEP 56302-970 Petrolina, PE. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br, marciene.rodrigues@cpatsa.embrapa.br, leonardokoelho@cpatsa.embrapa.br ⁽²⁾Embrapa Hortaliças, Rodovia Brasília-Anápolis BR 060, Km 09, Caixa Postal 218, CEP 70359-970 Brasília, DF. E-mail: valter@cnph.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi estabelecer padrões alélicos e estimar as distâncias genéticas baseadas em marcador SSR de 44 cultivares de cebola adaptadas às condições de cultivo tropicais e subtropicais do Brasil. Para visualização da similaridade genética, utilizou-se o dendrograma UPGMA gerado da matriz de distâncias do coeficiente de Jaccard, com base em 40 alelos de 13 locos SSR. O DNA total foi extraído pelo método CTAB 2x, e os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com nitrato de prata. O número de pares de bases foi estimado pelo método da mobilidade inversa, com base em regressão de produtos de tamanho conhecido. A média da heterozigosidade dos locos SSR foi 0,58. Os 40 alelos dos 13 locos SSR foram suficientes para distinguir as 44 cultivares de cebola. O maior número de alelos em comum foi observado entre as cultivares Yellow Granex e Henry's Special PRR e o menor, entre as cultivares Baia Periforme Super Precoce e Excel. Os sete grupos principais de cultivares identificados no dendrograma apresentaram concordância com a genealogia conhecida e o tipo agrônomo das cultivares avaliadas. Os locos SSR selecionados são adequados para melhoramento e proteção de cultivares da espécie.

Termos para indexação: *Allium cepa*, dendrograma, similaridade, SSR.

Molecular characterization of onion cultivars using microsatellite markers

Abstract – The objective of this work was to establish allelic patterns and to estimate genetic distances based on the SSR marker in 44 onion cultivars adapted to Brazil's tropical and subtropical growing conditions. An UPGMA dendrogram generated from the distance matrix of the Jaccard's coefficient, based on 40 alleles of 13 SSR loci, was used for visualizing genetic similarities. Total DNA was extracted according to the CTAB 2x protocol, and the PCR products were analyzed in 6% denaturing polyacrylamide gels and stained with silver nitrate. The number of base pairs was estimated by the inverse mobility method, based on regression of products of known size. The heterozygosity mean was 0.58 for all SSR loci. The 40 alleles of the 13 SSR loci were enough to distinguish all 44 onion cultivars. The highest number of common alleles was observed between Yellow Granex and Henry's Special PRR cultivars, and the lowest was observed between the Baia Periforme Super Precoce and Excel cultivars. The seven main groups of onion cultivars identified in the dendrogram were in agreement with the known genetic genealogy and with the agronomic type of the analyzed cultivars. The selected SSR loci are adequate for breeding programs and for protection of the cultivars of the species.

Index terms: *Allium cepa*, dendrogram, similarity, SSR.

Introdução

Microssatélite, ou “simple sequence repeat” (SSR), é um marcador amplamente aplicado em estudos genéticos, inclusive em conservação genética, caracterização de cultivares, melhoramento molecular e testes de paternidade. Essa ampla aplicação deve-se ao fato de que os SSR são codominantes e multialélicos, altamente reprodutíveis, têm ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Oliveira et al., 2006). SSR podem ser usados,

ainda, para diferenciar indivíduos geneticamente próximos e gerar bancos de dados de referência e apoio na proteção de cultivares, como em soja (Priolli et al., 2002), em aspargo (Caruso et al., 2008) e em videira (Schuck et al., 2009).

Em razão do alto custo, além do trabalho necessário ao seu desenvolvimento, os SSR têm sido identificados para um número limitado de espécies de importância econômica, como soja, arroz, trigo, cana-de-açúcar e milho, e a quantidade de iniciadores SSR disponíveis para essas espécies é bastante variável (Kuleung

et al., 2004). Segundo os autores, a possibilidade de transferência de SSR entre espécies próximas tem sido avaliada como uma forma de aplicar esses marcadores para espécies que ainda não dispõem deles.

