

ROBERTA ROCHA FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO LOCUS RESTAURADOR DA MACHO-
FERTILIDADE (*Ms*), TIPO DE CITOPLASMA E VIABILIDADE DE PÓLEN EM
ACESSOS DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

**RECIFE – PE
JULHO – 2017**

ROBERTA ROCHA FERREIRA
Engenheira Agrônoma

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO LOCUS RESTAURADOR DA MACHO-
FERTILIDADE (*Ms*), TIPO DE CITOPLASMA E VIABILIDADE DE PÓLEN EM
ACESSOS DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia -
Melhoramento Genético de Plantas,
para a obtenção do título de mestre.

Orientador

Ph.D. Carlos Antônio Fernandes Santos

RECIFE – PE
JULHO – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

F383i Ferreira, Roberta Rocha
 Identificação molecular do locus restaurador da macho-
 fertilidade (*Ms*), tipo de citoplasma e viabilidade de pólen em
 acessos de cebola (*Allium cepa* L.) / Roberta Rocha Ferreira. -
 2017.
 114 f. : il.

 Orientador: Carlos Antônio Fernandes Santos.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
 Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia –
 Melhoramento Genético de Plantas, Recife, BR-PE, 2017.
 Inclui referências e anexo(s).

 1. *Allium* 2. Mantenedora 3. Macho-estéril 4. Híbrido
 5. Viabilidade polínica I. Santos, Carlos Antônio Fernandes,
 orient. II. Título

CDD 581.1

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO LOCUS RESTAURADOR DA MACHO-FERTILIDADE (*Ms*), TIPO DE CITOPLASMA E VIABILIDADE DE PÓLEN EM ACESSOS DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)

ROBERTA ROCHA FERREIRA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 27/07/2017:

ORIENTADOR

PhD. Carlos Antônio Fernandes Santos – Embrapa Semiárido

EXAMINADORES

Prof. Dr. Dimas Menezes - UFRPE

Pesquisadora Dra. Mina Karasawa - IPA

**RECIFE – PE
JULHO – 2017**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelas bênçãos que tem proporcionado na minha vida, dando-me a oportunidade de progredir através da minha coragem, determinação e empenho.

Aos meus familiares pela dedicação e apoio, me incentivando a continuar mesmo diante das adversidades.

Ao meu orientador PhD. Carlos Antônio Fernandes Santos pela dedicada orientação, paciência, ensinamentos e por confiar na minha capacidade de desenvolver o trabalho de pesquisa proposto.

A minha amiga Flávia pela amizade, apoio e momentos compartilhados que iniciou-se na graduação e continuou no mestrado.

Aos colegas do laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal e afins da Embrapa Semiárido Irlane, Danillo, Sirando, Soniane, Washington, Robson, Andressa, Jamille, Deyse, Ítala pelo bom convívio e ajuda nas atividades de pesquisa.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Semiárido Carlos, Paloma e Hebert pelos momentos compartilhados e contribuição para a realização dos trabalhos.

A Vanessa e a todas as demais pessoas com as quais convivi durante o período de permanência em Juazeiro/Petrolina e que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse mestrado.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE por ter tornando possível a realização do mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Semiárido por disponibilizar os recursos de infraestrutura e humano para a realização dos experimentos e análises.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas da UFRPE, pelos ensinamentos e pela grande contribuição à minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

No presente trabalho foi realizado a identificação dos tipos citoplasmáticos e a genotipagem do locus *Ms* presentes em 59 genótipos de cebola do banco de germoplasma da Embrapa, bem como associação das observações moleculares de genótipos com testes de viabilidade polínica, visando diminuir o tempo na identificação de linhas macho-estéreis ('A') e de suas mantenedoras ('B'), para o desenvolvimento de híbridos adaptados às condições edafoclimáticas do Vale do São Francisco. Os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725* foram usados para identificação de citoplasma, enquanto os marcadores *AcSKP1* e *AcPMS1* para genotipagem do locus *Ms*. A viabilidade polínica foi estimada com carmim acético 2%, solução de Alexander e germinação *in vitro*. Na identificação molecular os dois tipos de citoplasma macho-estéreis ('S' e 'T'), bem como o citoplasma fértil ('N'), assim como os alelos *Ms* e *ms*, tanto em homozigose como em heterozigose foram detectados nos 59 genótipos avaliados. As frequências com os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725*, bem como com os marcadores *AcSKP1* e *AcPMS1*, foram aproximadas nos acessos de cebola avaliados. No germoplasma brasileiro, as frequências dos citoplasmas 'N', 'S' e 'T' foram de 0,47, 0,28 e 0,25, respectivamente, enquanto as frequências alélicas foram de 0,52 e 0,48 para *Ms* e *ms*, respectivamente. Os acessos Régia, EHCEB 20146, EHCEB 201427, Alvorada, Serrana, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, BRS 367, Rainha, Juporanga e Alfa SF C-XI tem potencial para identificação de linhas 'A' e 'B', pois apresentaram misturas para tipo de citoplasma e diferentes frequências alélicas para *Ms*. Os acessos EHCEB 20142040/EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB20141028 e EHCEB 20112006/EHCEB20111006, EHCEB 20142027/EHCEB 20141027, EHCEB 20102019/EHCEB 20101019 e Alfa SF 'B'/Alfa SF 'A' apresentaram todas as plantas avaliadas na condição *Nmsms* e *Smsms* ou *Tmsms*. A seleção molecular e testes de viabilidade polínica apresentaram completa concordância para as linhagens Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20102017 e EHCEB 20142027. Para Alfa SF (*Tmsms*), EHCEB 20142028 (*Nmsms*), EHCEB 20141028 (*Smsms*), EHCEB 20141027 (*Tmsms*) e EHCEB 20141017 (*Tmsms*) não houve validação da seleção molecular pelos testes de viabilidade polínica para algumas plantas. Os métodos de avaliação da viabilidade polínica não apresentaram concordância de classificação estéril e fértil para os acessos EHCEB 20142028, EHCEB 20141028, EHCEB 20141027 e EHCEB 20141017. Seis pares de linhas 'A' e 'B' identificados no presente estudo, Alfa SF (*Tmsms*) x Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*) x BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*) x Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) x EHCEB 20141027 (*Tmsms*), EHCEB 20102017 (*Nmsms*) x EHCEB 20141017 (*Tmsms*) e EHCEB 20142028 (*Nmsms*) x EHCEB 20141028 (*Smsms*), apresentam potencial para o desenvolvimento de híbridos.

Palavras-chave: *Allium*, mantenedora, macho-estéril, viabilidade polínica, híbrido.

ABSTRACT

Molecular Identification of Restorer-of-Fertility Locus (*Ms*), Cytoplasmic Type and Pollen Viability of Onion Accessions (*Allium cepa* L.)

In this study was accomplished the identification of cytoplasmic types and genotyping of *Ms* locus in 59 onion genotypes of the Embrapa germplasm collection, as well as association of molecular observations with pollen viability tests, aiming to reduce time for identification of male-sterile lines ('A') and their maintainers ('B'), for the development of hybrids adapted to the edafoclimatic conditions of the São Francisco Valley. 5'*cob/orfA501* and *orf725* markers were used for cytoplasmic identification, whereas *AcSKP1* and *AcPMS1* for genotyping of *Ms*. The pollen viability was estimated with acetocarmine 2%, Alexander's staining and *in vitro* germination. In the molecular identification two types of male-sterile cytoplasmic ('S' and 'T'), as well as fertile cytoplasmic ('N') and *Ms* and *ms* alleles, both in homozygosity and heterozygosity, were identified in the evaluated genotypes. The frequencies with 5'*cob/orfA501* and *orf725* and *AcSKP1* and *AcPMS1* markers were approximate the evaluated accessions. For Brazilian germplasm, the cytoplasmic frequencies of 'N', 'S' and 'T' were approximately 0,47, 0,28 e 0,25, respectively, while the allelic frequencies were 0,52 and 0,48 for *Ms* and *ms*, respectively. The accessions Régia, EHCEB 20146, EHCEB 201427, Alvorada, Serrana, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, BRS 367, Rainha, Juporanga and Alfa SF C-XI exhibit potential for identification of 'A' and 'B' lines because show mixtures of type of cytoplasmic and different *Ms* allelic frequencies. The accessions EHCEB 20142040/EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB 20141028, EHCEB 20112006/EHCEB 20111006, EHCEB 20142027/EHCEB 20141027, EHCEB 20102019/EHCEB 20101019 and Alfa SF 'B'/Alfa SF 'A' presented all evaluated plants in the *Nmsms* and *Smsms* or *Tmsms* conditions. Molecular selection and pollen viability tests showed complete agreement for Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20102017 and EHCEB 20142027. For Alfa SF (*Tmsms*), EHCEB 20142028 (*Nmsms*), EHCEB 20141028 (*Smsms*), EHCEB 20141027 (*Tmsms*) and EHCEB 20141017 (*Tmsms*) there was no validation of molecular selection by pollen viability tests for some plants. The pollen viability evaluation methods did not present sterile and fertile classification agreement for the accessions EHCEB 20142028, EHCEB 20141028, EHCEB 20141027 and EHCEB 20141017. Six pairs of 'A' and 'B' lines identified in the present study, Alfa SF (*Tmsms*) x Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*) x BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*) x Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) x EHCEB 20141027 (*Tmsms*), EHCEB 20102017 (*Nmsms*) x EHCEB 20141017 (*Tmsms*) and EHCEB 20142028 (*Nmsms*) x EHCEB 20141028 (*Smsms*) demonstrated potential for the development of hybrids.

Key words: *Allium*, maintainer, male-sterile, pollen viability, hybrid.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO LOCUS RESTURADOR DA MACHO-FERTILIDADE (*Ms*) E DO TIPO DE CITOPLASMA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA

Tabela 1. Tipo de citoplasma fértil 'N' e macho-estéril 'S' e 'T' e genotipagem para o locus restaurador da macho fertilidade (*Ms*) em sete plantas de germoplasma brasileiro..... 37

Tabela 2. Tipo de citoplasma fértil 'N' e macho-estéril 'S' e 'T' e genotipagem para o locus restaurador da macho fertilidade (*Ms*) em sete plantas previamente selecionadas como linhas 'A' e 'B'..... 38

Tabela 3. Tipo de citoplasma fértil 'N' e macho-estéril 'S' e 'T' e genotipagem para o locus restaurador da macho fertilidade (*Ms*) em sete plantas de germoplasma de origem diversa..... 39

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAS 'A' E 'B' ASSOCIANDO COM A FERTILIDADE DE PÓLEN EM ACESSOS DE CEBOLA

Tabela 1. Tipo de citoplasma identificado com o marcador *orf725* e genotipagem do locus restaurador da macho-fertilidade pelo marcador AcSKP1 em plantas (n) de acesso de cebola com potencial para linhas 'A' e 'B'..... 57

Tabela 2. Viabilidade polínica de acordo com os métodos da coloração com carmim acético (CCA), solução de Alexander modificada (SAM) e germinação *in vitro* (GIV) de plantas avaliadas (n) *Nmsms*, *Smsms* e *Tmsms* identificadas por marcadores do citoplasma e locus restaurador da macho-esterilidade em acessos de cebola..... 58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Melhoramento de híbridos em cebola mostrando as linhagens envolvidas: Genitor feminino do híbrido ('A'), a mantenedora do genitor feminino ('B') e o genitor masculino do híbrido ('C'). Fonte: Plant Breeding: Past, Present and Future – John E. Bradshaw, 2016.....9

Figura 2. Esquema geral de produção de sementes híbridas utilizando o CMS-S (Adaptado). Fonte: Status of male sterility in vegetable for hybrid development. A review – Rajinder K. Dhall, 2010.....9

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO LOCUS RESTURADOR DA MACHO-FERTILIDADE (*Ms*) E DO TIPO DE CITOPLASMA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA

Figura 1. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* dos marcadores 5'*cob* e *orfA501*. Acesso EHCEB 20111036 (citoplasma 'S', fragmentos com 414, 180 e 473 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Acesso Alfa SF 'A' (citoplasma 'T', fragmentos com 180 e 473 pb) = colunas 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Acesso Cascuda T5 (citoplasma 'N', fragmentos com 180 pb) = colunas 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21. L = Ladder 100 pb..... 40

Figura 2. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador *orf725*. Acesso EHCEB 20111036 (citoplasma 'S', fragmentos com 628 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Acesso Alfa SF 'A' (citoplasma 'T', fragmentos com 628 e 833 pb) = colunas 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Acesso Cascuda T7 (citoplasma 'N', fragmentos com 833 pb) = colunas 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21. L = Ladder 100 pb..... 40

Figura 3. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador AcSKP1. Acesso Sirius F1 (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Acesso Primavera (homozigoto dominante, fragmentos com 898 pb) = coluna 7, 10 e 12 e (heterozigoto, fragmentos com 628 e 898 pb) = colunas 8, 9, 11 e 13. Acesso EHCEB 20142 (homozigoto dominante, fragmento com 898 pb) = coluna 14, (heterozigoto, fragmentos com 628 e 898 pb) = colunas 16, 17, 19 e 20 e (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = colunas 15 e 18. Acesso Bola Precoce (homozigoto dominante, fragmento com 898 pb) = coluna 21. L = Ladder 100 pb..... 41

Figura 4. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador AcPMS1. Acesso EHCEB 20146 (homozigoto recessivo, fragmentos com 276 pb) = colunas 1 e 2 e (homozigoto dominante, fragmentos com 242 pb) = colunas 3 e 4. Acesso Composto 1 (homozigoto dominante, fragmentos com 242 pb) = coluna 9, (heterozigoto, fragmentos com 242 e 276 pb) = colunas 5, 6 e 10 e (homozigoto recessivo, com fragmentos de 276 pb) = colunas 7, 8 e 11. Acesso Crioula Mercosul (homozigoto dominante, fragmento com 242 pb) = coluna 14 e 17, (heterozigoto, fragmentos com 242 e 276 pb) = colunas 12, 13, e 16 e (homozigoto recessivo, fragmentos com 276

pb) = colunas 15 e 18. Acesso Sirius F1 (homozigoto recessivo, fragmento com 276 pb) = coluna 19, 20 e 21. L = Ladder 100 pb..... 41

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAS 'A' E 'B' ASSOCIANDO COM A FERTILIDADE DE PÓLEN EM ACESSOS DE CEBOLA

Figura 1. Fragmentos de DNA de 15 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador *orf725*. Alfa SF 'A' (citoplasma 'T', fragmentos com 628 e 833 pb) = colunas 1, 2, 3, 4 e 5. Alfa SF 'B' (citoplasma 'N', fragmentos com 833 pb) = colunas 6, 7, 8 e 9. EHCEB 20142028 (citoplasma 'S', fragmentos com 628 pb) = colunas 10, 11, 12, 13, 14 e 15. L = Ladder 100 pb..... 59

Figura 2. Fragmentos de DNA de 15 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador AcSKP1. EHCEB 20142028 (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. EHCEB 20102017 (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = coluna 11, 12, 13, 14 e 15. L = Ladder 100 pb..... 59

Figura 3. Viabilidade de grãos de pólen de cebola com carmim acético, solução de Alexander e germinação *in vitro* em CMS-S. Carmim acético: (A) pólen viável e (B) pólen inviável; Solução de Alexander: (C) pólen viável e (D) pólen inviável; Germinação *in vitro*: (E) pólen germinado (viável) e (F) pólen não germinado (inviável)..... 60

Figura 4. Viabilidade de grãos de pólen de cebola com carmim acético, solução de Alexander e germinação *in vitro* em CMS-T. Carmim acético: (A) pólen viável e (B) pólen inviável; Solução de Alexander: (C) pólen viável e (D) pólen inviável; Germinação *in vitro*: (E) pólen germinado (viável) e (F) pólen não germinado (inviável)..... 60

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos Gerais da Cultura da Cebola	4
2.2. Macho-esterilidade em Cebola	6
2.3. Híbridos em Cebola.....	7
2.4. Marcadores Moleculares para Identificação do Tipo de Citoplasma e Locus (<i>Ms</i>) em cebola.....	12
2.5. Produção de Sementes de Cebola no Nordeste	14
2.6. Referências	16
CAPÍTULO II	
3. AVALIAÇÃO DO LOCUS RESTURADOR DA MACHO-FERTILIDADE (<i>Ms</i>) E DO TIPO DE CITOPLASMA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA.....	22
3.1. Resumo	23
3.2. Abstract	24
3.3. Introdução	25
3.4. Material e Métodos.....	26
3.4.1. Material Vegetal	26
3.4.2. Avaliação do Tipo de Citoplasma.....	26
3.4.3. Avaliação do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (<i>Ms</i>).....	28
3.5. Resultados	29
3.5.1. Avaliação do Tipo de Citoplasma.....	29
3.5.2. Avaliação do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (<i>Ms</i>).....	30
3.6. Discussão.....	31
3.7. Conclusões.....	34
3.8. Referências	34
CAPÍTULO III	
4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAS ‘A’ E ‘B’ ASSOCIANDO COM A FERTILIDADE DE PÓLEN EM ACESSOS DE CEBOLA	42
4.1. Resumo	43
4.2. Abstract	44
4.3. Introdução	45
4.4. Material e Métodos.....	46
4.4.1. Material Vegetal	46
4.4.2. Avaliação do Tipo de Citoplasma e do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (<i>Ms</i>)	46
4.4.3. Análise da Viabilidade do Pólen.....	47

4.4.3.1. Coloração com Carmim Acético 2% e Solução de Alexander Modificada	47
4.4.3.2. Germinação <i>in vitro</i>	48
4.5. Resultados	48
4.6. Discussão.....	50
4.7. Conclusões.....	53
4.8. Referências	53

ANEXOS

5.1. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5' <i>cob</i>	62
5.2. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador <i>orfA501</i>	69
5.3. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador <i>orf725</i>	75
5.4. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1	81
5.5. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1	87
5.6. Percentagem de viabilidade polínica em anteras de acessos de cebola avaliados pelos métodos da coloração com carmim acético, 2% (CCA), solução de Alexander modificada (SAM) e germinação <i>in vitro</i> (GIV)	93
5.7. Normas internas do PPGA – Melhoramento Genético de Plantas para redação de dissertação ou tese.....	102

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) pertence ao gênero *Allium* e a família Alliaceae. O centro de origem desta espécie localiza-se na Ásia Central, especialmente no Noroeste da Índia e do Afeganistão. É uma espécie diplóide, com $2n=16$, e atualmente só existe na forma cultivada (Havey 1993, Barbieri 2008). Sua caracterização citogenética indica cromossomos relativamente grandes, sendo que apenas 20 genes deste genoma foram caracterizados por estudo de herança. Os principais fatores que limitam estudos genéticos em cebola são o ciclo biannual, a depressão por endogamia e o tamanho do genoma, sendo um dos maiores em comparação com outras espécies cultivadas (Goldman et al. 2001, Leite 2014).

A cebola é hortaliça amplamente cultivada no mundo, representando dentre as várias espécies cultivadas do gênero *Allium*, a mais importante economicamente e a mais consumida. Em 2013 a safra mundial alcançou uma produção de 85,7 milhões de toneladas. Os maiores produtores são China (26%) e Índia (22%), enquanto que o Brasil ocupa a décima posição no 'ranking' dos principais países produtores, produzindo em torno de 2% da produção mundial, o que corresponde a 1,54 milhões de toneladas (FAOSTAT 2013).

No Brasil, a cebola ocupa lugar de destaque entre as hortaliças mais importantes do ponto de vista econômico, ao lado do tomate e da batata. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2016), o Brasil, em 2015 obteve uma produção de 1.422.117 toneladas de cebola em uma área colhida de 56.404 ha, alcançando um rendimento médio de 25.213 t ha⁻¹. A produção distribui-se em quatro áreas bem definidas: Sul (Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), Centro-Oeste (Goiás) e Nordeste (Bahia e Pernambuco) (SENACE 2017).

A produtividade média da região Nordeste em 2015 foi de 27,04 t ha⁻¹, cuja produção representou 20,94 % da produção nacional. Os Estados da Bahia e Pernambuco, os maiores produtores, produziram 261.660 e 29.430 toneladas, respectivamente (IBGE 2016). Esses números apontam o Nordeste como a terceira maior região produtora (SENACE 2017).

A produção de cebola no Brasil é baseada majoritariamente em cultivares de polinização aberta, sendo que a utilização de híbridos, mais produtivos e associados

ao uso de alta tecnologia de produção, é uma estratégia que vem sendo empregada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e em parte do Nordeste (Leite et al. 2009, Santos and Oliveira 2011). A utilização de híbridos propicia maior uniformidade quanto ao formato, coloração e maturação dos bulbos, que são características economicamente desejáveis (Vilela et al. 2002).

A produção de híbridos em cebola tornou-se viável após a descoberta da macho-esterilidade nuclear-citoplasmática (CMS) presente nessa espécie. O sistema CMS é a base para a produção de híbridos, que requer a identificação de linhagens macho-estéreis, linhagens mantenedoras da macho-esterilidade e linhagens polinizadoras, com boa capacidade específica de combinação (Santos et al. 2008).

Os sistemas utilizados para a produção de híbridos são CMS-S e CMS-T, sendo o primeiro o mais utilizado para a produção de sementes híbridas em cebola (Havey 2000, Havey 2004, Bang et al. 2011). No sistema CMS-S ocorre uma interação entre os efeitos de um par de alelos situado no núcleo (*msms*) e um fator citoplasmático do tipo 'S' (estéril). A planta produzirá pólen quando apresentar citoplasma normal ('N'), independente do par de alelos do núcleo. Quando o alelo dominante *Ms* está presente no núcleo a planta produzirá pólen fértil, independentemente do tipo de citoplasma. A incapacidade para produzir pólen funcional só ocorre na presença de homozigose recessiva e citoplasma 'S'. A combinação *Smsms*, estéril, é denominada linha 'A' (macho-estéril), enquanto a combinação *Nmsms*, fértil, é denominada de linha 'B' (mantenedora), sendo necessária para a manutenção da linha 'A' (Brewster 1994, Havey 1995).

Segundo Pike (1986) a obtenção de híbridos de cebola competitivos no mercado, pelo método convencional, é uma atividade de melhoramento onerosa e que demanda um longo tempo, principalmente quando as linhas 'A' (macho-estéreis) e linhas 'B' (mantenedoras) ainda não tiverem sido identificadas nas populações de polinização aberta.

O tipo de citoplasma das plantas de cebola pode ser identificado através da utilização de marcadores moleculares (Havey 1995, Sato 1998, Engelke et al. 2003, Kim et al. 2009), assim como os alelos específico do locus *Ms* (Gökçe et al. 2002, Gökçe and Havey 2002, Huo et al. 2015, Kim et al. 2015).

Melgar and Havey (2010) relataram que o alelo dominante *Ms* apresenta reduzida penetrância e como consequência genótipos contendo este alelo e citoplasma 'S' podem não apresentar a fertilidade restaurada completamente e que ocasionalmente ocorria pólen viável em indivíduos *Smsms*, tornando a avaliação da viabilidade do pólen necessária, pois para a produção de híbridos o ideal é que as linhas 'A' sejam completamente estéreis, enquanto que as linhas 'B' sejam completamente férteis.

O objetivo deste trabalho foi identificar, por meio de marcadores moleculares, o genótipo para o locus restaurador da macho-fertilidade e tipo de citoplasma em acessos de cebola do banco de germoplasma da Embrapa, assim como avaliar a viabilidade de grãos de pólen, de forma a identificar linhas 'A' e 'B' para a produção de híbridos de cebola.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos Gerais da Cultura da Cebola

A cebola tem sido cultivada por mais de 4700 anos e não existe na forma selvagem nos dias atuais. Sua domesticação provavelmente iniciou-se nas regiões montanhosas do Turcomenistão e norte do Irã, fronteira com as antigas civilizações avançadas do Oriente Médio (Fritsch and Friensen 2002, Brewster 2008).

A cebola é uma espécie diplóide ($2n = 2x = 16$) com um genoma nuclear enorme, considerado 36 vezes maior do que o do arroz (*Oryza sativa* L.) e seis vezes maior do que o do milho (*Zea mays* L.) (Arumuganathan and Eerle 1991). Análises citológicas e de mapa genético suportam a hipótese de que a duplicação intracromossômica é o mecanismo que contribuiu para o tamanho desse genoma (King et al. 1998).

A planta é monocotiledônea, apresenta cerca de 60 cm de altura, com folhas grandes cilíndricas orientadas verticalmente e dispostas alternadamente em duas fileiras, podendo ser cerosas ou não. O caule verdadeiro está localizado abaixo da superfície do solo, sendo este um disco compacto com formato cônico, situado na base inferior do bulbo, de onde partem as raízes fasciculadas. As bainhas foliares formam um pseudocaulo cuja parte inferior é o próprio bulbo (Filgueira 2008). A

inflorescência é do tipo umbela e localiza-se na extremidade de um escapo floral (Oliveira 2005).

A espécie apresenta dicogamia do tipo protândrica, quando os órgãos masculinos maturam antes do feminino, o que favorece a polinização cruzada. Contudo a autopolinização pode ocorrer, pois as umbelas são compostas por centenas de flores hermafroditas. Sendo a cebola uma espécie tipicamente alógama, ela apresenta alta depressão por endogamia na descendência oriunda de autopolinizações (Pike 1986).

O florescimento é condicionado primeiramente por baixas temperaturas para induzir a diferenciação das gemas florais. A haste floral, com uma umbela possuindo de 50 a 2000 flores perfeitas, estende o florescimento numa amplitude de 25 até mais de 30 dias, entre a abertura da primeira e da última flor numa mesma umbela (Kiill et al. 2007). No Brasil, apenas os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, atendem às exigências de produção de sementes sob condições naturais. Nos demais estados brasileiros, sobretudo no Nordeste, é necessário que os bulbos-mãe sejam submetidos a um processo de vernalização artificial em câmara fria para produção de sementes de cebola. Nesse processo deve-se observar a interação entre o tempo de vernalização, cultivar e condições climáticas locais (Resende et al. 2007).

A cebola é anual para produção de bulbos e bienal para produção de sementes, em condições naturais. A espécie é extremamente exigente em condições climáticas para iniciar o processo de formação dos bulbos, tendo o fotoperíodo e a temperatura os dois principais fatores limitantes (Oliveira 2005). O processo de bulbificação só se inicia quando a combinação de fotoperíodo e temperatura ideais são atingidos. Esses fatores podem variar de acordo com as exigências de cada cultivar. Quando essas condições não são atingidas as plantas apenas vegetam e não bulbificam, no entanto, satisfeitas tais condições, a bulbificação inicia-se independentemente do quanto à planta se desenvolveu. Esses dois fatores também são os responsáveis pelo estímulo de mudança da fase vegetativa para a reprodutiva (Figueira 2003).

No Brasil o melhoramento genético da cebola teve como base populações da Pêra Norte e Baía Periforme, originadas de materiais introduzidos por imigrantes

açorianos na região Sul. A diversidade genética desse germoplasma contribuiu para a obtenção de cultivares adaptadas às diferentes regiões de cultivo de cebola no país (Melo et al. 2009). No Nordeste, foi introduzida no final da década de 1940, no estado de Pernambuco, nas regiões de Cabrobó e Belém do São Francisco (Costa et al. 1997). Cerca de mais de 70% da área plantada no Brasil são de cultivares de polinização aberta, com seleções do tipo “Baia Periforme” apresentando características de tolerância a doenças, conservação pós-colheita boa e variação ampla de formato, tamanho, cor, número e espessura de película de bulbos (Santos and Oliveira 2011).

As exigências do mercado consumidor brasileiro são por bulbos de tamanho médio (50-90 mm de diâmetro) de formato globular, de película externa de cor bronzeada uniforme e escamas externas de cor branca (Melo and Boiteux 2001). A demanda por bulbos avermelhados (arroxeados) é reduzida, concentrando-se no Nordeste e na região de Belo Horizonte em Minas Gerais. Já as cebolas suaves e doces não apresentam oferta no mercado brasileiro, contudo existe demanda pelos consumidores (Oliveira et al. 2004).

2.2. Macho-Esterilidade em Cebola

Em cebola a macho-esterilidade nuclear-citoplasmática (CMS) é determinada pelo genoma mitocondrial, tratando-se de um caráter transmitido apenas pelo genitor materno à sua descendência, tendo sido relatado em mais de 150 espécies vegetais (Laser and Lersten 1972). O fenótipo CMS é condicionado por genes mitocondriais aberrantes encontrados na forma de estruturas quiméricas. No entanto essa condição pode ser suprimida pela influência de genes nucleares restauradores da fertilidade. Esses genes frequentemente alteram a expressão de genes associados ao sistema CMS, reduzindo ou bloqueando seus efeitos (Komori et al. 2004). As plantas completamente macho-estéreis são incapazes de se autofecundarem, sendo que toda descendência produzida será advinda de polinização cruzada.

Os sistemas citoplasma macho-estéreis são usados na produção de sementes híbridas. Dois diferentes sistemas CMS têm sido descritos em cebola, denominados citoplasma ‘S’ (Jones and Emsweller 1936) e ‘T’ (Berninger 1965). O citoplasma ‘S’ foi descoberto na cultivar ‘Italian Red’ e é condicionado pela

interação do citoplasma com um único locus nuclear, sendo a fertilidade restaurada pelo alelo dominante (*Ms*) (Jones and Clarke 1943). No sistema CMS-S plantas macho-estéreis apresentam citoplasma 'S' e uma condição de homozigose recessiva para o locus restaurador, sendo a planta *Smsms*. A linha macho-estéril (*Smsms*) é denominada de linha 'A' e pode ser mantida por sementes quando cruzadas com a linha mantenedora, denominada de linha 'B', a qual o citoplasma é do tipo 'N' e possui o genótipo homozigoto recessivo para os alelos *Ms* do núcleo. Todas as sementes colhidas da linha 'A' serão macho-estéreis, enquanto que as colhidas da linha 'B' serão macho-férteis (*Nmsms*) (Havey 2004).

O citoplasma 'T' foi descoberto na cultivar 'Jaune paille des Vertus' na França e a restauração da fertilidade é condicionada por três loci independentes, *A*, *B* e *C* (Schweisguth 1973). O gene *A* é independente dos genes *B* e *C*. Os indivíduos que apresentam o genótipo *aa* e citoplasma tipo 'T' são macho-estéreis. O fenótipo da macho esterilidade também é expresso pelo genótipo *bbcc*, loci que possuem ação complementar, e citoplasma 'T' (Pathak 1997).

Ainda é desconhecido o mecanismo através do qual os genes atuam para determinar a macho-esterilidade (Hu et al. 2014). No entanto, existem duas hipóteses para explicar a interação entre genes citoplasmáticos e nucleares na restauração da fertilidade. A primeira considera que o sistema CMS ocorre devido à falha de uma função mitocondrial normal, e que os alelos restauradores poderiam agir compensando ou substituindo um gene mitocondrial interrompido. A outra hipótese seria a de que o CMS é uma condição derivada da aquisição de um novo gene que origina produtos tóxicos, então o gene nuclear restaurador poderia agir afetando a quantidade desse gene tóxico ou sua expressão. De acordo com estudos realizados essa última é a mais consistente (Hanson 1991).

2.3. Híbridos em Cebola

Os primeiros híbridos comerciais de cebola aplicando o sistema CMS foram lançados no mercado de sementes na década de 1950 nos Estados Unidos da América (EUA) (Currah 2002, Shygio and Kik 2008), produzidos a partir do cruzamento de linhagens do tipo Grano com linhagens resistentes ao fungo *Pyrenochaeta terrestris* (Currah 2002). A obtenção desse híbrido necessitava de métodos trabalhosos e os mesmo produziam poucas sementes. A causa não está clara, se devido ao reduzido vigor das linhagens endogâmicas ou se a polinização

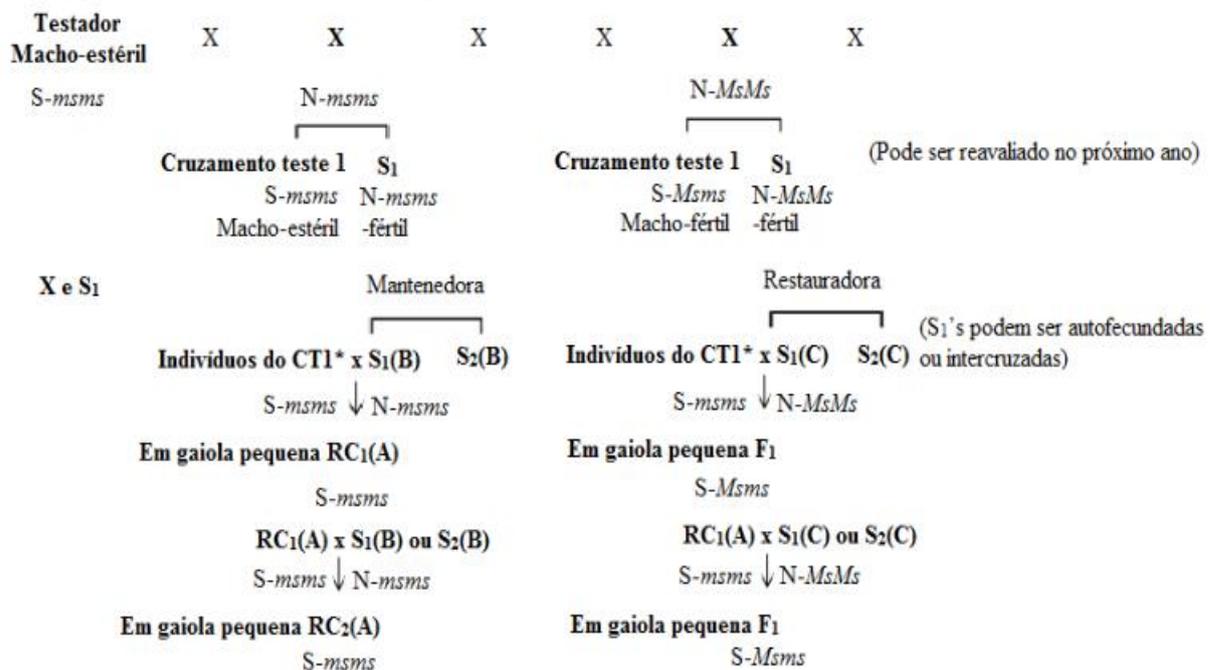
realizada por abelhas não estava sendo eficiente. É importante citar ainda que o rendimento de sementes em campo é uma característica para a qual a pesquisa não tem concentrado esforços (Havey 1993).

Desde que ficaram conhecidos no mercado, os híbridos de cebola tem aumentado a cada ano sua participação no comércio mundial de sementes. Este processo ocorreu mais rapidamente no mercado de sementes de cebola destinado às regiões de clima temperado quando comparado com o mercado de sementes de cultivares adaptadas às regiões tropicais. Atualmente cerca de mais de 90 % das sementes comercializadas nas áreas de clima temperado correspondem a híbridos, enquanto que nas áreas tropicais as variedades de polinização aberta ainda ocupam de 50-60% desse mercado (Shygio and Kik 2008). A exploração da heterose, o aumento da uniformidade, a relativa facilidade de combinação de características e a proteção das variedades lançadas são relatadas como vantagens oferecidas por híbridos (Shygio and Kik 2008).

Para o desenvolvimento de híbridos em cebola pelo método convencional é necessário inicialmente identificar uma fonte de macho-esterilidade, que pode ser oriunda de um outro programa de melhoramento ou um híbrido comercial comprovadamente estéril (testador), e proceder como segue (Figuras 1 e 2):

1ª etapa: Selecionar cultivares adaptadas à área onde se deseja cultivar o híbrido que será obtido. Realizar o plantio das sementes das cultivares selecionadas para produzir os bulbos. Nesse momento também deve-se obter os bulbos da fonte de macho esterilidade previamente identificada (Pike 1986). Antes de realizar o plantio, é importante verificar a coincidência de florescimento entre as linhagens.

População inicial (250-500 plantas são autopolinizadas e cruzadas com testador macho-estéril)



*CT1 – Cruzamento teste 1

Figura 1. Melhoramento de híbridos em cebola mostrando as linhagens envolvidas: genitor feminino do híbrido ('A'), a mantenedora do genitor feminino ('B') e o genitor masculino do híbrido ('C'). Fonte: Bradshaw, 2016.

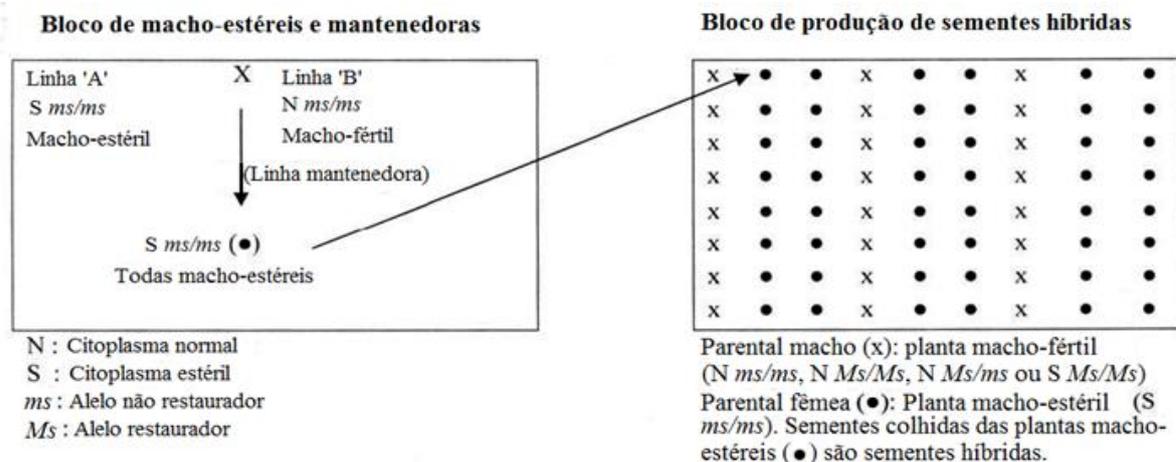


Figura 2. Esquema geral de produção de sementes híbridas utilizando o CMS-S (Adaptado). Fonte: Dhall, 2010.

2ª etapa: Os bulbos obtidos originarão plantas que florescerão após o estímulo adequado. Dessas, selecionar de cada população de 250-500 plantas, que devem ser autofecundadas e ao mesmo tempo cruzadas com uma planta feminina testadora (*Smsms*). Deve ser feito o isolamento aos pares e a polinização é realizada por moscas ou abelhas. Desses cruzamentos resultarão famílias S1 e famílias de cruzamento teste ou famílias F1 (Pike 1986). Em cebola a autofecundação só deve continuar por duas ou três gerações devido à severa

depressão por endogamia. Sendo assim, os genitores de um híbrido são linhagens parcialmente endogâmicas (Pathak 2000; Bradshaw 2016). É importante ainda, verificar se a fonte de esterilidade é realmente estéril. Se a planta for fértil deve ser eliminada e outra estéril deve ser transplantada para ocupar seu lugar. Além do transplante de uma nova planta deve-se eliminar todas as flores abertas da planta fértil porque algum cruzamento pode ter ocorrido com a planta eliminada (Pike 1986).