Para *Allium cepa*, o número de SSR disponíveis na literatura é bastante limitado, e alguns têm aplicação complexa (Jakse et al., 2005). Para esses autores, o desenvolvimento de marcadores moleculares em cebola é dificultado pelo enorme genoma, 36 vezes maior que o do arroz, e pelo alto nível de heterozigosidade (frequência de heterozigotos), com baixo nível de diversidade alélica entre cultivares da espécie. Até o momento, apenas 67 SSR foram publicados para cebola: 30 por Fischer & Bachmann (2000) e 37 por Jakse et al. (2005). Para *Allium fistulosum*, Tsukazaki et al. (2007) reportaram quase 1.800 clones de SSR e os iniciadores de 100 desses clones.

A aplicação de SSR para estudos de diversidade genética ou de apoio à proteção de cultivares de cebola foi reportada por Fischer & Bachmann (2000), Jakse et al. (2005) e Mahajan et al. (2009). Até o momento não foram relatados a análise alélica e estudos de diversidade genética das cultivares de cebola de interesse para as regiões brasileiras produtoras dessa hortaliça.

A cebola, originária das regiões de clima temperado, que compreendem o Afeganistão, o Irã e partes do sul da antiga União Soviética, tem sido cultivada por mais de 5.000 anos e, provavelmente, não existe mais em estado selvagem (Fritsch & Friesen, 2002). Os europeus trouxeram a cebola para as Américas logo no início do descobrimento e, no século XIX, a introduziram no leste da Ásia (Goldman et al., 2000). No Brasil, a cultura da cebola teve início no século XVIII, nos municípios de Mostardas, Rio Grande e São José do Norte, no Rio Grande do Sul, introduzida pelos açorianos, sendo hoje uma das mais importantes hortaliças do país (Barbieri & Medeiros, 2005).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer padrões alélicos e estimar as distâncias genéticas baseadas em marcador SSR para 44 cultivares de cebola adaptadas às condições de cultivo tropicais e subtropicais do Brasil, de forma a gerar um banco de dados de referência de apoio à proteção de cultivares e a programas de melhoramento da espécie para o país.

Material e Métodos

As 44 cultivares de cebola, escolhidas para o presente trabalho (Tabela 1), são parte da coleção do programa

de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças e Embrapa Semiárido. Além de serem adaptadas às condições de cultivo tropicais e subtropicais do Brasil, elas têm qualidades agrônomicas desejáveis para o melhoramento.

O DNA total foi extraído de amostras foliares de cinco plantas coletadas 30 dias após a semeadura em Petrolina, PE, para constituir uma amostra de cada cultivar. O protocolo para extração do DNA foi o CTAB 2x (Doyle & Doyle, 1990), modificado para 7.500 g e 16.500 g na primeira e segunda centrifugação, respectivamente; betamercaptoetanol a 2% e incubação a 60°C durante 30 min para todas as amostras. Após a adição do tampão Tris-EDTA, a solução de DNA foi tratada com RNase para remover RNAs coisolados. A quantidade e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose a 0,8%, seguido da diluição do DNA genômico para 50 ng μL^{-1} .

Todos os 30 locos SSR publicados por Fischer & Bachmann (2000) foram avaliados. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 μL , que continha 30 ng de DNA genômico, 1X de tampão para TaqDNA Polimerase, 2 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 0,22 mmol L^{-1} de cada dNTP, 0,53 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada iniciador, 0,4 unidades da enzima TaqDNA Polimerase. O programa de PCR utilizado foi descrito por Fischer & Bachmann (2000). Foram avaliados 20 locos SSR publicados por Jakse et al. (2005): ACM004, ACM006, ACM024, ACM045, ACM068, ACM071, ACM078, ACM082, ACM091, ACM101, ACM102, ACM119, ACM124, ACM132, ACM133, ACM134, ACM138, ACM152, ACM169 e ACM187. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 15 μL , que continha 30 ng de DNA genômico, 1X de tampão para TaqDNA Polimerase, 2 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 0,2 mmol L^{-1} de cada dNTP, 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada iniciador, 0,4 unidades da enzima TaqDNA Polimerase. O programa de PCR foi descrito por Jakse et al. (2005). Os dois conjuntos de locos SSR foram inicialmente avaliados em uma amostra de seis cultivares de cebola, para seleção daqueles que apresentavam polimorfismo de boa interpretação.

Todas as reações de PCR foram aquecidas durante 3 min a 94°C na presença de formamida e imediatamente colocadas sob gelo antes da aplicação nos géis de poli(acrilamida) 6%. A eletroforese foi realizada em gel tipo sanduíche de 35x45 cm, à potência constante de 40 W, por 2,5 a 3 horas para todos os géis. Foram

Tabela 1. Padrão alélico em pares de bases estimado para 44 cultivares de cebola, de diferentes tipos agrônômicos (TA) e adaptadas às condições de cultivo tropicais e subtropicais do Brasil, genotipadas com 13 marcadores SSR.

Cultivares	TA ⁽¹⁾	Locos AMS			Locos ACM									
		03	08	13	04	06	24	71	82	91	102	119	124	133
Alfa Tropical	Ba	-	416/424	202/208	558/586	553/590	284/298	296/316	471/471	455/455	314/351	648/648	591/591	504/504
Aurora	Ba	460/465	493/503	202/208	586/624	567/590	284/298	296/316	455/455	455/487	314/351	648/648	591/521	504/548
Baia Periforme Super Precoce	Ba	465/465	416/416	202/208	586/624	590/590	298/298	316/316	455/455	455/455	351/351	648/648	626/626	484/504
Beta Cristal	SI	460/460	416/424	Nulo	586/586	553/590	284/298	316/316	471/494	487/487	314/314	607/648	626/521	504/548
Bola Precoce	Ba	465/465	416/424	202/208	558/586	590/590	284/284	296/316	455/471	487/487	314/314	648/648	591/591	504/579
BRS Alfa São Francisco	Ba	460/460	416/424	202/208	558/586	553/590	284/298	316/316	455/471	455/487	314/351	607/648	591/521	504/504
BRS Cascata	Pe	465/465	416/416	202/208	586/586	590/590	284/298	296/296	455/455	455/487	371/371	648/648	591/591	504/504
CNPH 6400	SI	460/465	416/424	202/208	558/586	590/590	284/298	296/316	455/471	455/487	314/371	607/648	591/626	548/548
Conquista	Ba	460/465	416/424	202/208	586/586	567/590	275/284	296/316	455/471	455/487	314/351	648/648	591/591	504/579
Crioula Alto Vale	Cr	460/460	416/424	208/208	586/586	567/590	284/298	296/316	455/455	455/487	351/371	607/648	591/626	504/504
Crioula Mercosul	Cr	460/465	416/424	208/208	586/624	590/622	284/298	296/316	455/471	487/487	314/351	648/648	591/521	504/548
Excel	SI	460/460	416/424	Nulo	586/586	590/590	284/298	296/296	471/471	487/487	314/314	607/607	591/591	504/504
Henry's Special PRR	Gx	460/460	416/424	202/208	586/586	567/590	284/284	316/316	471/471	455/487	314/371	607/648	591/591	484/548
IPA 10	Ba	460/465	416/416	208/208	558/586	553/590	284/298	316/316	455/455	455/487	314/351	607/648	626/626	548/563
IPA 11	Ba	465/465	416/416	Nulo	586/586	567/590	275/284	296/316	455/455	487/487	314/351	607/648	591/626	504/548
IPA 12	Ba	460/465	416/416	202/208	586/586	553/567	275/284	296/316	455/471	455/455	314/314	607/648	591/626	484/548
IPA 2	Ba	460/460	416/424	202/208	586/586	553/590	284/298	296/316	455/471	455/487	314/351	607/648	591/626	484/548
IPA 3	Ba	460/460	416/424	208/208	586/624	553/590	284/298	316/316	455/455	487/487	314/314	648/648	591/521	504/548
IPA 4	Ba	460/465	416/424	202/208	586/624	553/590	284/298	296/316	455/455	455/487	314/351	607/648	591/521	504/579
IPA 6	Ba	465/465	-	202/208	586/586	567/622	275/284	316/316	455/455	455/455	314/314	648/648	591/626	504/548
IPA 7	Pe	465/465	416/424	202/208	586/586	567/590	284/298	316/316	455/455	455/487	314/351	607/648	591/626	504/579
IPA 8	SI	460/465	493/503	202/208	586/624	590/590	284/298	316/316	471/471	455/487	314/351	607/607	591/521	498/548