3ª etapa: As sementes obtidas do cruzamento teste e da autopolinização serão semeadas para produzir bulbos. Atingida a maturidade do bulbo, selecionar as melhores progênies dentre as obtidas por autofecundação. As progênies não selecionadas devem ser descartadas e também suas respectivas famílias F1. Realizar uma segunda seleção dentro de cada uma das progênies selecionadas considerando as características de interesse (Pike 1986).

4ª etapa: Semear 10 bulbos de cada progênie S1 selecionada e 25 de sua respectiva família F1. No florescimento observar se as plantas F1 são férteis ou estéreis. Se todas as plantas da família F1 forem estéreis, sua correspondente família S1 pode ser considerada como mantenedora, na condição *Nmsms*. Então, para obtenção do primeiro retrocruzamento 10 plantas da F1 são cruzadas com suas respectivas mantenedoras em ambientes isolados. As 15 plantas da família F1 remanescentes podem ser eliminadas (Pike 1986). As linhas de F1 que produzirem umbelas férteis devem ser eliminadas junto com seus respectivos pares (Pike 1986).

5ª etapa: Realizar o semeio das sementes obtidas da S2 e do RC1 como descrito anteriormente e novamente selecionar as melhores progênies dentre as plantas férteis (Pike 1986).

6ª etapa: Semear os bulbos da S2 e do RC1 para a terceira e última autopolinização e para se obter o segundo retrocruzamento. Confirmar novamente a esterilidade da linha 'A' (Pike 1986).

7ª etapa: Plantar as sementes das progênies obtidas na etapa anterior aos pares novamente. Nesse momento tem-se linhas férteis (linhas 'B') que foram autofecundadas por três gerações que são agora mais uniformes e apresentam menor vigor. O segundo retrocruzamento, composto pelas plantas estéreis (linhas 'A'), apresenta nesse estágio 87% dos genes de sua mantenedora e deve-se

apresentar bastante similar. A partir desse momento as linhas férteis serão manipuladas como pequenas populações e deve-se aumentar a produção de sementes das linhagens (Pike 1986).

Os procedimentos citados anteriormente são realizados objetivando o desenvolvimento de novas linhas 'A' e 'B'. A linha 'A' obtida é mantida pelo cruzamento com sua respectiva mantenedora (Pike 1986).

8ª etapa: Produção dos bulbos mãe para aumento das sementes de estoque (Shygio and Kik 2008).

9ª etapa: Produção comercial de sementes F_1 . O aumento da produção de sementes das linhas fêmeas (RC4) e estoque de sementes das linhas 'B' e 'C' (Shygio and Kik 2008).

10ª etapa: Estabelecimento de um novo híbrido e novas linhas 'A', 'B' e 'C' (Shygio and Kik 2008).

Segundo Pike (1986) um programa de melhoramento convencional visando obtenção de um novo híbrido de cebola, considerando o ciclo biennial da cultura nas regiões de clima temperado, leva de 15 a 20 anos. Nas áreas de clima tropical, como o Nordeste brasileiro, em que o ciclo da cultura é reduzido para um ano, esse tempo pode ser diminuído pela metade.

Para a produção de sementes híbridas três linhas genitoras ('A', 'B' e 'C') são necessárias (Pathak 2000, Santos et al. 2008). A linha 'A' é usada como o genitor feminino, macho estéril, com a constituição *Smsms*. A linha 'B', mantenedora da linha 'A' é fértil e apresenta uma constituição genética de *Nmsms*. As linhas 'A' e 'B' são quase isogênicas e diferem somente quanto a seus citoplasmas (Pathak 2000). A linha 'C' é o genitor doador de pólen do híbrido. Esta é uma linhagem geneticamente diversa da linha 'A'. Esta é obtida pela autofecundação de plantas selecionadas por uma ou duas gerações e então mantê-las por cruzamento entre irmãos. Para obter um híbrido promissor para exploração comercial uma linha 'A' é cruzada com várias linhas 'C'. A melhor combinação que der máxima heterose para rendimento e outras características desejáveis é identificada para produção comercial (Pathak 2000).

O baixo rendimento de sementes é um problema na produção de sementes híbridas em cebola. A principal causa é a depressão por endogamia que resulta na redução do vigor das linhagens usadas no processo de obtenção de híbridos. Contudo, a endogamia é necessária para se obter uniformidade e altos rendimentos de bulbos em híbridos. O processo de endogamia reduz o vigor das plantas, resultando em baixa produção de flores, caracterizada pelo reduzido tamanho e número de umbelas, decréscimo do período de receptividade de flores individuais e flores abortadas (Pathak 2000).

Uma alternativa para contornar o baixo rendimento de sementes ocasionado pela depressão por endogamia é obter os híbridos adotando os seguintes procedimentos: Primeiramente a linha macho-estéril é cruzada com uma linha geneticamente diversa com constituição *Nmsms*. Isto produz sementes híbridas que são estéreis e produzem descendência também estéril e que possuem maior capacidade de produção de sementes que a linha 'A'. Depois, os bulbos F_1 , então produzidos, são usados como genitor feminino e cruzados com outro genitor doador de pólen (linha 'C'). As sementes coletadas no genitor feminino F_1 serão o novo híbrido comercial (Pathak 2000).

2.4. Marcadores Moleculares para Identificação do Tipo de Citoplasma e Locus (*Ms*) em Cebola

A disponibilidade de informações relativas a marcadores, sequências e outros recursos genéticos em cebola é bastante limitada quando comparado com outras culturas de destaque econômico para a agricultura, tal como as solanáceas. Ademais, além do genoma nuclear nessa espécie, o genoma mitocondrial presente no citoplasma apresenta grande importância por ser responsável pela indução da macho-esterilidade, expressa pelos citoplasmas 'S' e 'T' (Engelke et al. 2004).

A identificação dos tipos de citoplasma ('N', CMS-S ou CMS-T) e dos genes nucleares restauradores da fertilidade em cebola é fundamental para a obtenção de híbridos. Por tratar-se de uma cultura bienal essa identificação pelos métodos convencionais pode levar de quatro a oito anos para se estabelecer o tipo de citoplasma e o genótipo para o locus *Ms*, tornando o programa de melhoramento complexo e oneroso. Desta forma, a seleção assistida por marcadores moleculares, associados aos tipos de citoplasma e genes

restauradores, apresenta grande importância para a identificação dos genótipos úteis a obtenção de híbridos com maior rapidez (Havey 1995).

Nesse contexto, o estudo de sequências do genoma de cloroplastos e mitocôndrias em cebola foi aplicado no desenvolvimento de marcadores que permitem distinguir os citoplasmas 'N', 'S' e 'T', obtendo-se a identificação dos tipos antes de realizar qualquer cruzamento teste (Havey 1995, Sato 1998, Engelke et al. 2003). Embora a esterilidade masculina citoplasmática seja associada ao genoma mitocondrial, ocorre transmissão materna de mitocôndrias e cloroplastos, então polimorfismos em ambas as organelas podem ser úteis na diferenciação entre os citoplasmas (Von Kohn et al. 2013).

Inicialmente desenvolveu-se marcadores moleculares para distinguir entre os citoplasmas 'N' e CMS-S, como o 5' *cob* identificado por Sato (1998) com base na variação do número relativo de cópias de moléculas do DNA mitocondrial. Sequências polimórficas do genoma de cloroplastos também foram aplicadas para diferenciar esses tipos citoplasmáticos (Havey 1995, Von Kohn et al. 2013). Cho et al. (2006) demonstraram ainda a aplicabilidade na diferenciação entre os citoplasmas 'N' e 'S' de um marcador SCAR, localizado no gene *psbA* do cloroplasto, em 35 variedades de cebola de origens diversas.

Para identificação do CMS-T em cebola tem-se disponível apenas dois marcadores. O *orfA501* desenvolvido a partir de uma sequência específica do genoma mitocondrial de cebolinha (*Allium schoenoprasum*) associada a macho-esterilidade, que em combinação ao marcador 5' *cob* permite distinguir os três tipos citoplasmáticos (Engelke et al. 2003). E o *orf725* posteriormente obtido por Kim et al. (2009), que corresponde a uma sequência específica do DNA mitocondrial de cebola, que permite diferenciar entre 'N', CMS-S e CMS-T em uma única reação de amplificação.

Em relação ao sistema CMS-S além dos marcadores associados ao citoplasma foram desenvolvidos marcadores moleculares associados ao locus *Ms*, responsável pela restauração da fertilidade induzida pelo genoma mitocondrial. Os primeiros marcadores moleculares desenvolvidos para genotipagem dessa característica foram dois RFLPs (Gökçe et al. 2002). Esses marcadores foram usados por Bang et al. (2011) para desenvolver os marcadores SCARs, OPT e

PSAO, baseados em reações em cadeia da polimerase e apresentando as características de codominância e especificidade alélica.

Yang et al. (2013) desenvolveram dois novos marcadores SCARs obtidos a partir AFLPs. O DNF-566, que co-segrega com o alelo dominante *Ms*, e o RNS-357 que co-segrega com o alelo recessivo *ms* para identificação de genótipos *MsMs*, *Msms* e *msms*. Os autores ressaltaram ainda que as linhas mantenedoras podem ser confiavelmente selecionadas utilizando esses marcadores. No mesmo ano também foi desenvolvido um marcador tipo CAPS, o *jnurf05* (Park et al. 2013).

Havey (2013), com base em resultados de mapeamento, testou 930 polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), sendo que destes apenas três mostraram-se úteis para seleção no desenvolvimento de linhas mantenedoras. Esses três marcadores SNP foram convertidos em marcadores de sequências polimórficas amplificadas e clivadas (CAPS).

Recentemente Huo et al. (2015) e Kim et al. (2015) reportaram dois novos marcadores, AcSKP1 e AcPMS1, respectivamente. O primeiro é considerado em completo desequilíbrio de ligação com o locus *Ms*, apresenta codominância e a vantagem de utilizar apenas uma reação de amplificação para genotipagem desse locus. O segundo foi proposto como o mais provável gene representante do locus *Ms*.

Toda pesquisa dedicada ao desenvolvimento de marcadores moleculares ligados a macho-esterilidade em cebola demonstra a importância dessa ferramenta no processo de identificação de linhagens úteis a obtenção de híbridos, principalmente pelo auxílio na redução do tempo requerido nesse processo.

2.5. Produção de Sementes de Cebola no Nordeste

O mercado mundial de sementes de hortaliças movimenta em torno de 4,6 bilhões de dólares anualmente, com a cebola representando 10% desse mercado (Udsen 2014). No Brasil o mercado de sementes de cebola movimentou em torno de 158 milhões de dólares em 2016, em uma área de 56 mil hectares (Machado et

al. 2017). Na região Nordeste os principais estados produtores de sementes de cebola são Bahia e Pernambuco (Wanderley Júnior and Melo 2005).

A produção de sementes de cebola na região Nordeste do Brasil foi iniciada pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) em 1972 no estado de Pernambuco, utilizando o processo de vernalização artificial dos bulbos-mãe (Wanderley et al. 1973). A vernalização é necessária porque a cebola é uma planta que para passar da fase vegetativa para a fase reprodutiva necessita de baixas temperaturas para que ocorra a diferenciação das gemas florais (Brewster 2008). Na região Nordeste, o clima predominante é o semiárido, não atingindo mesmo nas épocas mais frias temperaturas baixas o suficiente para uma indução do florescimento em cebola em condições naturais.

O tempo de vernalização e temperatura ótimos variam para cada cultivar (Brewster 2008). Para cultivares adaptadas a condições tropicais e subtropicais, os bulbos-mãe para produção de sementes podem ser armazenados a temperaturas próximas de 2°C por 60 a 90 dias, fase em que não ocorre estímulo a brotação. Quando se desejar induzir a brotação a temperatura deve ser elevada para 8°C 20 a 40 dias antes do plantio (Melo 2007). Para as condições do Vale do São Francisco o período de vernalização de 90 dias a temperaturas de 8 a 10°C é satisfatório (Currah and Proctor 1990).

Durante aproximadamente 10 anos a produção de sementes de cebola na região Nordeste ocorreu apenas no IPA, passado esse período, a tecnologia foi difundida por meio de unidades de demonstração, incentivando desta forma a iniciativa privada (Candeia et al. 1991). Como o processo de difusão obteve ótimos resultados o IPA resolveu modificar seu processo de produção de sementes passando a fazê-lo em regime de parceria com vários produtores (Costa et al. 1999).

O Nordeste apresenta algumas características que condicionam essa região como uma boa opção para a produção de sementes de cebola (Wanderley Júnior and Melo 2005):

- O clima semiárido: chuvas concentradas em um só período, que condiciona menor incidência de doenças; baixa umidade relativa do ar; temperaturas médias

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

anuais elevadas, com períodos de temperaturas amenas; insolação média de 2.800 horas por ano e taxas médias de evaporação de 2.000 mm/ano.

- Necessidade de irrigação: Proporciona estabilidade de produção, produtividade elevada e melhoria na qualidade das sementes.
- Fatores econômicos-culturais: Disponibilidade de mão-de-obra e áreas isoladas com baixo cultivo de hortaliças.

As condições favoráveis à produção de sementes aliado à técnica de vernalização possibilitou o fornecimento de sementes de cebola em escala comercial na região Nordeste, diminuindo, desta forma, a dependência de sementes importadas e produzidas em outras regiões que podem ser pouco adaptadas à realidade local.

2.6. Referências

Arumuganathan K and Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important species. **Plant Molecular Biology Reporter** **9**: 208-218.

Bang H, Cho DY, Yoo KS, Yoon MK, Patil BS and Kim S (2011) Development of simple PCR-based markers linked to the *Ms* locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica** **179**: 439-449.

Barbieri RL (2008) Cebola: das lágrimas ao sabor. In Barbieri RL and Stumpf ERT (eds.). Origem e Evolução das Plantas Cultivadas. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, p. 253-266.

Berninger E (1965) Contribution a l'etude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa* L.). **Année Améliorer Plante** **15**: 183-199.

Bradshaw JE (2016) **Plant Breeding: past, present and future**. Springer, Edinburg, 710p.

Brewster JL (1994) **Onions and other vegetables alliums**. CAB International, Wallingford, 236p.

Brewster JL (2008). **Onion and other vegetable alliums**. CAB International Wallingford, Cambridge, 454p.

Candeia JA, Ferraz E, Cruz DG, Wanderley Júnior LJG and Queiroz MA (1991) Programa de difusão de tecnologia de sementes de cebola no Nordeste. **Horticultura Brasileira** **9**: 45.

Cho KS, Yang TJ, Hong SY, Kwon YS, Woo JG and Park HG (2006) Determination of cytoplasmic male sterile factors in onion plants (*Allium cepa* L.) using PCR-RFLP and SNP-markers. **Molecules and cells** **21**: 411-417.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Costa CP (1997) Germoplasma de cebola brasileiro e seu uso no melhoramento. In **IX Seminário Nacional de Cebola**. Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, p. 2.

Costa ND, Candeia JA and Araújo MT (1999) Importância econômica da cebola no Nordeste. In: Queiroz MA, Goedert CO and Ramos SRR (eds.) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro.

Currah L and Proctor FJ (1990) **Onions in Tropical Regions**. Natural Resources Institute, Chatham, 232p.

Currah L (2002) Onions in the Tropics: cultivars and country reports. In Rabinowitch HD and Currah L (Eds.) **Allium Crop Science: Recent Advances**. CAB International Wallingford, Reino Unido, p. 379-407.

Dhall RK (2010) Status of male sterility in vegetables for hybrid development. A review. **Advances in Horticultural Science** **24**: 263-279.

Engelke T, Terefe D and Tatlioglu TA (2003) PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** **107**: 162-167.

Engelke T, Agbicodo E and Tatlioglu T (2004) Mitochondrial genome variation in *Allium ampeloprasum* and its wild relatives. **Euphytica** **137**: 181-191.

FAOSTAT – Food Agriculture Organization of the United Nations (2013) **Statistics: FAOSTAT-Agriculture**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> > Acesso em: 24/03/2016.

Filgueira FAR (2003) **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Editora UFV, Viçosa, 402p.

Filgueira FAR (2008) **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Editora UFV, Viçosa, 421p.

Fritsch RM and Friensen N (2002) Evolution Domestication and Taxonomy. In Rabinowitch HD and Currah L (Eds.) **Allium Crop Science: Recent Advances**. CAB International Wallingford, Reino Unido, p. 5-30.

Gökçe AF and Havey MJ (2002) Linkage equilibrium among tightly linked RFLPs and the *Ms* locus in open-pollinated onion populations. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **127**: 944-946.

Gökçe AF, Mc Callum J, Sato Y and Havey MJ (2002) Molecular tagging of the *Ms* locus in onion. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **127**: 576-582.

Goldman IL, Schroeck G and Havey MJ (2001) History of public onion breeding programs in the United States. In Janick J (ed.) **Plant Breeding Reviews**. John Wiley e Sons, New York, p. 67-103.

Hanson MR (1991) Plant Mitochondrial Mutations and Male Sterility. **Annual Review of Genetics** **25**: 461-486.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Havey MJ (1993) Onion (*Allium cepa* L.). In Kalloo G and Bergh BO (eds.) **Genetic Improvement of Vegetable Crops**. Pergamon Press, Oxford, p. 35-45.

Havey MJ (1995) Identification of cytoplasm using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. **Theoretical and Applied Genetics** **90**: 263-268.

Havey MJ (2000) Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. **Theoretical and Applied Genetics** **101**: 778-782.

Havey MJ (2004) The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. In Daniell H and Chase CD (eds.) **Molecular biology and biotechnology of plant organelles**. Springer, The Netherland, p. 234–623.

Havey MJ (2013) Single Nucleotide Polymorphisms in linkage disequilibrium with the male-fertility restoration (*Ms*) locus in open-pollinated and inbred populations of onion. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **138**: 306-309.

Hu J, Huang W, Huang Q, Qin X; Yu C, Wang L, Li S, Zhu R and Zhu Y (2014) Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. **Mitochondrion** **19**: 166-171.

Huo YM, Liu BJ, Yang YY, Miao J, Gao LM, Kong SP, Wang ZB, Kitano H and Wu X (2015) 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** **204**: 711-722.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016) **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>> Acesso em: 13/04/2016.

Jones HA and Emsweller SL (1936) A male-sterile onion. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science** **34**: 582-585.

Jones HA and Clarke A (1943) Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science** **43**: 89-194.

Kiill LHP, Resende GM and Souza RJ (2007) Botânica. In Costa ND and Resende GM Cultivo da cebola no Nordeste. **Embrapa Semiárido**, Petrolina, versão eletrônica.

Kim S, Lee ET, Cho DY, Han T, Bang H, Patil BS, Ahn YK and Yoon MK (2009) Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical Applied Genetics** **118**: 433–441.

Kim S, Kim CW, Park M and Choi D (2015) Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. **Theoretical and Applied Genetics** **128**: 2289-2299.

Kim S, Lee ET, Cho DY, Han T, Bang H, Patil BS, Ahn YK and Yoon MK (2009) Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical Applied Genetics** **118**: 433–441.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

King JJ, Bradeen JM, Bark O, McCallum JA and Havey MJ (1998) A low density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. **Theoretical and Applied Genetics** **96**: 52-62.