IPA 9	Ba	465/465	416/416	Nulo	558/586	590/590	275/284	296/296	455/455	455/487	314/314	648/648	591/626	504/504
Jubileu	Pe	465/465	416/424	208/208	586/624	567/567	284/284	296/316	455/455	487/487	314/351	648/648	591/591	504/563
Madrugada	Ba	465/465	416/416	202/208	586/586	567/590	284/298	296/316	455/455	455/487	351/351	648/648	591/626	504/548
Mayon	SI	465/465	416/424	Nulo	624/624	590/590	275/284	296/316	455/455	487/487	314/371	607/648	591/626	504/504
Mercedes	Gx	460/460	416/424	208/208	558/586	567/567	284/298	296/316	471/471	455/487	314/314	607/648	591/591	484/548
Norte 14	Pe	460/460	416/416	208/208	586/586	567/590	284/298	296/316	455/471	487/487	314/351	607/648	591/626	484/548
Optima F1	Gl	460/465	416/424	Nulo	586/624	590/590	284/298	296/316	455/471	487/487	351/371	607/648	591/521	504/548
Perfecta F1	Gl	460/465	416/424	Nulo	558/586	567/590	284/298	296/316	455/455	487/487	314/371	607/648	591/626	504/548
Petrolina	Ba	465/465	416/416	202/208	558/586	590/590	275/284	316/316	455/455	455/487	314/314	648/648	591/521	504/504
PiraOuro	Ba	465/465	416/424	202/208	586/624	567/590	298/298	296/316	455/455	455/487	351/371	648/648	591/521	504/548
Primavera	Ba	460/465	416/424	202/208	586/624	590/590	284/298	296/296	471/471	487/487	314/314	607/648	591/591	548/548
Red Creole	SI	460/460	416/424	Nulo	586/624	590/590	284/298	296/316	455/455	455/487	314/314	607/607	591/626	504/548
Régia	Gl	460/460	416/424	Nulo	558/586	567/590	284/298	316/316	455/455	487/487	314/314	648/648	591/591	504/504
Rijnsburger Jumbo	SI	460/460	493/503	202/208	558/586	590/622	284/298	316/316	455/471	487/487	314/314	607/648	626/521	548/563
Roxa 13	Gr	460/460	416/424	Nulo	586/624	590/622	284/298	296/316	471/471	455/487	314/371	607/648	591/591	504/504
Roxa do Barreiro	SI	460/460	416/424	208/208	586/586	567/590	275/284	316/316	455/471	487/487	314/314	648/648	591/521	533/579
São Paulo	Gr	460/465	416/424	208/208	586/624	553/590	284/298	296/316	455/494	455/487	314/351	607/648	591/626	548/579
Serrana	Ba	460/465	416/424	202/208	586/624	567/590	284/298	296/316	455/471	455/487	351/351	607/648	591/591	504/548
TEG 502	Gr	465/465	416/416	202/208	586/586	590/590	275/284	296/316	455/471	455/487	314/351	607/648	591/591	548/579
TEG 502 PRR	Gr	460/465	416/416	202/208	586/624	567/590	275/284	316/316	471/471	455/487	314/314	607/648	591/591	484/504
White Creole	SI	460/460	-	Nulo	586/586	590/622	284/298	316/316	494/494	455/487	314/314	607/607	591/521	548/548
Yellow Granex	Gx	460/460	416/424	202/208	586/586	567/590	284/284	316/316	471/471	455/487	314/371	607/648	591/591	504/504
Heterozigosidade	-	0,33	0,74	0,48	0,59	0,66	0,86	0,55	0,34	0,57	0,55	0,55	0,61	0,66

⁽¹⁾SI, sem informação; Ba, Baia periforme; Pe, Pêra; Cr, Crioula; Gx, Granex; Gl, Gladalan; Gr, Grano.

aplicadas todas as 44 reações das diferentes cultivares a cada gel, com mais um poço para o marcador molecular de 50 pb da Fermentas (EUA). Os géis foram corados com nitrato de prata conforme Creste et al. (2001), e as reações foram conduzidas no laboratório de genética da Embrapa Semiárido.

Apenas locos SSR que apresentavam uma nítida separação entre as bandas (alelos), nos géis de poliacrilamida, na amostra das seis cultivares, foram considerados para genotipagem das 44 cultivares de cebola. A estimativa do tamanho em pares de bases (pb) para cada alelo, para a construção do padrão alélico de cada cultivar de cebola, foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50 pb da Fermentas (EUA), aplicado em um poço extra do gel de poliacrilamida. Os SSR foram anotados para presença (1) versus ausência (0) de alelos, para construir uma matriz de similaridade do índice de Jaccard. Alelos nulos foram considerados como alelos adicionais, com a anotação de 1 para presença e 0 para ausência do alelo nulo.

A heterozigosidade foi estimada como descrito por Weir (1996). O dendrograma com as distâncias das cultivares foi confeccionado pelo método de agrupamento UPGMA (método de agrupamento não ponderado com base na média aritmética), disponível no programa NTSYS (Rohlf, 1989). A avaliação do ajuste do fenograma foi realizada pela correlação cofenética, ou seja, a correlação entre as distâncias reais e as representadas graficamente.

Resultados e Discussão

Foram obtidas amplificações polimórficas de fácil interpretação em apenas três dos 30 locos SSR desenvolvidos por Fischer & Bachmann (2000), AMS03, AMS08 e AMS13, na temperatura de anelamento de 60°C. Para Jakse et al. (2005), a relativa complexidade das condições para as reações de PCR tornam os SSR de Fischer & Bachmann (2000) de difícil uso para genotipagem de cebola, como observado neste trabalho.

Dos 20 SSR publicados por Jakse et al. (2005), foram obtidas amplificações polimórficas de fácil interpretação em dez deles (50%). Os SSR que apresentaram amplificações polimórficas foram ACM004, ACM006, ACM024, ACM071, ACM082,

ACM091, ACM102, ACM119, ACM124 e ACM133. A temperatura de anelamento no protocolo PCR para os SSR ACM006 e ACM024 foi de 62°C, enquanto, para os demais locos SSR de Jakse et al. (2005), essa temperatura foi de 58°C.

Foram detectados 40 alelos nos 13 SSR polimórficos, em que o número de alelos por loco variou de dois a sete, com média de três alelos por SSR nas 44 cultivares de cebola genotipadas. O tamanho dos alelos variou de 202 pb no SSR AMS13 a 648 pb no SSR ACM119. A presença de alelo nulo foi observada apenas no SSR AMS13 (Tabela 1). A ocorrência de alelos nulos pode decorrer principalmente da falta da sequência para anelamento do iniciador em razão das mutações pontuais, e esses alelos nulos podem dificultar as interpretações das análises de parentesco (Dakin & Avise, 2004).

Os 40 alelos dos 13 locos SSR foram suficientes para separar todas as 44 cultivares de cebola, nas quais o maior número de alelos em comum foi observado entre as cultivares Yellow Granex e Henry's Special PRR e o menor número foi observado entre as cultivares Baia Periforme Super Precoce e Excel. 'BRS Alfa São Francisco' pode ser diferenciada de 'Alfa Tropical' – cultivar que deu origem a ela – por alelos dos locos ACM071, ACM082 e ACM091. Da mesma forma, as demais cultivares também puderam ser distinguidas umas das outras, o que indica que os 13 locos SSR avaliados neste trabalho podem fornecer informações adicionais para a proteção de cultivares de cebola no Brasil (Tabela 1). Priolli et al. (2002) determinaram a diferenciação de 184 entre 186 cultivares de soja com a aplicação de apenas 12 marcadores SSR. Para os autores, os marcadores SSR podem ser uma alternativa para identificar cultivares de soja a serem protegidas pelas leis de proteção de cultivares.

A média da heterozigosidade dos 13 locos SSR foi 0,58, e os locos ACM024 e AMS08 apresentaram as maiores frequências de heterozigotos (Tabela 1). A frequência de heterozigotos representa a existência de variabilidade, pois cada indivíduo diploide, como é o caso da cebola, pode ter até dois alelos por loco (Weir, 1996), em que a variabilidade é maior com a maior frequência de heterozigotos.

Em algumas situações, os marcadores moleculares tipo SSR podem apresentar informações adicionais quando descritores morfológicos são insuficientes para distinguir cultivares de uma espécie que apresenta base

genética estreita (Priolli et al., 2002). Nas situações em que não for possível distinguir cultivares de cebola com um dado conjunto de marcadores preestabelecidos, Jakse et al. (2005) sugerem que marcadores adicionais sejam utilizados para revelar polimorfismos. Iniciadores adicionais, além dos testados neste trabalho, podem ser obtidos em Jakse et al. (2005).

A correlação entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz das distâncias de similaridade foi 0,7, o que indica que o dendrograma produzido (Figura 1) apresenta algumas inconsistências nos agrupamentos das 44 cultivares obtidos com os 40 alelos dos 13 locos de SSR. Essa baixa correlação cofenética pode ter sido provocada pela presença de empates na matriz de similaridade.