Komori T, Ohta S, Murai N, Takakura Y, Kuraya Y, Suzuki S, Hiei Y, Imaseki H and Nitta N (2004) Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). **The Plant Journal** **37**: 315-325.

Laser KD and Lersten NR (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. **The Botanical Review** **38**: 425-454.

Leite DL, Oliveira VR, Santos CAF, Costa ND, Fonseca MEN, Boiteux LS, Melo PE, Reis A, Ueno B and Baptista MJ (2009) Melhoramento genético de cebola para as condições tropicais e subtropicais do Brasil. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas** **3**: 18-27.

Leite DL (2014) Produção de sementes de cebola. **Circular técnica - Embrapa Clima Temperado** **142**: 1-9.

Machado D, Lemes E, Oliveira R and Silva J (2017) Ciclo fenológico define plantio de cebola híbrida. Revista Campo & Negócio – Hortifrúti. Disponível em: <http://www.denutri.com.br/noticia/ciclo-fenologico-define-plantio-da-cebola-hibrida>. Acesso em 10/05/2017.

Melgar S and Havey MJ (2010) The dominant *Ms* allele in onion shows reduced penetrance. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **135**: 49-52.

Melo PCT and Boiteux LS (2001) 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**. Goiânia, (CD-ROM).

Melo PCT (2007) Produção de sementes de cebola em condições tropicais e subtropicais. São Paulo: USP, maio 2007. (ESALQ/USP-Departamento de Produção Vegetal).

Melo PCT, Melo AMT and Aragão FAS (2009) Melhoramento genético de hortaliças no Brasil: Retrospectiva e perspectivas. In **Simpósio Nordestino de Genética e Melhoramento de Plantas**. Fortaleza, p. 60-82.

Oliveira VR, Leite DL, Santos CAF, Costa ND and Melo PCT (2004) Cultivo de cebola (*Allium cepa* L.). In Sistemas de Produção de cebola. **Embrapa Hortaliças** **5**, Versão eletrônica.

Oliveira VR (2005) Cultivo de Cebola. Disponível em < file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Cebola_-_Cultivo.pdf. 2005 > Acesso em: 20/01/2017.

Park J, Bang H, Cho DY, Yoon M, Patil BS and Kim S (2013) Construction of high-resolution linkage map of the *Ms* locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica** **192**: 267-278.

Pathak CS (1997) A possible new source of male sterility in onion. In International Symposium on Edible Alliaceae. **Acta Horticulturae** **433**: 313-316.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Pathak CS (2000) Hybrid seed production in onion. **Journal of New Seeds 1**: 89-108.

Pike LM (1986) Onion breeding. In Basset MJ (ed.) Breeding Vegetable Crops. AVI Publishing Company, Westport, p. 357-394.

Resende GM, Costa ND and Souza RJ (2007) Cilma. In Cultivo da Cebola no Nordeste. **Embrapa Semiárido 3**, Versão Eletrônica.

Santos CAF, Leite DL, Costa ND, Oliveira VR, Santos ICN and Rodrigues MA (2008) Identificação dos citoplasmas 'S', 'T' e 'N' via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira 26**: 308-311.

Santos CAF and Oliveira VR (2011) Melhoramento genético de cebola no Brasil: avanços e desafios. In **Congresso Brasileiro de Olericultura**. ABH, Brasília, p. 5726-5743.

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

Schweigsuth B (1973) Etude d' un nouveau type de sterilité male chez l'oignon *Allium cepa* L. **Année Améliorer Plante 23**: 221-223.

SENACE - Seminário Nacional de Cebola (2017) Quadro nacional de oferta de cebola 2017. Painel da Produção Nacional. Dados informados durante o XXIX Seminário Nacional de Cebola e XX Seminário de Cebola do Mercosul, Juazeiro – BA.

Shigyo M and Kik C (2008) Onion. In: Prohens J and Nuez F (eds.) **Vegetables II – Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae**. Springer, Berlin, 365p.

Udsen S (2014) Olerícolas: visão do mercado global. Anuário – Associação Brasileira de Sementes e Mudas, p. 18-22.

Vilela NJ, Makishima N, Vieira RCMT, Camargo Filho WP, Madail JCM, Costa ND, Boeing G, Vivaldi LF and Werner H (2002) Identificação de sistemas de produção de cebola nos principais Estados produtores: relatório final de pesquisa - subprojeto 13.2001.865- 07. **Embrapa Hortaliças**, Brasília.

Von Kohn C, Kielkowska A and Havey MJ (2013) Sequencing and annotation of the chloroplast DNAs and identification of polymorphisms distinguishing normal male-fertile and male-sterile cytoplasms of onion. **Genome 56**: 737-742.

Wanderley LJG, Queiroz MA, Melo PCT, Souto JPM, Santos MAC, Silva HM and Lima DT. **Melhoramento e produção de sementes de cebola no Nordeste**. Recife: SUDENE / BRASCAN NORDESTE / IPA, 1973. 8p. (Mimeogr.).

Wanderley Júnior LJG and Melo PCT (2005) Produção de sementes de hortaliças em condições semi-áridas do nordeste do Brasil. **Circular técnica da Embrapa Hortaliças** – Versão eletrônica, Brasília.

Yang YY, Huo YM, Miao J, Liu BJ, Kong SP, Gao LM, Liu C, Wang ZB, Tahara Y, Kitano H and Wu X (2013) Identification of two SCAR markers co-segregated with

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

the dominant *Ms* and recessive *ms* alleles in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica** 190: 267-277.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO LOCUS RESTAURADOR DA MACHO FERTILIDADE (*Ms*) E DO TIPO DE CITOPLASMA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA

Avaliação do Locus Restaurador da Macho Fertilidade (*Ms*) e do Tipo de Citoplasma em Genótipos de Cebola

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a identificação dos tipos citoplasmáticos e genotipagem para o locus nuclear restaurador da fertilidade (*Ms*) em 59 acessos de cebola, visando a seleção de linhas 'A' e 'B', essenciais a obtenção de híbridos. Foram utilizados os marcadores 5' *cob*, *orfA501* e *orf725* para identificação do citoplasma e marcadores *AcSKP1* e *AcPMS1* para *Ms*. Os dois tipos de citoplasmas macho-estéreis ('S' e 'T'), bem como o citoplasma fértil ('N'), assim como os alelos *Ms* e *ms*, tanto em homozigose como em heterozigose, foram detectados nos 59 genótipos avaliados. As frequências com os marcadores 5' *cob/orfA501* e *orf725*, bem como com os marcadores *AcSKP1* e *AcPMS1*, foram aproximadas nos acessos de cebola avaliados. No germoplasma brasileiro, as frequências dos citoplasmas 'N', 'S' e 'T' foram de 0,47, 0,28 e 0,25, respectivamente, enquanto as frequências alélicas foram de 0,52 e 0,48 para *Ms* e *ms*, respectivamente. Os acessos Régia, EHCEB 20146, EHCEB 201427, Alvorada, Serrana, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, BRS 367, Rainha, Juporanga e Alfa SF C-XI tem potencial para identificação de linhas 'A' e 'B', pois apresentaram misturas para tipo de citoplasma e diferentes frequências alélicas para locus *Ms*. Os acessos EHCEB 20142040/EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB 20141028 e EHCEB 20112006/EHCEB 20111006 apresentaram todas as plantas avaliadas na condição *Nmsms* e *Smsms* e tem potencial para linhas 'B' e 'A', respectivamente, para o sistema CMS-S. Os acessos EHCEB 20142027/EHCEB 20141027, EHCEB 20102019/EHCEB 20101019 e Alfa SF 'B'/Alfa SF 'A' apresentaram todas as plantas na condição *Nmsms* e *Tmsms* e tem potencial para linhas 'B' e 'A', respectivamente, para o sistema CMS-T.

Palavras chave: *Allium cepa*, mantenedora, macho-estéril, híbrido.

Evaluation of Restorer-of-Fertility Locus (*Ms*) and Cytoplasmic Type in Onion Genotypes

Abstract

The goal of this study was to identify cytoplasmic type and alleles at the restorer-of-fertility locus (*Ms*) in 59 onion accessions, aiming selection of 'A' and 'B' lines, essentials to obtain hybrids. The cytoplasmic markers 5' *cob*, *orfA501* and *orf725* and the *Ms* markers *AcSKP1* and *AcPMS1* were employed. The two male-sterile cytoplasmic ('S' e 'T') and the fertile cytoplasmic, as well the *Ms* and *ms* alleles, both in homozygosity and in heterozygosity, were identified in the 59 evaluated genotypes. The frequencies with 5' *cob/orfA501* and *orf725* and *AcSKP1* and *AcPMS1* markers were approximated in the evaluated accessions. For germplasm Brazilian, the frequencies of cytoplasmic 'N', 'S' and 'T' were 0,47, 0,28 e 0,25, respectively, while the allelic frequencies were 0,52 and 0,48 to *Ms* and *ms*, respectively. The accessions Régia, EHCEB 20146, EHCEB 201427, Alvorada, Serrana, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, BRS 367, Rainha, Juporanga e Alfa SF C-XI exhibit potential for identification of 'A' and 'B' lines because showed mixtures of cytoplasmic types and different allelic frequencies for *Ms*. The accessions EHCEB 20142040/EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB 20141028 and EHCEB 20112006/EHCEB 20111006 exhibit all evaluated plants in the *Nmsms* and *Smsms* conditions and have potential for 'B' and 'A' lines, respectively, for the CMS-S system. The accessions EHCEB 20142027 / EHCEB 20141027, EHCEB 20102019 / EHCEB 20101019 and Alfa SF 'B' / Alfa SF 'A' presented all plants in the *Nmsms* and *Tmsms* conditions and have potential for 'B' and 'A' lines, respectively, for the CMS-T system.

Key words: *Allium cepa*, maintainer, male-sterile, hybrid.

INTRODUÇÃO

A cebola é uma das principais hortaliças no Brasil, sendo que em 2015 a produção foi de quase 1,5 milhão de toneladas, com a região Nordeste contribuindo com, aproximadamente, 20% da produção nacional (IBGE 2015, Leite 2012). O país responde por quase 2% e 40% da produção mundial e da América do Sul, respectivamente, sendo o 11º produtor mundial (FAOSTAT 2017). Apesar da maior produtividade, uniformidade e precocidade dos híbridos, o uso de populações de polinização aberta é considerável em algumas regiões, como na região Nordeste (Nunes et al. 2014). Para Santos et al. (2012) o emprego de sementes de populações de polinização aberta deve-se ao custo elevado das sementes híbridas, enquanto Nunes et al. (2014) atribuem à pouca divulgação do desempenho agrônômico dos híbridos.

Para a produção de sementes de híbridos em cebola são utilizados os sistemas CMS-S e CMS-T de esterilidade nuclear-citoplasmática, sendo o primeiro o mais amplamente utilizado, devido a sua grande estabilidade nos diversos ambientes (Havey 2000). No sistema CMS-S apenas um gene (*Ms*) restaura a fertilidade, enquanto alelos de três genes estão envolvidos na restauração da fertilidade no sistema CMS-T (Kim et al. 2015). Para produção de híbrido é necessária a utilização de linhagens macho-estéreis (linhas 'A' ou *Smsms* no sistema CMS-S), linhagens mantenedoras (linhas 'B' ou *Nmsms*, no sistema CMS-S) e linhagens com boa capacidade de recombinação (linhas C) (Santos et al. 2008).

O desenvolvimento convencional de híbridos de cebola requer de 4 a 8 anos para a identificação do citoplasma e de 10 a 12 anos para a transferência do genoma por retrocruzamentos (Khosa et al. 2016), considerando ciclo bienal da espécie. Em regiões tropicais, como o Nordeste brasileiro, esse tempo pode ser reduzido em 50%, pois o ciclo semente-a-semente é anual, com a vernalização de bulbos em câmara fria (Santos et al. 2012).

A identificação do tipo de citoplasma fértil ('N') e estéreis ('S' e 'T') foi facilitada e acelerada com o desenvolvimento de marcadores moleculares *5'cob* e *orfA501* (Sato 1998, Engelke et al. 2003), que requer duas reações independentes de PCR, e pelo marcador *orf725* (Kim et al. 2009), que requer apenas uma reação de PCR. Apesar do avanço na identificação citoplasmática, a identificação de linha 'B' era dependente de retrocruzamentos manuais em

campo. Identificação do tipo de citoplasma foi realizada por Ragassi et al. (2010) e Santos et al. (2012), em germoplasma predominantemente brasileiro, e Khar and Saini (2016), em germoplasma indiano.

Huo et al. (2015) e Kim et al. (2015) reportaram o desenvolvimento de marcadores para identificação do locus nuclear restaurador da macho-esterilidade (*Ms*), tornando possível a completa identificação de linhas 'A' e 'B' assistidas por marcadores. Khar and Saini (2016), reportaram a aplicação dos marcadores 5'cobe *orf725* associados com marcadores do locus *Ms*, em germoplasma indiano, não tendo sido encontrados trabalhos semelhantes na literatura para germoplasma brasileiro. Santos et al. (2012) reportaram híbridos experimentais com base em germoplasma 'Baia', considerando a identificação molecular do tipo de citoplasma, associado com cruzamento teste de campo para identificação da linha 'B'.

O objetivo deste trabalho foi a identificação dos tipos citoplasmáticos presentes em 59 genótipos de cebola oriundos do banco de germoplasma da Embrapa, bem como a genotipagem do locus *Ms*, visando diminuir o tempo na identificação de linhas macho-estéreis ('A') e mantenedoras da macho esterilidade ('B'), etapa essencial no processo de obtenção de híbridos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram avaliados 59 genótipos do banco de germoplasma de cebola da Embrapa Hortaliças (EHCEB – Embrapa Hortaliças Cebola), constituídos de 28 genótipos de origem brasileira (Tabela 1), 11 pares trabalhados para linhas 'A' e 'B' (Tabela 2) e nove genótipos de origem diversa (Tabelas 3). As plantas dos genótipos foram produzidas em sementeira no campo experimental da Embrapa Semiárido e transplantadas manualmente quando atingiram 20 cm de altura. A coleta para extração do DNA, para as etapas de classificação do tipo de citoplasma e avaliação para o locus *Ms*, foi realizada aos 30 dias após o transplântio, em folhas jovens e sadias. Folhas de sete plantas de cada genótipo foram coletadas e acondicionadas no freezer -80°C até a extração individual do DNA.

Avaliação do Tipo de Citoplasma

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o protocolo CTAB 2x (Doyle and Doyle 1990) com algumas modificações: 7.500 rpm e 10.000 rpm, na

primeira e segunda centrifugação, β -mercaptoethanol 2% e incubação a 60°C por 30 min. O DNA foi ressuspendido em tampão Tris-EDTA (TE) e a integridade e quantificação do DNA foi avaliada em gel de agarose a 0,8 %.

Foram realizadas três reações independentes de PCR para a identificação do tipo de citoplasma. As duas primeiras foram realizadas conforme metodologia de Engelke et al. (2003), para os marcadores 5'cob e *orfA501*, com modificações para volume final de 20 μ L: 0,25 μ M de cada *primer*, 0,15 mM de cada dNTP, 1x de tampão de PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 2,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA total. A terceira reação foi realizada conforme metodologia de Kim et al. (2009), para o marcador *orf725*, para volume final de 10 μ L: 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1x de tampão de PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 1,0 unidade da enzima Taq DNA polimerase e 50 ng DNA total.

As sequências dos *primers* do marcador 5'cob (Sato 1998) foram o 1) *primer* S: 5'-GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT-3', 2) *primer* N: 5'-TCTAGATGTCGCATCAGTGGAATCC-3' e *primer* comum 3): 5'-CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT-3', que amplificam os fragmentos de 180 pb e 414 pb. A segunda reação foi com *primers* do marcador *orfA501* (Engelke et al. 2003): *primer* 1: 5'-ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3' e *primer* 2: 5'-CCAAGCATTGGCGCTGAC-3', que amplifica o fragmento de 473 pb. Os resultados dessas duas reações foram considerados como complementares na identificação dos tipos de citoplasma. A terceira reação foi realizada com os *primers* do marcador *orf725* 1) MK-F: 5'-CATAGGCGGGCTCACAGGAATA-3', 2) MK-R1: 5'-AATCCTAGTGTCGGGGTTTCT-3' e 3) MK-R2: 5'-CAGCGAACTTTCATTCTTTTCGC-3' desenvolvidos por Kim et al. (2009). Esses *primers* amplificam fragmentos de 628 pb e 833 pb.

A programação do termociclador para as ampliações com marcador 5'cob consistiu de: a) um ciclo inicial de 2 min a 94°C, b) 36 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 53°C e 2 min a 72°C, e c) um ciclo final de 5 min a 72°C. Para o marcador *orfA501* adotou-se: a) um ciclo inicial de 2 min a 94°C, b) 40 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C, e c) um ciclo final de 5 min a 72°C. Para o marcador *orf725* seguiu-se: a) um ciclo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, b) 40 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 60°C e 90 s a 72°C, e c) um ciclo final de 5 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. A identificação de

citoplasmas 'N', 'S' e 'T' para os marcadores 5'*cob* e *orfA501* baseou-se na metodologia de Engelke et al. (2003): 1) citoplasma 'N' – presença do fragmento de 180 pb e ausência dos demais fragmentos; 2) citoplasma 'S' – presença dos fragmentos de 180 pb, 414 pb e 473 pb; e 3) citoplasma 'T' – presença dos fragmentos de 180 pb e de 473 pb e ausência do fragmento de 414 pb. Para o marcador *orf725* foi identificado como citoplasma 'N' a presença de um fragmento de 833 pb, citoplasma 'T' a presença dos fragmentos de 833 pb e 628 pb e citoplasma 'S' presença de um fragmento de 628 pb. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado em comparação com o marcador Ladder de 100 pb.

Avaliação do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*)

As reações de PCR para o marcador codominante AcSKP1 (Huo et al. 2015) foram ajustadas para volume final de 25 µl: 50 ng de DNA total, 0,4 µM de FU898 (5'- GCAATACACAGCTTCTAGCTGAATT-3'), 0,4 µM de FD898 (5'- AACACACACACAGAGTGAGAAATTTTATATA-3'), 0,2 µM de SU628 (5'- TCTGTGTGTGTGTGTAATTTCTCTG-3'), 0,2 µM de SD628 (5'- CGGAAGATTAATATTTTTCGCTATACAT-3'), 0,15 mM de cada dNTP, 1x de tampão de PCR, 2,0 mM de MgCl₂ e 2,0 unidades da enzima Taq DNA polimerase. Para o marcador AcPMS1 (Kim et al. 2015) as reações de amplificação foram ajustadas para um volume final de 10,0 µl: 10 ng de DNA total, 0,2 µM do *primer forward* (5'- GGTCACCAGGTGGATAGAGAA-3'), 0,2 µM do *primer reverse* (5'- TCATTGAGCTGCATCCAAA-3'), 0,2 mM de cada dNTP, 1x de tampão para PCR, 2,0 mM de MgCl₂ e uma unidade de Taq DNA polimerase. As reações de amplificações para o marcador AcSKP1 conforme descrito por Huo et al. (2015) e Kim et al. (2015). Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose a 1,5 % para o marcador AcSKP1 e em géis a 2,5 % para o marcador AcPMS1, ambos corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

A avaliação para o locus restaurador da fertilidade do marcador AcSKP1 considerou: 1) homocigoto dominante (*MsMs*) – presença de fragmento de 898 pb, 2) homocigoto recessivo (*msms*) – presença de fragmento 628 pb e 3) heterocigoto (*Msms*) – presenças dos fragmentos de 898 e 628 pb (Huo et al. 2015). Para o marcador AcPMS1 considerou-se: 1) homocigoto dominante (*MsMs*) – fragmento de 242, 2) homocigoto recessivo (*msms*) – fragmento de 276 pb e 3) heterocigoto (*Msms*) – presença dos fragmentos de 242 e 276 pb. O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com marcador com o Ladder de 100 pb.