As cultivares apresentaram coeficiente de similaridade entre 40 e 86%, o que reflete a alta variabilidade genética da coleção de germoplasma de cebola estudada (Figura 1). Similaridade superior a 39% também foi encontrada por Santos et al. (2008) ao avaliar 41 das 44 cultivares de cebola deste trabalho, com marcador AFLP.

A cultivar Baia Periforme Super Precoce apresentou a maior dissimilaridade em relação ao conjunto das cultivares avaliadas, enquanto a maior similaridade foi observada entre 'Yellow Granex' e 'Henry's Special PRR'. 'Rijnsburger Jumbo' e 'IPA 8', introduzidas da Holanda e África, respectivamente, situaram-se em um extremo do dendrograma e, curiosamente, com boa aproximação com 'IPA 10' (Figura 1). A posição da 'IPA 10' entre essas duas cultivares introduzidas pode ser resultado de alguma contaminação cruzada na produção de sementes de 'IPA 8' e 'IPA 10'.

Com o corte no dendrograma em torno de 0,45 de similaridade, obteve-se a formação de três grupos de cultivares de cebola (Figura 1): grupo 1, de Rijnsburger Jumbo até White Creole; grupo 2, de PiraOuro até Roxa do Barreiro; e grupo 3, com IPA 6, IPA 9 e Petrolina. Baia Periforme Super Precoce situou-se fora desses três grupos, tendo sido a mais dissimilar. O grupo 2 pode ser subdividido em dois outros grupos, com similaridade em torno de 0,52: grupo 2.1, de PiraOuro até TEG502; e grupo 2.2, de Perfecta até IPA 11, em que Roxa do Barreiro foi a de menor similaridade para esses dois grupos. O grupo 2.1 pode ainda ser subdividido em dois outros grupos, com similaridade em torno de 0,60: grupo 2.1.1, de PiraOuro até Conquista; e grupo 2.1.2,

de Norte 14 até TEG502 PRR, tendo sido TEG502 a de menor similaridade para esse dois grupos.

O grupo 1 foi constituído por uma cultivar de cebola de bulbos amarelos (Rijnsburger Jumbo), duas de bulbos roxos (IPA 8 e IPA 10) e duas de bulbos brancos (Beta Cristal e White Creole). O grupo 2 foi formado por cultivares dos tipos Grano, Granex, Baia Periforme, Crioula, Pêra e Gladalan. O grupo 2.1, uma subdivisão do grupo 2, foi formado principalmente por cultivares do tipo Baia Periforme, Pêra, Grano e Granex, com o grupo 2.2 formado por duas cultivares tipo Gladalan (Perfecta e Régia), outras sem identificação do tipo a que pertencem, Roxa 13 (tipo Grano) e IPA 11 (tipo Baia). O grupo 2.1.1. foi formado predominantemente por cultivares do tipo Baia Periforme (11 cultivares), duas cultivares Crioula (Crioula Alto Vale e Crioula Mercosul), três cultivares Pêra (BRS Cascata, Jubileu e IPA 7), um híbrido Gladalan (OptimaF1) e uma cultivar Grano (São Paulo). O grupo 2.1.2 foi formado por maior número de cultivares do tipo Granex (Figura 1). A presença de IPA 12 no grupo 2.1.2 deve-se ao fato de essa cultivar ter sido derivada do cruzamento entre uma cultivar do tipo Grano com outra do tipo Baia.

Das cebolas introduzidas no Sul do Brasil, surgiram os tipos Baia Periforme, Pêra Norte, provavelmente introduzida do norte da África, e Crioula, que pode ser resultado do cruzamento de Baia Periforme com Pêra Norte (Barbieri & Medeiros, 2005). O tipo agrônomo Grano é resultado de introduções realizadas da Espanha pelos Estados Unidos em 1925, que tem Valencia como a população base (Goldman et al., 2000).

Em geral, os grupos formados no presente trabalho indicam uma proximidade muito grande entre os três principais tipos agrônomo brasileiros, a qual deve ser resultado do manejo, seleção, recombinação genética e produção de sementes em áreas geográficas quase contínuas do Sul do Brasil. A presença dos tipos Grano e Granex dentro de grupos dos tipos brasileiros deve também refletir a origem comum da espanhola Valenciana, base dos grupos Grano e Granex, com os tipos portugueses introduzidos no Brasil. Comparações com os tipos como Gladalan e alguns híbridos são dificultadas, pois as genealogias desses tipos não são conhecidas. A alta heterozigosidade reportada para cebola (Jakse et al., 2005), também observada neste trabalho, limita a fixação de alelos e a formação de tipos agrônomo específicos do ponto de vista molecular.