RESULTADOS

Avaliação do Tipo de Citoplasma

Os dois tipos de citoplasmas macho-estéreis ('S' e 'T'), bem como o citoplasma fértil ('N') foram detectados nos 59 genótipos avaliados (Tabelas 1, 2 e 3). Os géis foram de fácil identificação para todos os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725*, produzindo fragmentos dos tamanhos esperados, conforme Engelke et al. (2003) (Figura 1) e Kim et al. (2009) (Figura 2).

As frequências dos citoplasmas 'N', 'S' e 'T' no germoplasma brasileiro com os marcadores 5'*cob/orfA501* foram de 0,47, 0,28 e 0,25, respectivamente, enquanto para *orf725* as frequências foram de 0,47, 0,27 e 0,26, respectivamente (Tabela 1). Para as linhas 'A' e 'B' as frequências de 'N', 'S' e 'T' para 5'*cob/orfA501* foram de 0,50, 0,23 e 0,27, respectivamente, enquanto para *orf725* as frequências foram de 0,51, 0,26 e 0,23, respectivamente (Tabela 2). Para o germoplasma de diferentes origens as frequências de 5'*cob/orfA501* e *orf725* foram iguais, sendo de 0,25, 0,72 e 0,03 para 'N', 'S' e 'T', respectivamente (Tabela 3).

No germoplasma brasileiro as classificações dos marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725* foram iguais em 23 dos 28 genótipos (82%) (Tabela 1). Para os genótipos Serrana, Crioula, EHCEB 20142, Bola Precoce e Alfa SF C-XI observou-se alterações nas frequências dos citoplasma 'N' e 'T' e pequenas discrepâncias entre 'S' e 'T' para Alfa SF C-XI com os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725* (Tabela 1).

Os genótipos Serrana, Regia, EHCEB 20146, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, EHCEB 201427, Alvorada, BRS 367, Rainha, Juporanga e Alfa SF C-XI apresentaram mistura de citoplasma fértil ('N') e estéril ('S' e 'T'), tendo potencial para trabalhos visando identificação de linhas 'A' e 'B' (Tabela 1). Os demais genótipos ou apresentaram citoplasma de tipo único ou mistura dos dois citoplasmas estéreis, tendo limitações para identificação de linhas 'A' e 'B' dentro dos mesmos (Tabela 1).

As classificações dos pares 'A' e 'B' com os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725* foram iguais em 18 das 22 linhas (82%) (Tabela 2). As linhas EHCEB 20141027 e EHCEB 20101003 apresentaram discrepâncias de classificação do tipo de citoplasma, sendo classificadas como 'T' pelos marcadores 5'*cob/orfA501* e como 'S' pelo marcador *orf725*. Foram ainda observadas alterações nas frequências dos citoplasma 'N' e 'T' para as linhas EHCEB 20101019 e EHCEB 20102017.

Os pares EHCEB 20142038/EHCEB 20141038, EHCEB 20112036/EHCEB 20111036, EHCEB 20142040/ EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB 20141028 e EHCEB 20112006/EHCEB 20111006 apresentaram citoplasma 'N' na linha 'B' e citoplasma 'S' na linha 'A' em todas as plantas avaliadas, enquanto EHCEB 20101019/EHCEB 20102019, EHCEB 20101017/EHCEB 20102017 e Alfa SF A/Alfa SF B apresentaram citoplasma 'T' e 'N', respectivamente, em todas as plantas 'A' e 'B' analisadas (Tabela 2). As demais linhas 'A' e 'B' apresentaram mistura de citoplasma dentro de uma linha ou diferente classificação com os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725* (Tabela 2).

No germoplasma de origem diversa observou-se completa concordância para os nove genótipos, tanto na classificação como na frequência dos três tipos de citoplasma avaliados com os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725* foi de 100% (Tabela 3). Apenas os genótipos de origem diversa EHCEB 201124, EHCEB 201513 e EHCEB 201423 tem potencial para identificação de linhas 'A' e 'B', pois apresentaram mistura de citoplasma fértil ('N') e estéril ('T' ou 'S') (Tabela 3).

Avaliação do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*)

Os alelos *Ms* e *ms* foram detectados nos 59 genótipos avaliados, tanto em homozigose como em heterozigose (Tabelas 1, 2 e 3). Os géis foram de fácil identificação para todos os marcadores com os dois alelos, produzindo fragmentos dos tamanhos esperados, conforme Huo et al. (2015) e Kim et al. (2015) (Figuras 3 e 4). Apenas na reação empregando o marcador AcPMS1 (Kim et al. 2015) foi observado presença em algumas das amostras de bandas inespecíficas.

As frequências alélicas e genotípicas no germoplasma brasileiro foram aproximadas com os marcadores AcSKP1 e AcPMS1, tendo sido de 0,52 e 0,48 para *Ms* e *ms*, respectivamente, e de 0,35, 0,33 e 0,32 para *MsMs*, *Msms* e *msms*, respectivamente (Tabela 1). Foram observadas discrepâncias nas classificações alélicas e genotípicas apenas para os genótipos Conquista, Cascuda T8 e Cascuda T5 (Tabela 1).

As frequências alélicas e genotípicas em linhas 'A' e 'B' foram aproximadas com os marcadores AcSKP1 e AcPMS1, tendo sido de 0,06 e 0,94 para *Ms* e *ms*, respectivamente, e de 0,02, 0,07 e 0,91 para *MsMs*, *Msms* e *msms*, respectivamente (Tabela 2). As frequências alélicas e genotípicas no germoplasma de origem diversa foram idênticas com os marcadores AcSKP1 e AcPMS1, tendo sido de 0,49 e 0,51

para *Ms* e *ms*, respectivamente, e de 0,34, 0,29 e 0,37 para *MsMs*, *Msms* e *msms*, respectivamente (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O vigor de heterose, que resulta em alto potencial produtivo e maior uniformidade dos bulbos dos híbridos em relação as populações de polinização aberta, tem resultado na adoção dos híbridos em vários países (Serra and Currah 2002) e na tendência do melhoramento de cebola nos últimos 50 anos nos EUA, Europa e Japão (Brewster 2008). O desenvolvimento de marcadores para identificação do locus nuclear mantenedor da macho-esterilidade (*ms*), associados com marcadores para identificação do tipo de citoplasma fértil ('N') ou macho estéril ('T' e 'S'), abre nova perspectiva no desenvolvimento de híbridos, considerando seleção de linhas 'A' e 'B' dentro de germoplasma adaptados a determinados ambientes, como a região semiárida do Brasil.

Neste trabalho a coincidência dos resultados obtidos pelos marcadores utilizados para identificação citoplasmática foi alta, mas algumas discrepâncias foram detectadas. Os marcadores 5'*cob/orfA501* considera a sequência do gene *cob* (Sato 1998) na diferenciação entre os tipos citoplasmáticos, enquanto que o marcador *orf725* o gene *cox I* (Kim et al. 2009). Contudo ambas as sequências podem ocorrer em quantidades estequiométricas detectáveis em um mesmo indivíduo, o que pode gerar discrepâncias ao comparar análises desses marcadores, tais como as observadas nos acessos Conquista, Alfa SF C-XI, EHCEB20141027 e EHCEB20101003 em que houve alterações de frequências entre os citoplasmas 'S' e 'T'. Kim et al. (2009) ainda cita que a amplificação do *orf725*, que deveria ocorrer apenas nos citoplasmas macho-estéreis, também poderia ser detectadas no citoplasma 'N', indicando que o uso desse marcador pode gerar um certo grau de ambiguidade na classificação dos citoplasmas.

Kim and Yooh (2010) tomando como base análises do genoma mitocondrial e do cloroplasto relatam que genes diferentes podem estar envolvidos na indução da esterilidade nos sistema macho estéreis em cebola. Os autores não constataram diferenças entre o citoplasma 'T' e 'N', mas foram encontradas diferenças significativas desses dois em relação ao CMS-S, sugerindo que o CMS-T tenha se originado a partir citoplasma normal. Esse evento poderia estar associado com às

divergências encontradas na identificação dos citoplasmas pelos marcadores utilizados neste estudo.

Khar and Saini (2016) usaram três marcadores moleculares para identificação de citoplasmas, dentre esses o *5'cob* e o *orf725*, relatando que não foram encontrados resultados divergentes para os marcadores utilizados. No entanto, os autores reportaram apenas citoplasma 'N' e 'S', sem a confirmação dos resultados com a associação do *orfA501* com *5'cob*. Desta forma se uma análise mais completa fosse realizada pelos citados autores, como a aplicada nesse trabalho, discrepâncias poderiam ter sido detectadas.

Os marcadores AcSKP1 (Huo et al. 2015) e AcPMS1 (Kim et al. 2015) relacionados ao locus *Ms*, restaurador da fertilidade no sistema CMS-S, amplificaram fragmentos em indivíduos portando citoplasma 'T'. Esses resultados coincidem com os encontrados por Kim (2014) que relata a presença do locus *Ms* em indivíduos com tipo citoplasmático 'T'. Para o autor a restauração da fertilidade nesse citoplasma pode não ser controlada por três genes independentes, como proposto por Schweisguth (1973), e sim pela distorção de segregação de um único gene. Desta forma, a hipótese é de que a restauração seja conferida pelo mesmo gene ou por dois genes fortemente ligados.

Khar and Saini (2016) reportaram frequências do locus *Ms*, estimadas pelos marcadores AcSKP1 (Huo et al. 2015) e AcPMS1 (Kim et al. 2015), iguais para o germoplasma tipicamente indiano, exceto para a linhagem 121.1, que foram encontradas alterações das frequências. Nesse trabalho, aplicando esses mesmos marcadores em germoplasma brasileiro, foram observadas as mesmas frequências, exceto algumas pequenas discrepâncias nos genótipos Conquista, Cascuda T8 e Cascuda T5.

Genótipos que apresentaram mistura de tipo de citoplasma, associados com alelos recessivos para o locus restaurador tem grande potencial para seleção de linhas 'A' e 'B'. Nessa situação para o sistema CMS-S, de maior estabilidade para produção de híbridos (Havey 2000), foram identificados quatro genótipos no germoplasma brasileiro analisado: Régia, EHCEB 20146, EHCEB 201427 e Alvorada. Os genótipos EHCEB 20142040/EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB20141028 e EHCEB 20112006/EHCEB20111006 apresentaram todas as plantas na condição *Nmsms* e *Smsms*, podendo ser consideradas linhas 'B' e 'A', respectivamente, para o sistema CMS-S. O par EHCEB 20142038/EHCEB

20141038, apesar de apresentar pureza para o tipo de citoplasma, apresentou mistura alélica nas linhas 'B' e 'A', necessitando de eliminação das plantas na condição heterozigota, para completa homozigose *msms*.

Para o sistema CMS-T foram identificados 11 genótipos com potencial para obtenção de linhas 'A' e 'B', considerando mistura de citoplasma e plantas *msms*: Serrana, Régia, EHCEB 20146, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, EHCEB 201427, Alvorada, BRS 367, Rainha, Juporanga e Alfa SF C-XI. Os genótipos EHCEB 20142027/EHCEB 20141027, EHCEB 20102019/EHCEB20101019 e Alfa SF 'B'/Alfa SF 'A' apresentaram todas as plantas na condição *Nmsms* e *Tmsms*, podendo ser consideradas linhas 'B' e 'A', respectivamente, para o sistema CMS-T. As linhas Alfa SF 'A'/Alfa SF 'B' foram identificadas anteriormente por Santos et al. (2010), que adotaram identificação molecular 5'*cob/orfA501* de plantas macho-estéreis com pareamento no campo de plantas férteis, seguindo de cruzamentos testes.

No sistema CMS-T alelos de três genes condicionam a macho esterilidade: plantas com citoplasma 'T' são férteis se possuem alelo dominante *A* ou ambos dominantes alelos complementares *C* e *D* (Brewster 2008). Devido a esse complexo controle, linhas 'B' (*Nmsms*) do sistema CMS-S tem sido usadas como mantenedoras de linhas 'A' do sistema CMS-T (Pathak 2000). Meer Van Der and Van Bennekon (1969) observaram que o citoplasma 'T' pode ter a esterilidade afetada pela temperatura, pois quando analisaram uma linhagem CMS-T encontraram 93% de plantas macho-estéreis a 14°C e apenas 10% a 23°C.

A genotipagem de populações de polinização aberta ou linhas previamente trabalhadas para linhas 'A' e 'B' para tipo de citoplasma e locus nuclear *Ms* consiste de um estudo preliminar essencial para identificar os materiais mais promissores, que deverão seguir para uma fase posterior de estudo, avaliando-se maior número de amostras por genótipos e associando com estudos de viabilidade polínica e cruzamentos testes para confirmação da condição de plantas macho-estéreis e restauradoras da macho-esterilidade.

As populações de polinização aberta ainda são importantes em países como o Brasil (Santos et al. 2010) e Índia (Khar and Saini 2016). Para Brewster (2008) as populações de polinização aberta selecionadas localmente são melhor adaptadas a sua região, podendo superar o potencial de híbridos desenvolvidos em outras regiões. Nesse cenário a identificação de linhas 'A' e 'B' dentro de populações de polinização aberta adaptadas, como a realizada no presente estudo, pode ser a

melhor situação para regiões que importam sementes de híbridos de outros países, de condições edafoclimáticas diferentes.

CONCLUSÕES

1. As frequências citoplasmáticas, com os marcadores 5'*cob/orfA501* e *orf725*, bem como as alélicas e genótípicas do locus restaurador da macho-fertilidade, com os marcadores *AcSKP1* e *AcPMS1*, apresentaram alta concordância nos 59 acessos de cebola avaliados;
2. Os acessos Régia, EHCEB 20146, EHCEB 201427, Alvorada, Serrana, Crioula Mercosul, EHCEB 20142, BRS 367, Rainha, Juporanga e Alfa SF C-XI têm potencial para identificação de linhas 'A' e 'B' pois apresentaram misturas para tipo de citoplasma e frequência alélicas para o locus restaurador da macho-fertilidade;
3. Os acessos EHCEB 20142040/EHCEB 20141040, EHCEB 20142028/EHCEB20141028 e EHCEB 20112006/EHCEB20111006 apresentaram todas as plantas avaliadas na condição *Nmsms* e *Smsms* e têm potencial para linhas 'B' e 'A', respectivamente, para o sistema CMS-S.
4. Os acessos EHCEB 20142027/EHCEB 20141027, EHCEB 20102019/EHCEB20101019 e Alfa SF 'B'/Alfa SF 'A' apresentaram todas as plantas na condição *Nmsms* e *Tmsms* e tem potencial para linhas 'B' e 'A', respectivamente, para o sistema CMS-T.

REFERÊNCIAS

- Brewster JL (2008) **Onion and other vegetable alliums**. CAB International Wallingford, Cambridge, 454p.
- Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus 12**: 13-15.
- Engelke T, Terefe D and Tatlioglu TA (2003) PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical and Applied Genetics 107**: 162-167.
- FAOSTAT – Food Agriculture Organization of the United Nations (2017) **Statistics**: FAOSTAT-Agriculture. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> > Acesso em: 27/03/2017.
- Havey MJ (2000) Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. **Theoretical and Applied Genetics 101**: 778-782.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Huo YM, Liu BJ, Yang YY, Miao J, Gao LM, Kong SP, Wang ZB, Kitano H and Wu X (2015) 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** **204**: 711-722.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015) **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>> Acesso em 12/04/2017.

Khar A and Saini N (2016) Limitations of PCR-based markers to identify male-sterile and maintainer plants from Indian onion (*Allium cepa* L.) populations. **Plant Breeding** **135**: 519-524.

Khosa JS, McCallum J, Dhatt AS and Macknight RC (2016) Enhancing onion breeding using molecular tools. **Plant Breeding** **135**: 9-20.

Kim S, Lee ET, Cho DY, Han T, Bang H, Patil BS, Ahn YK and Yoon MK (2009) Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical Applied Genetics** **118**: 433–441.

Kim S and Yoon M (2010) Comparison of mitochondrial and chloroplast genome segments from three onion (*Allium cepa* L.) cytoplasm types and identification of trans-splicing intron of *cox2*. **Current Genetics** **56**: 177-188.

Kim S (2014) A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene *Ms* and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions. **Molecular Breeding** **34**: 769-778.

Kim S, Kim CW, Park M and Choi D (2015) Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. **Theoretical and Applied Genetics** **128**: 2289-2299.

Leite DL (2012) Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Cebola (*Allium cepa* L.) na Embrapa Clima Temperado. **Circular Técnica - Embrapa Clima Temperado** **145**: 1-7.

Meer Van Der QP and Van Bennekom JL (1969) Effect of temperature on the occurrence of male sterility in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica** **18**: 389-394.

Nunes RLC, Oliveira AB and Dutra AS (2014) Agronomic performance of onion hybrids in Baraúna, in the semi-arid region of Brazil. **Revista Ciência Agronômica** **45**: 606-611.

Pathak CS (2000) Hybrid seed production in onion. **Journal of New Seeds** **1**: 89-108.

Ragassi CF, Oliveira VR, Santos MDM, Boiteux MENF, Boiteux LS and Tosta AL (2010) Identificação de citoplasma macho-estéril em acessos do programa de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças. In **Congresso Brasileiro de Olericultura**. ABH, Brasília, p. 2612-2615.

Ragassi CF, Santos MDM, Fonseca MEN, Oliveira VR, Buzar AGR, Costa CP and Boiteux LS (2012) Genotipagem de polimorfismos associados com sistemas de

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

macho-esterilidade em acessos de cebola adaptados ao Brasil. **Horticultura Brasileira** **30**: 409-414.

Santos CAF, Leite DL, Costa ND, Oliveira VR, Santos ICN and Rodrigues MA (2008) Identificação dos citoplasmas “S”, “T” e “N” via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira** **26**: 308-311.

Santos CAF, Leite DL, Oliveira VR and Rodrigues MA (2010) Marker-assisted selection of maintainer lines within an onion tropical population. **Scientia Agricola** **67**: 223-227.

Santos CAF, Leite DL, Oliveira VR and Costa ND (2012) Identification of maintainer lines and evaluation of experimental hybrids derived from a brazilian tropical onion population. **Acta Horticultural** **935**: 137-141.

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

Schweigsuth B (1973) Étude d'un nouveau type de stérilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L.. **Annonce Améliorer Plante** **23**: 221-223.

Serra ADB and Currah L (2002) Agronomy of onions. In Rabinowitch HD and Currah L (eds.) **Allium crop science: recent advances**. CABI Publishing, Wallingford, p. 187-232.

Tabela 1. Tipo de citoplasma fértil 'N' e macho-estéril 'S' e 'T' e genotipagem para o locus restaurador da macho fertilidade (*Ms*) em sete plantas de germoplasma brasileiro.

Genótipo	Marcador do citoplasma	Citoplasma			Marcador nuclear	Genotipagem		
		N	S	T		<i>MsMs</i>	<i>Msms</i>	<i>msms</i>
Serrana	5'cob/orfA501	2	0	5	AcSKP1	5	1	1
	orf725	4	0	3	AcPMS1	5	1	1
Regia	5'cob/orfA501	5	1	1	AcSKP1	0	1	6
	orf725	5	1	1	AcPMS1	0	1	6
EHCEB 20146	5'cob/orfA501	1	3	3	AcSKP1	3	2	2
	orf725	1	3	3	AcPMS1	3	2	2
Crioula	5'cob/orfA501	1	0	6	AcSKP1	1	3	3
	orf725	4	0	3	AcPMS1	1	3	3
Primavera	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	0	0	7
	orf725	7	0	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB	5'cob/orfA501	0	7	0	AcSKP1	3	4	0
	orf725	0	7	0	AcPMS1	3	4	0
EHCEB 20142	5'cob/orfA501	3	0	4	AcSKP1	1	4	2
	orf725	1	0	6	AcPMS1	1	4	2
Bola Precoce	5'cob/orfA501	0	0	7	AcSKP1	4	3	0
	orf725	1	0	6	AcPMS1	4	3	0
EHCEB	5'cob/orfA501	2	2	3	AcSKP1	1	2	4
	orf725	2	2	3	AcPMS1	1	2	4
Alvorada	5'cob/orfA501	4	1	1	AcSKP1	1	5	1
	orf725	5	1	1	AcPMS1	1	4	1
Roxa Barreiro	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	4	2	1
	orf725	7	0	0	AcPMS1	3	2	1
Conquista	5'cob/orfA501A	6	0	0	AcSKP1	5	1	0
	orf725	6	1	0	AcPMS1	6	1	0
Imperatriz	5'cob/orfA501	0	7	0	AcSKP1	1	3	1
	orf725	0	7	0	AcPMS1	1	3	1
São Paulo	5'cob/orfA501	0	0	6	AcSKP1	3	1	3
	orf725	0	0	7	AcPMS1	2	1	2
BRS 367	5'cob/orfA501	3	0	4	AcSKP1	0	2	3
	orf725	3	0	3	AcPMS1	0	3	3
Rainha	5'cob/orfA501	6	0	1	AcSKP1	4	2	1
	orf725	6	0	1	AcPMS1	4	2	1
Juporana	5'cob/orfA501	6	0	1	AcSKP1	5	1	1
	orf725	6	0	1	AcPMS1	5	1	1
Cascuda T8	5'cob/orfA501	0	3	4	AcSKP1	1	3	3
	orf725	0	3	4	AcPMS1	2	2	3
Cascuda T7	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	3	3	1
	orf725	7	0	0	AcPMS1	2	3	1
Cascuda T6	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	2	4	1
	orf725	7	0	0	AcPMS1	2	4	1
Cascuda T5	5'cob/orfA501	0	7	0	AcSKP1	4	2	1
	orf725	0	7	0	AcPMS1	3	3	1
Cascuda T4	5'cob/orfA501	0	7	0	AcSKP1	3	4	0
	orf725	0	7	0	AcPMS1	3	3	0
Cascuda T3	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	5	1	1
	orf725	7	0	0	AcPMS1	5	1	1
Cascuda T2	5'cob/orfA501	0	7	0	AcSKP1	3	3	1
	orf725	0	7	0	AcPMS1	3	2	1
Alfa SF C-XI	5'cob/orfA501	3	0	4	AcSKP1	2	2	3
	orf725	0	1	6	AcPMS1	2	1	2
IPA 12	5'cob/orfA501	0	7	0	AcSKP1	4	2	1
	orf725	0	7	0	AcPMS1	2	1	2
IPA 11	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	0	2	5
	orf725	6	0	0	AcPMS1	0	2	5
IPA 10	5'cob/orfA501	7	0	0	AcSKP1	0	1	6
	orf725	7	0	0	AcPMS1	0	1	6

Tabela 2. Tipo de citoplasma fértil 'N' e macho-estéril 'S' e 'T' e genotipagem para o locus restaurador da macho fertilidade (*Ms*) em sete plantas de linhas previamente selecionadas como 'A' e 'B'.

Genótipo	Marcador do Citoplasma	Citoplasma			Marcador nuclear	Genotipagem		
		N	S	T		<i>MsMs</i>	<i>Msms</i>	<i>msms</i>
EHCEB20142038	<i>5'cob/orfA501</i>	6	0	0	AcSKP1	3	3	1
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	3	3	1
EHCEB20141038	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	0	3	3
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	0	4	3
EHCEB20112036	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	1	6
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	1	6
EHCEB20111036	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	0	0	5
EHCEB20142040	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	6
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20141040	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20142027	<i>5'cob/orfA501</i>	6	0	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20141027	<i>5'cob/orfA501</i>	0	0	7	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	2	5	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20142028	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	6
EHCEB20141028	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20101003	<i>5'cob/orfA501</i>	0	0	7	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	2	5	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20122003	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20101019	<i>5'cob/orfA501</i>	0	0	7	AcSKP1	0	1	6
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	1	6
EHCEB20102019	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20101017	<i>5'cob/orfA501</i>	0	0	6	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	0	6	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20102017	<i>5'cob/orfA501</i>	6	0	1	AcSKP1	0	2	5
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	2	2
EHCEB20141008	<i>5'cob/orfA501</i>	1	0	6	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	1	0	6	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20142008	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	6
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	6
EHCEB20111006	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	0	0	6
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	0	0	7
EHCEB20112006	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	7
Alfa SF 'A'	<i>5'cob/orfA501</i>	0	0	7	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	0	7	AcPMS1	0	0	7
Alfa SF 'B'	<i>5'cob/orfA501</i>	7	0	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	7	0	0	AcPMS1	0	0	7

Tabela 3. Tipo de citoplasma fértil 'N' e macho-estéril 'S' e 'T' e genotipagem para o locus restaurador da macho fertilidade (*Ms*) em sete plantas de germoplasma de origem diversa.

Genótipo	Marcador do citoplasma	Citoplasma			Marcador nuclear	Genotipagem		
		N	S	T		<i>MsMs</i>	<i>Msms</i>	<i>Msms</i>
EHCEB 201525	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	2	3	2
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	2	3	2
EHCEB 201515	<i>5'cob/orfA501</i>	0	5	0	AcSKP1	2	1	2
	<i>orf725</i>	0	5	0	AcPMS1	2	1	2
Optima F1	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	0	0	7
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	0	0	7
Sirius F1	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	2	3	2
	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	2	3	2
F2 (EHCEB 20131006)	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	2	3	1
EHCEB 20133014)	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	2	3	1
F2 (EHCEB 20151030)	<i>5'cob/orfA501</i>	0	7	0	AcSKP1	1	5	1
EHCEB 20133015)	<i>orf725</i>	0	7	0	AcPMS1	1	5	1
EHCEB 201124	<i>5'cob/orfA501</i>	6	1	0	AcSKP1	4	2	1
	<i>orf725</i>	6	1	0	AcPMS1	4	2	1
EHCEB 201513	<i>5'cob/orfA501</i>	5	0	2	AcSKP1	7	0	0
	<i>orf725</i>	5	0	2	AcPMS1	7	0	0
EHCEB 201423	<i>5'cob/orfA501</i>	4	3	0	AcSKP1	0	1	6
	<i>orf725</i>	4	3	0	AcPMS1	0	1	6

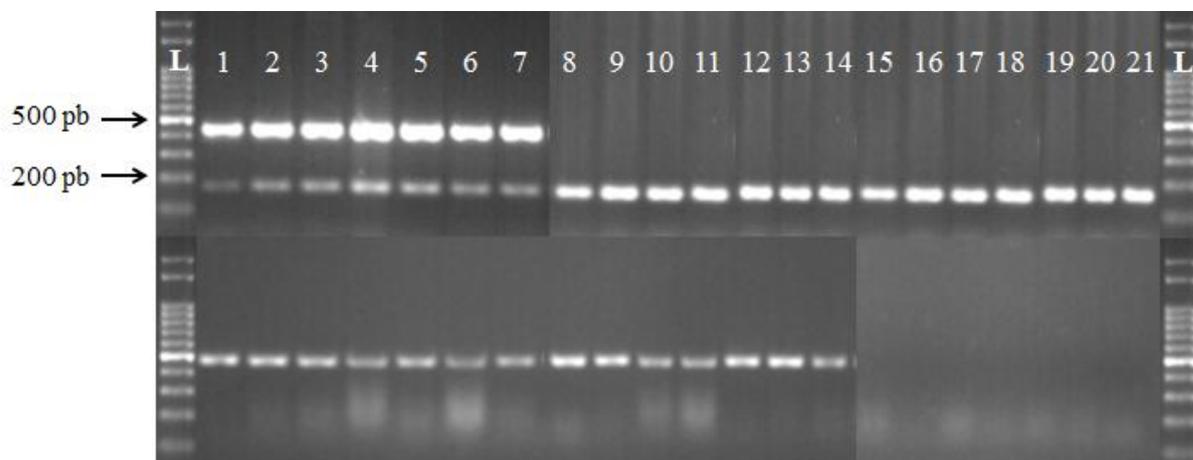


Figura 1. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* dos marcadores *5'cob* e *orfA501*. Acesso EHCEB 20111036 (citoplasma 'S', fragmentos com 414, 180 e 473 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Acesso Alfa SF 'A' (citoplasma 'T', fragmentos com 180 e 473 pb) = colunas 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Acesso Cascuda T5 (citoplasma 'N', fragmentos com 180 pb) = colunas 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21. L = Ladder 100 pb.

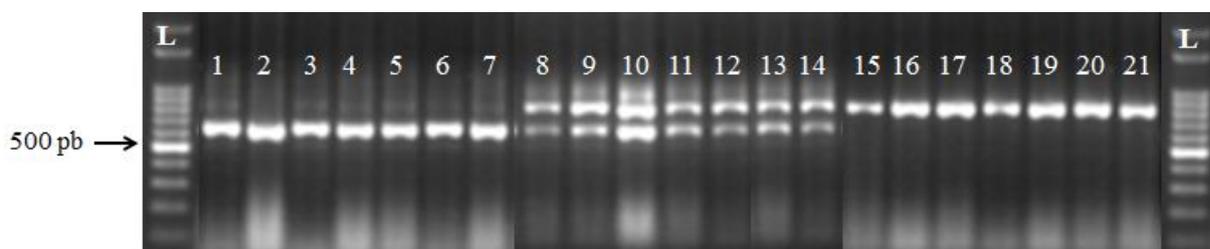


Figura 2. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador *orf725*. Acesso EHCEB 20111036 (citoplasma 'S', fragmentos com 628 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Acesso Alfa SF 'A' (citoplasma 'T', fragmentos com 628 e 833 pb) = colunas 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Acesso Cascuda T7 (citoplasma 'N', fragmentos com 833 pb) = colunas 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21. L = Ladder 100 pb.

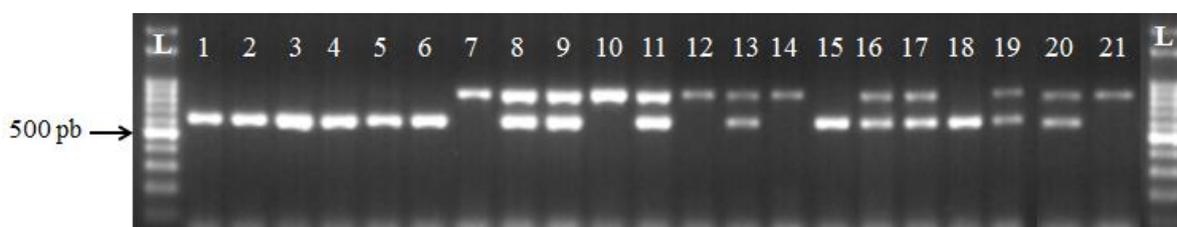


Figura 3. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador AcSKP1. Acesso Sirius F1 (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Acesso Primavera (homozigoto dominante, fragmentos com 898 pb) = coluna 7, 10 e 12 e (heterozigoto, fragmentos com 628 e 898 pb) = colunas 8, 9, 11 e 13. Acesso EHCEB 20142 (homozigoto dominante, fragmento com 898 pb) = coluna 14 e (heterozigoto, fragmentos com 628 e 898 pb) = colunas 16, 17, 19 e 20 e (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = colunas 15 e 18. Acesso Bola Precoce (homozigoto dominante, fragmento com 898 pb) = coluna 21. L = Ladder 100 pb.

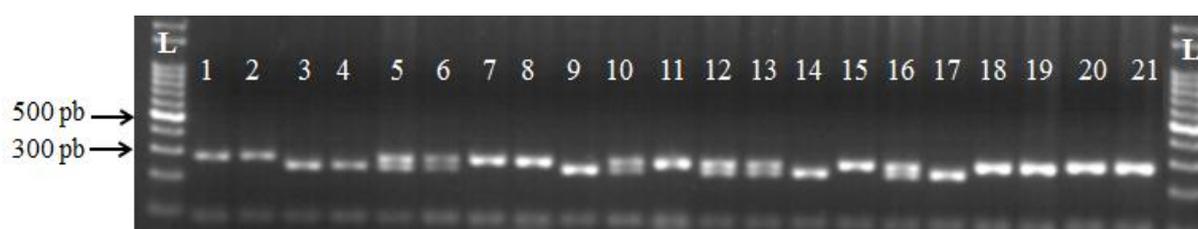


Figura 4. Fragmentos de DNA de 21 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador AcPMS1. Acesso EHCEB 20146 (homozigoto recessivo, fragmentos com 276 pb) = colunas 1 e 2 e (homozigoto dominante, fragmentos com 242 pb) = colunas 3 e 4. Acesso Composto 1 (homozigoto dominante, fragmentos com 242 pb) = coluna 9, (heterozigoto, fragmentos com 242 e 276 pb) = colunas 5, 6 e 10 e (homozigoto recessivo, com fragmentos de 276 pb) = colunas 7, 8 e 11. Acesso Crioula Mercosul (homozigoto dominante, fragmento com 242 pb) = coluna 14 e 17, (heterozigoto, fragmentos com 242 e 276 pb) = colunas 12, 13, e 16 e (homozigoto recessivo, fragmentos com 276 pb) = colunas 15 e 18. Acesso Sirius F1 (homozigoto recessivo, fragmento com 276 pb) = coluna 19, 20 e 21. L = Ladder 100 pb.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAS 'A' E 'B' ASSOCIADO COM A FERTILIDADE DE PÓLEN EM ACESSOS DE CEBOLA

Identificação Molecular de Linhas 'A' e 'B' Associado com a Fertilidade de Pólen em Acessos de Cebola

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a identificação de linhas 'A' e 'B', em germoplasma brasileiro, associando a identificação por marcadores moleculares do tipo de citoplasma e do locus *Ms* com a análise da viabilidade polínica para selecionar linhas 'A' e 'B' para produção de híbridos de cebola. Foi utilizado os marcadores *orf725* e *AcSKP1* para identificação do citoplasma e alelos do núcleo, respectivamente. A viabilidade polínica foi estimada pelo carmim acético 2%, solução de Alexander modificada e germinação *in vitro*. A seleção molecular e testes de viabilidade polínica apresentaram completa concordância para as linhagens Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20102017 e EHCEB 20142027. Para Alfa SF (*Tmsms*), EHCEB 20142028 (*Nmsms*), EHCEB 20141028 (*Smsms*), EHCEB 20141027 (*Tmsms*) e EHCEB 20141017 (*Tmsms*) não houve validação da seleção molecular pelos de testes de viabilidade polínica para alguns indivíduos. Os métodos de avaliação da viabilidade polínica não apresentaram concordância de classificação estéril e fértil para os acessos EHCEB 20142028, EHCEB 20141028, EHCEB 20141027 e EHCEB 20141017. Plantas de polen fértil dentro de uma linha 'A' específica foram eliminadas antes da antese. Seis pares de linhas 'A' e 'B' identificados no presente estudo, Alfa SF (*Tmsms*) x Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*) x BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*) x Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) x 20141027 (*Tmsms*), EHCEB 20102017 (*Nmsms*) x EHCEB 20141017 (*Tmsms*) e EHCEB 20142028 (*Nmsms*) x EHCEB 20141028 (*Smsms*), apresentam potencial para o desenvolvimento de híbridos.

Palavras-chave: *Allium cepa*, viabilidade polínica, macho-estéril, mantenedora, híbrido.

Molecular Identification of 'A' and 'B' Lines Associated with Pollen Fertility in Onion Accessions

Abstract

The goal of this study was to identify 'A' and 'B' lines, in Brazilian germplasm, associating molecular marker identification of cytoplasmic type and *Ms* locus with analysis of pollen viability in order to select stable 'A' and 'B' lines for onion hybrid production. It was used *orf725* and *AcSKP1* markers for cytoplasmic identification and nuclear alleles, respectively. The pollen viability was estimated with acetocarmine 2%, Alexander's staining and *in vitro* germination. Molecular markers selection and pollen viability tests showed complete agreement for Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20102017 and EHCEB 20142027. For Alfa SF (*Tmsms*), EHCEB 20142028 (*Nmsms*), EHCEB 20141028 (*Smsms*), EHCEB 20141027 (*Tmsms*) and EHCEB 20141017 (*Tmsms*) there was no validation of molecular selection by pollen viability tests for some plants. The pollen viability evaluation methods did not present sterile and fertile classification agreement for the accesses EHCEB 20142028, EHCEB 20141028, EHCEB 20141027 and EHCEB 20141017. Plants with fertile pollen within a specific 'A' line were eliminated before anthesis. Six pairs of 'A' and 'B' lines identified in the present study, Alfa SF (*Tmsms*) x Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*) x BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*) x Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) x 20141027 (*Tmsms*), EHCEB 20102017 (*Nmsms*) x EHCEB 20141017 (*Tmsms*) and EHCEB 20142028 (*Nmsms*) x EHCEB 20141028 (*Smsms*) demonstrated potential for the development of onion hybrids.

Key words: *Allium cepa*, maintainer, male-sterile, pollen viability, hybrid

INTRODUÇÃO

A cebola (*Allium cepa* L.) destaca-se como uma das principais olerícolas produzidas no Brasil, com produção estimada em 1,6 milhão toneladas para o ano de 2017 (IBGE 2017). Os estados da Bahia e Pernambuco, na região Nordeste, respondem por quase 20% da produção nacional, onde predomina o uso de cultivares de polinização aberta (Santos et al. 2012). Apesar do aumento do plantio dos híbridos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e em parte do Nordeste (Faria et al. 2012), as cultivares de polinização aberta respondem por quase 70% da produção brasileira de cebola no Brasil (Santos and Oliveira 2011).

Para a produção de sementes de híbridos em cebola são utilizados os sistemas CMS-S e CMS-T de esterilidade nuclear-citoplasmática, sendo o primeiro o mais amplamente utilizado, devido à grande estabilidade que expressa nos diversos ambientes (Havey 2000). No sistema CMS-S apenas um gene (*Ms*) restaura a fertilidade, enquanto alelos de três genes estão envolvidos na restauração da fertilidade no sistema CMS-T (Kim et al. 2015). Nesses sistemas é necessário a utilização de linhagens macho-estéreis (linhas 'A'), linhagens mantenedoras (linhas 'B') e linhagens com boa capacidade de recombinação (linhas 'C') (Santos et al. 2008).

A obtenção de híbridos de cebola, pelo método convencional, é uma atividade onerosa e que demanda quase 20 anos em regiões temperadas, principalmente quando as linhas 'A' (macho-estéreis) e linhas 'B' (mantenedoras) ainda não tiverem sido identificadas nas populações de polinização aberta (Pike 1986). Tentativas anteriores para identificar linhas 'A' e 'B' em germoplasma brasileiro por métodos convencionais não resultaram no desenvolvimento de híbridos de cebola (Santos et al. 2010).