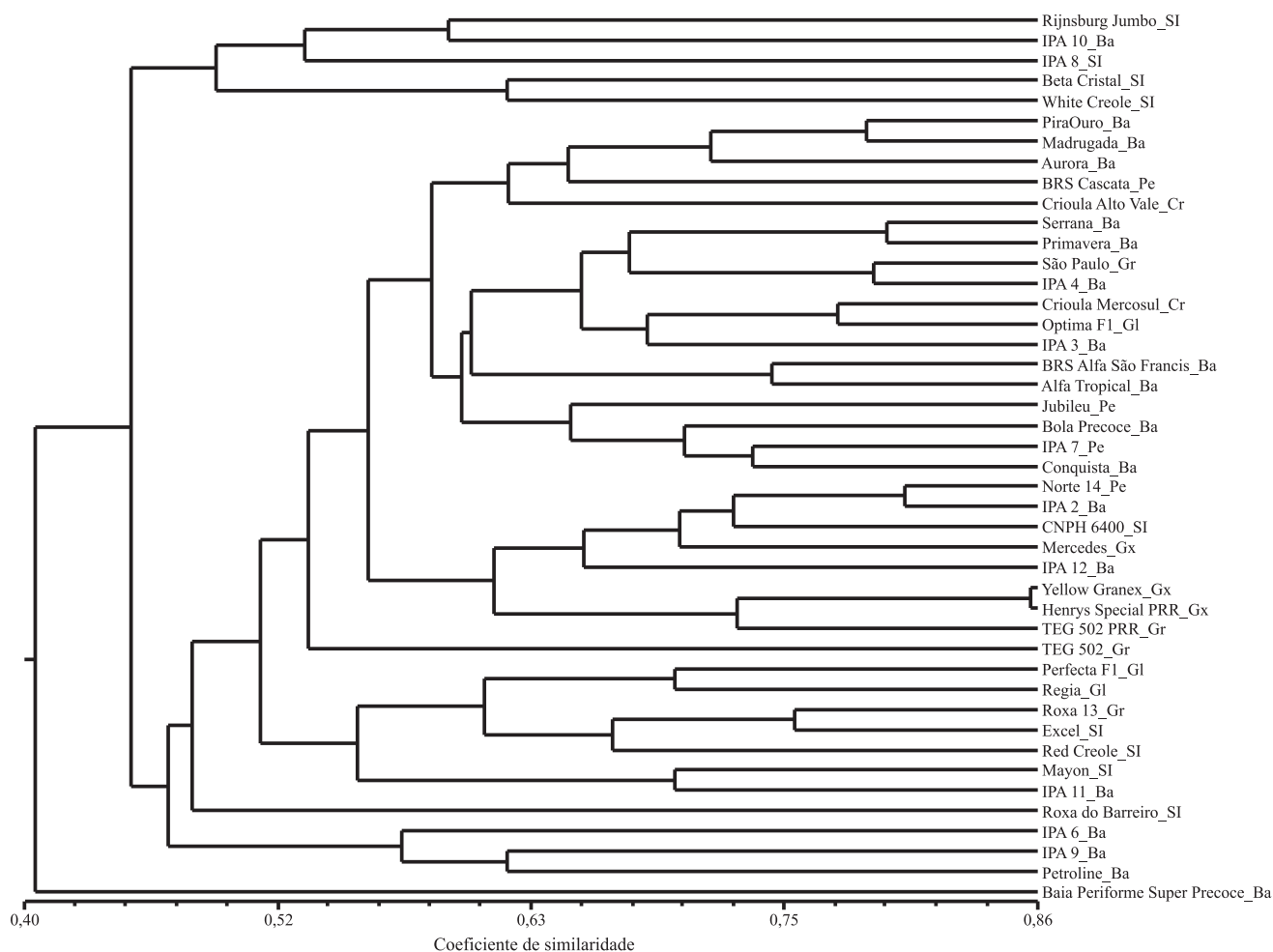


Figura 1. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 44 cultivares de cebola adaptadas às condições de cultivo tropicais e subtropicais do Brasil, analisadas para 40 alelos de 13 locos SSR. Correlação cofenética = 0,7. Tipos agrônômicos (últimas letras): SI, sem informação; Ba, Baia Periforme; Pe, Pêra; Cr, Crioula; Gx, Granex; Gl, Gladalan; Gr, Grano.

A posição da cultivar Baia Periforme Super Precoce no dendrograma, externa ao grupo, pode ser resultado de contaminação com outras cultivares que não foram avaliadas no presente trabalho no processo de produção de sementes. Avaliações com a inclusão de cultivares de outras procedências e a avaliação com um maior número de locos SSR podem ajudar a elucidar essa divergência da 'Baia Periforme Super Precoce' em relação a outras cultivares do tipo Baia Periforme.

O padrão alélico e as estimativas de pares de bases para os 40 alelos revelados em 13 locos SSR neste trabalho é um primeiro esforço para o emprego de marcadores SSR em situações de proteção de cultivares para o agronegócio de cebola no Brasil, em adição aos marcadores fenotípicos. Outros laboratórios

podem estabelecer padrões alélicos e estimativas de pares de bases com anotação automática, em sistemas que utilizam iniciadores fluorescentes. Para essa situação, são esperadas diferenças no número de pares de bases, mas não no padrão alélico obtido neste trabalho. A separação dos fragmentos de PCR em géis de poliácridamida, a coloração dos géis com nitrato de prata e a estimativa do número de pares de bases pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido de marcador molecular podem ser realizadas em laboratórios que dispõem de pequena infraestrutura, enquanto estimativas automatizadas com iniciadores fluorescentes requerem laboratórios com infraestrutura de média a avançada.

Conclusões

1. Os 40 alelos dos 13 locos SSR empregados são eficientes para separar todas as 44 cultivares de cebola avaliadas.

2. As cultivares Yellow Granex x Henry's Special PRR e Baia Periforme Super Precoce x Excel apresentam o maior e o menor número de alelos em comum, respectivamente, entre as 44 cultivares de cebola avaliadas com 13 locos SSR.

3. As 44 cultivares de cebola formam sete grupos principais de similaridade, que apresentam concordância com sua procedência e seu tipo agrônomo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

Referências

- BARBIERI, R.L.; MEDEIROS, A.R.M. A cebola ao longo da história. In: BARBIERI, R.L. (Ed.). **Cebola: ciência, arte e história**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. p.13-20.
- CARUSO, M.; FEDERICI, C.T.; ROOSE, M.L. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. **Molecular Breeding**, v.21, p.195-204, 2008.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.
- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v.93, p.504-509, 2004.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FISCHER, D.; BACHMANN, K. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.153-164, 2000.
- FRITSCH, R.M.; FRIESEN, N. Evolution, domestication, and taxonomy. In: RABINOWITCH, H.D.; CURRAH, L. (Ed.). **Allium crop science: recent advances**. Wallingford: CABI, 2002. p.5-30.
- GOLDMAN, I.L.; HAVEY, M.J.; SCHROECK, G. History of public onion breeding programs and pedigree of public onion germplasm releases in the United States. **Plant Breeding Reviews**, v.20, p.67-103, 2000.
- JAKSE, J.; MARTIN, W.; MCCALLUM, J.; HAVEY, M.J. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.130, p.912-917, 2005.
- KULEUNG, C.; BAENZIGER, P.S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.1147-1150, 2004.
- MAHAJAN, V.; JAKSE, J.; HAVEY, M.J.; LAWANDE, K.E. Genetic fingerprinting of onion cultivars using SSR markers. **Indian Journal of Horticulture**, v.66, p.62-68, 2009.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.
- PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, N.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.185-193, 2002.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.8. Setauket: Exeter Software, 1989.
- SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R. de; RODRIGUES, M.A.; RIBEIRO, H.L.C.; OLIVEIRA, M.M. Similaridade genética entre acessos de cebola de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 48., 2008, Maringá. **Anais**. Campinas: Associação Brasileira de Horticultura, 2008. p.4002-4004.
- SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.487-495, 2009.
- TSUKAZAKI, H.; NUNOME, T.; FUKUOKA, H.; KANAMORI, H.; KONO, I.; YAMASHITA, K-I.; WAKO, T.; KOJIMA, A. Isolation of 1,796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). **Euphytica**, v.157, p.83-94, 2007.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 376p.

Recebido em 5 de novembro de 2009 e aprovado em 29 de dezembro de 2009