A completa seleção assistida de linhas 'A' e 'B' por marcadores moleculares tornou-se possível com a identificação do citoplasma por *5'cob* e *orfA501* (Sato 1998, Engelke et al. 2003) ou *orf725* (Kim et al. 2009), bem como a possível identificação do locus nuclear restaurador da macho-esterilidade (*Ms*) por *AcSKP1* (Huo et al. 2015) ou *AcPMS1* (Kim et al. 2015). Espera-se dessa forma, que a identificação de linhas 'A' e 'B' assistida por marcadores seja efetuada em quatro anos, considerando pelo menos um cruzamento teste', reduzindo consideravelmente o tempo necessário por métodos clássicos.

A estabilidade de produção de grãos de pólen férteis e estéreis em linhas 'B' e 'A', respectivamente, base da produção de híbridos de cebola, pode ser comprovada por coloração com reagentes diversos, como carmim acético, solução de Alexander e germinação *in vitro* do grão de pólen (Abdelgadir et al. 2012). Khar and Saini (2016), reportaram seleção assistida molecular de linhas 'A' e 'B' em germoplasma indiano de cebola, associando com a coloração de carmim acético para viabilidade polínica. Para germoplasma brasileiro não foram encontrados trabalhos semelhantes, associando seleção assistida para linhas 'A' e 'B' com análise da viabilidade polínica.

O objetivo desse trabalho foi a identificação de linhas 'A' e 'B', em germoplasma brasileiro, associando a identificação por marcadores moleculares do tipo de citoplasma e do locus *Ms* com a análise da viabilidade polínica, etapa inicial para o desenvolvimento de híbridos de cebola.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram avaliados 12 acessos (Tabela 1), do banco de germoplasma de cebola da EMBRAPA, identificados em avaliação preliminar (Capítulo II), com potencial para seleção de linhas 'A' e 'B', pois apresentavam ou mistura de citoplasma e alelos recessivos *ms* ou 100% de plantas na condição *Nmsms* e *Smsms* ou *Tmsms*. O transplântio das mudas de cebola foi realizado em maio/2016 e a colheita em setembro/2016 no campo experimental da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Os bulbos colhidos foram armazenados e vernalizados em câmara fria por 120 dias, à temperatura de 8°C e umidade do ar em torno de 60%, para posterior plantio e emissão de escapo floral para avaliação da viabilidade polínica e análises com marcadores citoplasmáticos e locus restaurador da macho-fertilidade.

Avaliação do Tipo de Citoplasma e do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*)

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o protocolo CTAB 2x (Doyle and Doyle 1990) como descrito no capítulo II.

O tipo de citoplasma foi identificado com marcador *orf725* (Kim et al. 2009), para volume final de 10 µl: 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1x de tampão de PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 1,0 unidade da enzima Taq DNA polimerase e

50 ng DNA total. A programação do termociclador para as amplificações desse marcador consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 60°C e 90 s a 72°C, e um ciclo final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados e classificados em géis de agarose 1,5%: fragmento de 833 pb = citoplasma 'N', fragmentos de 833 pb e 628 pb = citoplasma 'T' e fragmento de 628 pb = citoplasma 'S'.

Os alelos do locus restaurador da macho-esterilidade foram identificados pelo AcSKP1 (Huo et al. 2015), para volume final de 25 µl: 50 ng de DNA total, 0,4 µM de FU898, 0,4 µM de FD898, 0,2 µM de SU628, 0,2 µM de SD628, 0,15 mM de cada dNTP, 1x de tampão de PCR, 2,0 mM de MgCl₂ e 2,0 unidades da enzima Taq DNA polimerase. Foi adotado o protocolo de amplificação conforme descrito por Huo et al. (2015). Os produtos amplificados foram separados e classificados em géis de agarose a 1,5 %:

A avaliação para o locus restaurador da fertilidade do marcador AcSKP1 considerou: fragmento de 898 pb = homozigoto dominante (*MsMs*), fragmento de 898 e 628 pb = heterozigoto (*Msms*) e fragmento de 628 pb = homozigoto recessivo (*msms*).

Análise da Viabilidade do Pólen

Plantas identificadas com citoplasma *Smsms* ou *Tmsms* e *Nmsms* foram avaliadas para fertilidade ou esterilidade do grão de pólen. Foram coletadas, ao acaso, quatro flores recém-abertas da umbela de cada planta a ser avaliada para a análise de viabilidade do pólen pelos métodos de coloração com carmim acético 2% e solução de Alexander modificada (Peterson et al. 2010), bem como germinação *in vitro*.

Coloração com Carmim Acético 2% e com Solução de Alexander Modificada

Botões florais recém-abertos de plantas de cada acesso foram coletados individualmente. Para o preparo das lâminas, o pólen foi retirado a partir do esmagamento de anteras imersas em uma gota de corante depositada sobre lâmina histológica. As lâminas foram cobertas com lamínulas. Foram preparadas quatro lâminas por inflorescência para cada corante e, em cada lâmina, foram contados, em microscópio óptico no aumento de 100 vezes, um total de 100 grãos de pólen, totalizando 400 grãos de pólen para as quatro repetições por corante.

Para o carmim acético 2% os grãos de pólen foram classificados como férteis, quando apresentaram 100% de coloração avermelhada, e estéreis, quando

apresentaram 100% coloração amarronzada, nenhuma coloração ou coloração parcial. Para a solução de Alexander modificada foram considerados os grãos de pólen viáveis quando apresentavam coloração roxa e inviáveis quando apresentavam coloração verde ou cor difusa.

Germinação *in vitro*

Os grãos de pólen foram coletados durante a antese das flores da inflorescência e inoculados em lâminas escavadas contendo meio de cultura constituído de 200 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de ácido bórico e 1 g de ágar, após ser aquecido para total diluição do ágar (Gomes et al. 2000). O meio foi distribuído nos poços das lâminas escavadas após ser aquecido para total diluição do ágar.

O pólen foi espalhado sobre o meio de cultura de modo a promover uma distribuição homogênea do material. As lâminas contendo os grãos de pólen e o meio de cultura foram mantidas em placas de Petri contendo papel umedecido, simulando uma câmara úmida, para evitar o ressecamento do meio, e acondicionados à temperatura ambiente com exposição à luz. O período mínimo para iniciar a avaliação foi de 4 horas. Foi avaliada a germinação pelo comprimento do tubo polínico, com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 100 vezes (Karak and Hazra 2012). Para facilitar a contagem dos grãos de pólen, cada poço da lâmina foi dividido em dois campos de visão, correspondendo a duas repetições. Para cada planta foram preparados dois poços, totalizando quatro repetições. Em cada repetição foram contados 100 grãos de pólen. Foram considerados como férteis grãos de pólen que apresentaram tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

RESULTADOS

Os géis foram de fácil identificação, produzindo fragmentos dos tamanhos esperados, tanto para o marcador citoplasmático *orf725* (Kim et al., 2009) (Figura 1), como para o marcador do locus restaurador *AcSKP1* (Huo et al., 2015) (Figura 2).

Foram observadas linhas 'A' e 'B' puras, apresentando classificação 100% *Smsms* ou *Tmsms* e 100% *Nmsms*, respectivamente, para genótipos selecionados para essa combinação gênico-citoplasmática: Alfa SF linha 'A'/Alfa SF linha 'B', EHCEB 20141028/EHCEB 20142028, EHCEB 20141027/EHCEB 20142027 e EHCEB 20101017/EHCEB 20102017 (Tabela 1). O acesso 'BRS 367' apresentou mistura para tipo de citoplasma, bem como mistura genotípica para o locus

restaurador da fertilidade, que pode possibilitar a identificação de linhas 'A' e 'B' (Tabela 1). Os acessos Cascuda T7 ('B') e Cascuda T5 ('A') apresentaram tipo único de citoplasma e mistura genotípica para a restauração da fertilidade (Tabela 1), indicando a possibilidade do uso de plantas da Cascuda T7 como mantenedoras de plantas da Cascuda T5, considerando que os dois acessos possuem o mesmo 'background' de cebola valenciana.

A diferenciação entre grãos de pólen viáveis e inviáveis foi facilmente detectável para CMS-S (Figura 3) e CMS-T (Figuras 4). As análises de viabilidade de grãos de pólen de plantas com citoplasma *Smsms* ou *Tmsms* e *Nmsms* apresentaram classificação idêntica para plantas férteis ou estéreis para os acessos Alfa SF (*Tmsms*), Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) e EHCEB 20102017 (*Nmsms*) pelos três métodos adotados (Tabela 2). Foram observadas pequenas diferenças de classificação entre os dois métodos de coloração com a germinação *in vitro* para os acessos EHCEB 20142028 (*Nmsms*) e EHCEB 20141028 (*Smsms*), pequenas diferenças de classificação entre os três métodos para os acessos EHCEB 20141027 (*Tmsms*) e pequena diferença de classificação entre a coloração com carmim acético e solução de Alexander modificada para o acesso EHCEB 20141017 (*Tmsms*) (Tabela 2).

Na linha estéril Alfa SF (*Tmsms*) apenas duas plantas, entre as 12 analisadas, apresentaram a esperada esterilidade, enquanto todas as plantas férteis de Alfa SF (*Nmsms*) apresentaram fertilidade pelos três métodos de viabilidade do pólen (Tabelas 1 e 2). Para os acessos BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) e EHCEB 20102017 (*Nmsms*) foram observadas completa concordância entre as plantas de classificação gênico-citoplasmática com a esterilidade e fertilidade, respectivamente, com os três métodos de viabilidade polínica (Tabelas 1 e 2).

Foram observadas discrepâncias, de 8% para EHCEB 20142028 (*Nmsms*) e 20% para EHCEB 20141017 (*Tmsms*) considerando a classificação gênico-citoplasmática assistida por marcadores (Tabela 1) com a viabilidade polínica com os três métodos (Tabela 2). Para o acesso EHCEB 20141028 (*Smsms*) foi observada discrepância de classificação de 17% entre a identificação molecular (Tabela 1) com a viabilidade por coloração e de 2,3% com a germinação *in vitro* (Tabela 2), enquanto que para o acesso EHCEB 20141027 (*Tmsms*) as

discrepâncias foram maiores, de 32% e 14,3% para os dois métodos de coloração e germinação *in vitro*, respectivamente (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O fenômeno da heterose ou vigor híbrido tem beneficiado a agricultura e fascinado geneticistas por mais de 100 anos, sendo a heterose definida como a situação na qual híbridos exibem performance agrônômica superior à dos genitores (Schnable and Springer 2013). Santos et al. (2012) reportaram heterobeltiose de 34,0% e 30,2% em híbridos experimentais de Baia Periforme, com linhas 'A' e 'B' identificadas na BRS Alfa São Francisco, avaliados em Petrolina, PE. A identificação de várias linhas 'A' e 'B', associando seleção assistida por marcadores para tipo de citoplasma e locus *Ms* com viabilidade polínica, como realizado de forma pioneira nesse trabalho para germoplasma brasileiro, poderá reduzir substancialmente os preços dos híbridos disponíveis no mercado local, possibilitando maior uso pelos produtores.

As plantas dos acessos analisadas no presente estudo apresentaram classificação 100% *Smsms* ou *Tmsms* e 100% *Nmsms*, confirmando avaliação prévia realizada com marcadores para tipo de citoplasma e locus *Ms* (Capítulo II) e indicando o potencial delas para o desenvolvimento de híbridos. A ausência de segregação dentro de linhas 'A' e 'B' é essencial para a produção híbridos de cebola, considerando que a existência de segregantes poderá diminuir o vigor de heterose e a uniformidade de bulbos e a maturação esperada nos híbridos comerciais.

A seleção assistida por marcadores moleculares em cebola vem sendo empregada para diferenciar citoplasmas 'N', 'S' e 'T' (Santos et al. 2010, Ragassi et al. 2010, Ragassi et al. 2012, Khar and Saini 2016, Patil et al. 2016) contribuindo para a redução do número de cruzamento testes necessários para a identificação de linhas 'A' e 'B'. Marcadores para o locus *Ms*, desenvolvidos por Huo et al. (2015) e Kim et al. (2015) tornou possível a completa identificação assistida de linhas 'A' e 'B', tendo sido aplicados em germoplasma indiano (Khar and Saini 2016) e em germoplasma brasileiro (Capítulo II) para identificação simultânea do tipo de citoplasma e condição recessiva do alelo *Ms*.

O uso de marcadores podem ser associados a outros métodos que permitam uma validação dos mesmos, como os testes de viabilidade polínica. Estudos com a

associação molecular e teste de coloração e germinação *in vitro* foram realizados em materiais de cebola na Índia (Saini et al. 2015, Patil et al. 2016, Khar and Saini 2016).

Os resultados das análises da viabilidade polínica com coloração do carmim acético, solução de Alexander e germinação *in vitro* apresentaram alta concordância no presente estudo, indicando a utilidade dos mesmos para avaliação da fertilidade em cebola. Para Ockendo and Gates (1976), métodos de coloração superestimam a fertilidade do grão de pólen, pois aqueles com citoplasma não são, necessariamente, férteis. Contudo os mesmos autores ressaltam que grãos de pólen inviáveis são confiavelmente identificados com carmim acético pela ausência de citoplasma. O mesmo princípio pode ser aplicado para a solução de Alexander que também considera o preenchimento do grão de pólen pelo protoplasma como índice de viabilidade.

A coloração com carmim acético foi empregada em estudos com linhas 'A' e 'B' de cebola (Lorezon and Almeida 1997) e coqueiro (Machado et al. 2014), mas associando-a com germinação *in vitro* do grão de pólen. Para Alexander (1980), o corante desenvolvido pelo referido autor apresenta maior precisão do que o carmim acético, sendo corroborado por Auler et al. (2006) em estimativas de viabilidade de pólen em *Baccharis trimera*. Tomé et al. (2007) e Vieira et al. (2012), avaliando viabilidade de pólen de espécies do gênero *Solanum* e *Manihot*, respectivamente, encontraram discrepâncias entre os testes de coloração e a germinação *in vitro*, sugerindo que nesses casos apenas os testes de coloração não são adequados para estimar a viabilidade de grãos de pólen.

A associação da seleção molecular gênico-citoplasmática com viabilidade polínica apresentou limitações para plantas Alfa SF (*Tmsms*), EHCEB 20142028 (*Nmsms*), EHCEB 20141017 (*Tmsms*), EHCEB 20141028 (*Smsms*) e EHCEB 20141027 (*Tmsms*), pois plantas que deveriam apresentarem completa esterilidade apresentaram grãos de pólen férteis ou vice-versa. Completa concordância da classificação molecular de linhas 'A' e 'B' com a viabilidade polínica ocorreu no presente estudo para plantas dos acessos Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), EHCEB 20142027 e EHCEB 20102017, indicando a adequação dessa abordagem para essa etapa essencial para o desenvolvimento de híbridos de cebola.

Saini et al. (2015) verificaram resultados concordantes da viabilidade polínica com a seleção assistida para linhas 'A' e 'B' em três população indianas de cebola de polinização aberta. Em estudo posterior com germoplasma indiano, Khar and Saini (2016) reportaram baixa concordância entre a seleção de linhas 'A' e 'B' assistida por marcadores com teste de viabilidade com carmim acético 0,5 %. A baixa concordância reportada pelos citados autores pode estar relacionada à penetrância reduzida do alelo *Ms* relatada por Melgar and Havey (2010), em que genótipos heterozigotos em plantas portando citoplasma estéril podem não apresentar restauração da fertilidade e não a uma falha de seleção dos marcadores utilizados. No presente estudo foram observadas concordância de classificação pelos métodos de viabilidade polínica com seleção assistida para plantas de sete acessos e ausência de concordância para plantas de cinco acessos, indicando razoável precisão da seleção assistida. Plantas *Smsms* ou *Tmsms* que apresentaram viabilidade polínica ou plantas *Nmsms* estéreis foram eliminadas antes da polinização, sendo produzidas sementes de plantas 'A', testadas como estéreis, com plantas 'B', testadas como férteis, pelos três métodos de análise do pólen, de forma a superar a limitação da seleção assistida.

A linhagem Alfa SF 'A', portadora de citoplasma tipo 'T' apresentou considerável porcentagem de pólen viável pelos métodos empregados, podendo estar associado as limitações do sistema T para produção de híbridos (Havey 2000) ou mesmo a contaminações ocorridas na produção de sementes, pois Santos et al. (2012) reportaram 100% de bulbos roxos de sementes produzidas em plantas da linha da Alfa SF 'A' pareada com plantas de população de bulbo roxo.

A presença de pólen viável em linhagens macho-estéreis também foi relatada por Barhan and Munger (1950) em CMS-S e por Meer Van Der and Van Bennekon (1969) em CMS-T, para variação de temperatura de 21,1 a 26,6 °C e de 20 a 23 °C, respectivamente. Em ambos os trabalhos os autores citam a influência da temperatura como o principal fator influenciando a produção de pólen viável em linhas 'A'. No caso do presente trabalho a variação de temperatura durante a floração foi de 25 a 35 °C e pode ter exercido influência na produção de grãos de pólen em quantidade reduzida em linhas macho-estéreis.

Os seis pares de linhas 'A' e 'B' identificados no presente estudo, quais sejam, Alfa SF (*Tmsms*) x Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*) x BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*) x Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027

(*Nmsms*) x 20141027 (*Tmsms*), EHCEB 20102017 (*Nmsms*) x EHCEB 20141017 (*Tmsms*) e EHCEB 20142028 (*Nmsms*) x EHCEB 20141028 (*Smsms*) são potencias para o desenvolvimento de híbridos adaptados às condições edafoclimáticas do Vale do São Francisco, podendo contribuir significativamente para a expansão dos mesmos na região.

CONCLUSÕES

1. A seleção molecular e testes de viabilidade polínica teve completa concordância para as linhagens Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*), BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*), Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20102017 e EHCEB 20142027.
2. Para Alfa SF (*Tmsms*), EHCEB 20142028 (*Nmsms*), EHCEB 20141028 (*Smsms*), EHCEB 20141027 (*Tmsms*) e EHCEB 20141017 (*Tmsms*) não houve validação da seleção molecular pelos de testes de viabilidade polínica para alguns indivíduos.
3. Os métodos de avaliação da viabilidade polínica não apresentaram concordância de classificação estéril e fértil para os acessos EHCEB 20142028, EHCEB 20141028, EHCEB 20141027 e EHCEB 20141017.
4. Os seis pares de linhas 'A' e 'B' identificados no presente estudo, Alfa SF (*Tmsms*) x Alfa SF (*Nmsms*), BRS 367 (*Tmsms*) x BRS 367 (*Nmsms*), Cascuda T7 (*Nmsms*) x Cascuda T5 (*Smsms*), EHCEB 20142027 (*Nmsms*) x 20141027 (*Tmsms*), EHCEB 20102017 (*Nmsms*) x EHCEB 20141017 (*Tmsms*) e EHCEB 20142028 (*Nmsms*) x EHCEB 20141028 (*Smsms*), apresentam potencial para o desenvolvimento de híbridos.

REFERÊNCIAS

- Abdelgadir HA, Johnson SD and Van Staden J (2012) Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jathropa curcas* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany** **79**: 132-139.
- Alexander MP (1980) A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology** **55**:13-18.
- Auler NMF, Battistin A, Reis MS (2006). Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** **8**: 55-63.
- Barham WS and Munger HM (1950) The stability of male sterility in onions. **Proceedings American Society for Horticultural Science** **56**: 401-409.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus 12**: 13-15.

Engelke T, Terefe D and Tatlioglu TA (2003) PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical and Applied Genetics 107**: 162-167.

Faria MV, Morales RGF, Resende JTV, Zanin DS, Menezes CB and Kobori RF (2012) Desempenho agrônômico e heterose de genótipos de cebola. **Horticultura Brasileira 30**: 220-225.

Gomes PR, Raseira MCB, Garcia A and Silva JB (2000) Germinação *in vitro* do pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Agropecuária Clima Temperado 3**: 193-198.

Havey MJ (2000) Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. **Theoretical and Applied Genetics 101**: 778-782.

Huo YM, Liu BJ, Yang YY, Miao J, Gao LM, Kong SP, Wang ZB, Kitano H and Wu X (2015) 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 204**: 711-722.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017) **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>> Acesso em 05/05/2017.

Karak C and Hazra P (2012) Floral biology of onion construed as an annual crop for seed production. **Vegetable Science 39**: 161-164.

Khar A and Saini N (2016) Limitations of PCR-based markers to identify male-sterile and maintainer plants from indian onion (*Allium cepa* L.) populations. **Plant Breeding 135**: 519-524.

Kim S, Lee ET, Cho DY, Han T, Bang H, Patil BS, Ahn YK and Yoon MK (2009) Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical Applied Genetics 118**: 433-441.

Kim S, Kim CW, Park M and Choi D (2015) Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. **Theoretical and Applied Genetics 128**: 2289-2299.

Lorenzon MCA and Almeida EC (1997) Viabilidade e germinação do pólen de linhagens Genitores de cebola híbrida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 32**: 345-349.

Machado CA, Moura CRF, Lemos EEP, Ramos SRR, Ribeiro FE and Lédo AS (2014) Viabilidade de grãos de pólen de acessos de coqueiro em baixas temperaturas. **Acta Scientiarum. Agronomy 36**: 227-232.

Meer Van Der QP and Van Bennekom JL (1969) Effect of temperature on the occurrence of male sterility in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica 18**: 389-394.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Melgar S and Havey MJ (2010) The dominant *Ms* allele in onion shows reduced penetrance. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **135**: 49-52.

Ockendon DJ and Gates PJ (1976) Reduced pollen viability in the onion (*Allium cepa*). **New Phytologist** **76**: 511-517.

Patil YA, Dalvi VS, Borole VK, Krishna B, Dhake AV, Sane PV and Sane AP (2016) Molecular characterization of CMS lines in short-day white onions. **ISHS Acta Horticulturae** **1143**: 259-268.

Peterson R, Slovin JP and Chen C (2010) A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollens grains. **Plant Biology** **1**: 66-69.

Pike LM (1986) Onion breeding. In Basset MJ (ed.) *Breeding Vegetable Crops*. AVI Publishing Company, Westport, p. 357-394.

Ragassi CF, Oliveira VR, Santos MDM, Boiteux MENF, Boiteux LS and Tosta AL (2010) Identificação de citoplasma macho-estéril em acessos do programa de melhoramento de cebola da Embrapa Hortaliças. In **Congresso Brasileiro de Olericultura**. ABH, Brasília, p. 2612-2615.

Ragassi CF, Santos MDM, Fonseca MEN, Oliveira VR, Buzar AGR, Costa CP and Boiteux LS (2012) Genotipagem de polimorfismos associados com sistemas de macho-esterilidade em acessos de cebola adaptados ao Brasil. **Horticultura Brasileira** **30**: 409-414.

Saini N, Hedau NK, Khar A, Yadav Y, Bhatt JC and Agrawal PK (2015) Successful deployment of marker assisted selection (MAS) for inbred and hybrid development in long-day onion (*Allium cepa* L.). **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** **75**: 93-98.

Santos CAF, Leite DL, Costa ND, Oliveira VR, Santos ICN and Rodrigues MA (2008) Identificação dos citoplasmas “S”, “T” e “N” via PCR em populações de cebola no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira** **26**: 308-311.

Santos CAF, Leite DL, Oliveira VR and Rodrigues MA (2010) Marker-assisted selection of maintainer lines within an onion tropical population. **Scientia Agricola** **67**: 223-227.

Santos CAF and Oliveira VR (2011) Melhoramento genético de cebola no Brasil: avanços e desafios. In **Congresso Brasileiro de Olericultura**. ABH, Brasília, p. 5726-5743.

Santos CAF, Leite DL, Oliveira VR and Costa ND (2012) Identification of maintainer lines and evaluation of experimental hybrids derived from a brazilian tropical onion population. **Acta Horticultural** **935**: 137-141.

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

Schnable PS and Springer NM (2013) Progress toward understanding heterosis in crop plants. **Annual Review of Plant Biology** **64**: 71–88.

FERREIRA, R. R. Identificação Molecular do Locus Restaurador da Macho-Fertilidade (*Ms*), Tipo de Citoplasma e Viabilidade de Pólen em Acessos de Cebola (*Allium cepa* L.)

Tome LGO, Davide LC, Pinto CABP, Alevs AA and Salgado CC (2007) Pollen viability and meiotic analysis of *Solanum commersonii commersonii* Dun., *Solanum commersonii malmeanum* Bitt. and *Solanum tuberosum* L.. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 7**: 387-393.

Vieira LJ, Soares TL, Rossi ML, Alves AAC, Santos FAR and Souza FVD (2012) Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica 26**: 350-356.

Tabela 1. Tipo de citoplasma identificado com o marcador *orf725* e genotipagem do locus restaurador da macho-fertilidade pelo marcador *AcSKP1* em plantas (n) de acesso de cebola com potencial para linhas 'A' e 'B'.

Acesso	Citoplasma			Genotipagem				
	n	N	S	T	n	<i>MsMs</i>	<i>Msms</i>	<i>msms</i>
Alfa SF linha 'A'	12	-	-	12	12	-	-	12
Alfa SF linha 'B'	5	5	-	-	5	-	-	5
BRS 367	9	6	1	2	9	3	2	4
Cascuda T7 ('B')	13	13	-	-	13	7	4	2
Cascuda T5 ('A')	23	-	23	-	23	11	10	2
EHCEB 20142028	13	13	-	-	13	-	-	13
EHCEB 20141028	42	-	42	-	42	-	-	42
EHCEB 20142027	3	3	-	-	3	-	-	3
EHCEB 20141027	14	-	-	14	14	-	-	14
EHCEB 20101017	10	-	-	10	10	-	-	10
EHCEB 20102017	12	12	-	-	12	-	-	12

Tabela 2. Viabilidade polínica de acordo com os métodos da coloração com carmim acético 2% (CCA), solução de Alexander modificada (SAM) e germinação *in vitro* (GIV) de plantas avaliadas (n) *Nmsms*, *Smsms* e *Tmsms* identificadas por marcadores do citoplasma e locus restaurador da macho-esterilidade em acessos de cebola.

Acesso	n	CCA		SAM		GIV	
		Fértil	Estéril	Fértil	Estéril	Fértil	Estéril
Alfa SF (<i>Tmsms</i>)	12	10	2	10	2	10	2
Alfa SF (<i>Nmsms</i>)	5	5	0	5	0	5	0
BRS 367 (<i>Tmsms</i>)	1	0	1	0	1	0	1
BRS 367 (<i>Nmsms</i>)	3	3	0	3	0	3	0
Cascuda T7 (<i>Nmsms</i>)	1	1	0	1	0	1	0
Cascuda T5 (<i>Smsms</i>)	1	0	1	0	1	0	1
EHCEB 20142028 (<i>Nmsms</i>)	13	13	0	13	0	12	1
EHCEB 20141028 (<i>Smsms</i>)	42	7	35	7	35	1	41
EHCEB 20142027 (<i>Nmsms</i>)	3	3	0	3	0	3	0
EHCEB 20141027 (<i>Tmsms</i>)	14	5	9	4	10	2	12
EHCEB 20141017 (<i>Tmsms</i>)	10	2	8	3	7	2	8
EHCEB 20102017 (<i>Nmsms</i>)	12	12	0	12	0	12	0

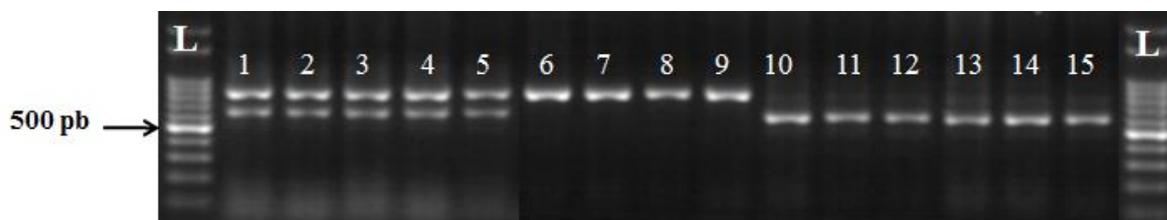


Figura 1. Fragmentos de DNA de 15 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador *orf725*. Alfa SF 'A' (citoplasma 'T', fragmentos com 628 e 833 pb) = colunas 1, 2, 3, 4 e 5. Alfa SF 'B' (citoplasma 'N', fragmentos com 833 pb) = colunas 6, 7, 8 e 9. EHCEB 20142028 (citoplasma 'S', fragmentos com 628 pb) = colunas 10, 11, 12, 13, 14 e 15. L = Ladder 100 pb.

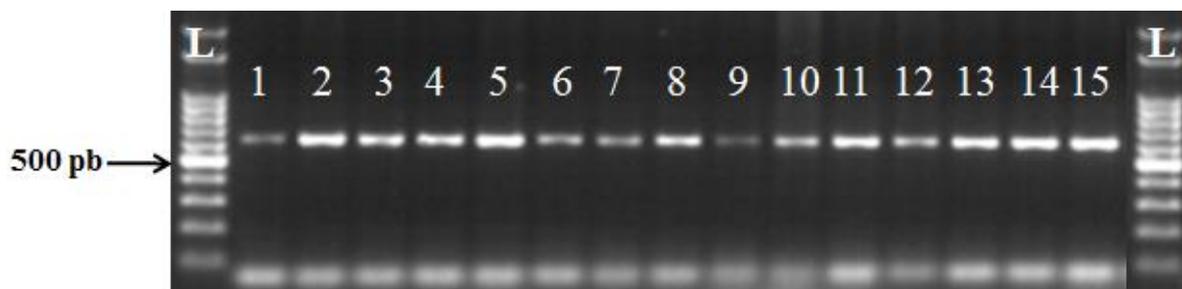


Figura 2. Fragmentos de DNA de 15 amostras de cebola (*Allium cepa* L.), amplificados com os *primers* do marcador *AcSKP1*. EHCEB 20142028 (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. EHCEB 20102017 (homozigoto recessivo, fragmentos com 628 pb) = coluna 11, 12, 13, 14 e 15. L = Ladder 100 pb.

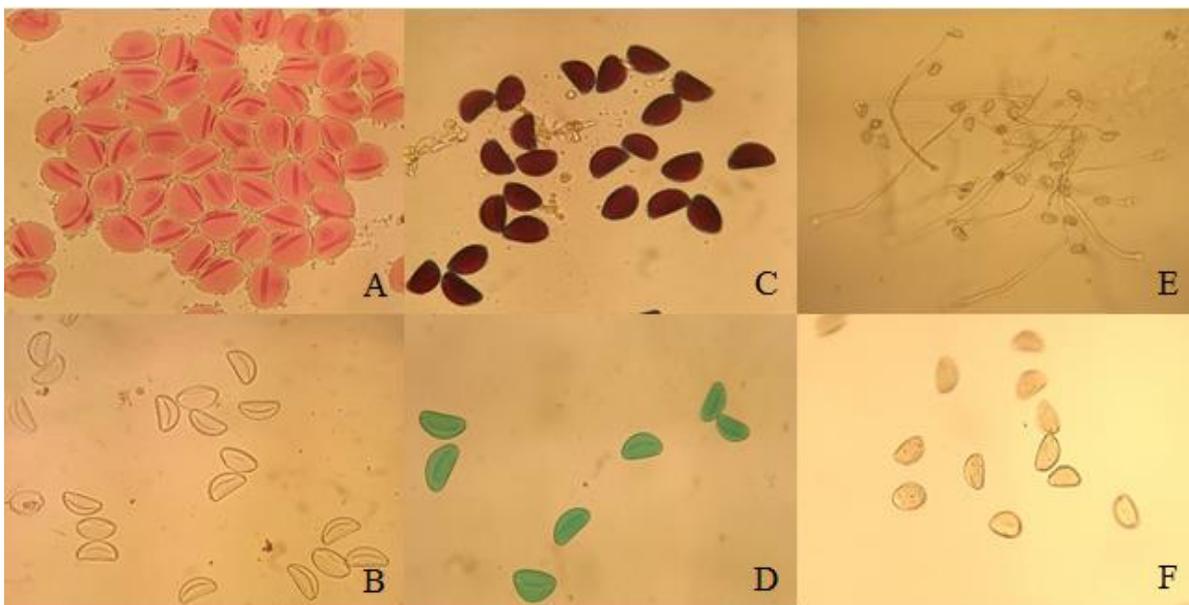


Figura 3. Viabilidade de grãos de pólen de cebola com carmim acético, solução de Alexander e germinação *in vitro* em CMS-S. Carmim acético: (A) pólen viável e (B) pólen inviável; Solução de Alexander: (C) pólen viável e (D) pólen inviável; Germinação *in vitro*: (E) pólen germinado (viável) e (F) pólen não germinado (inviável).

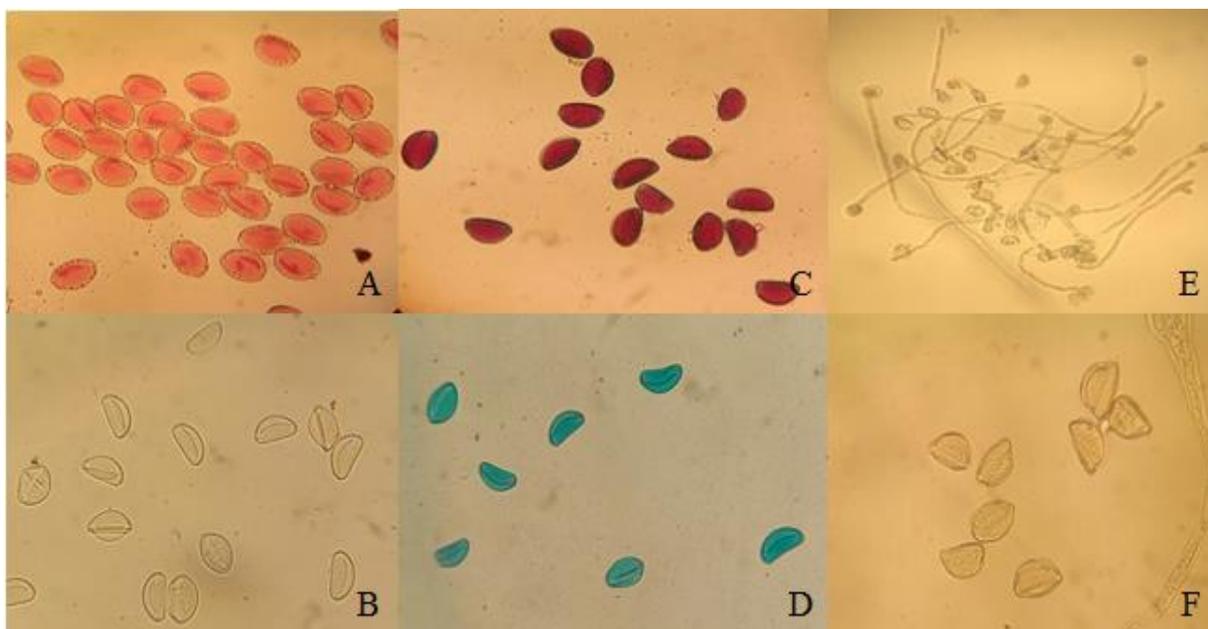
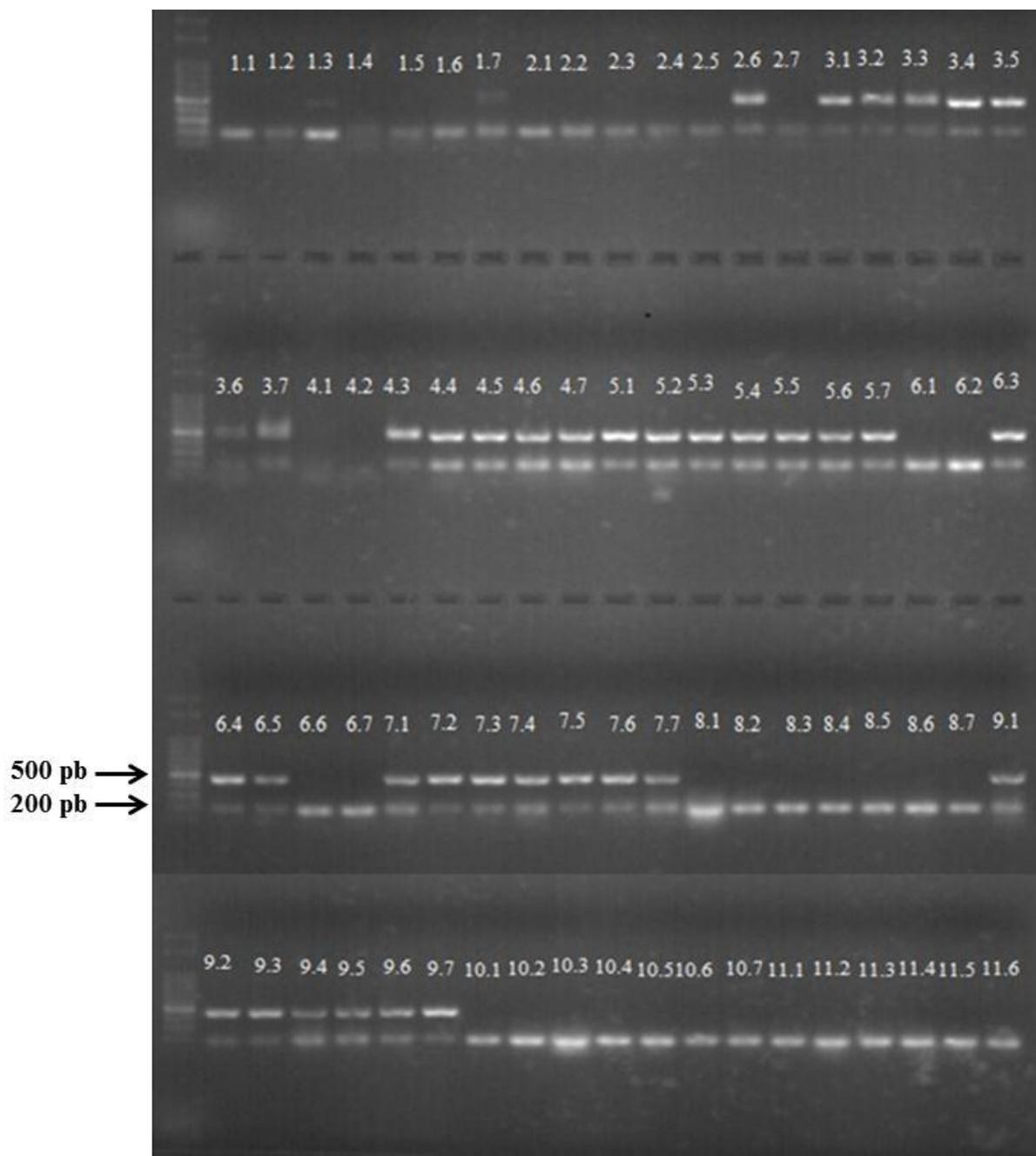


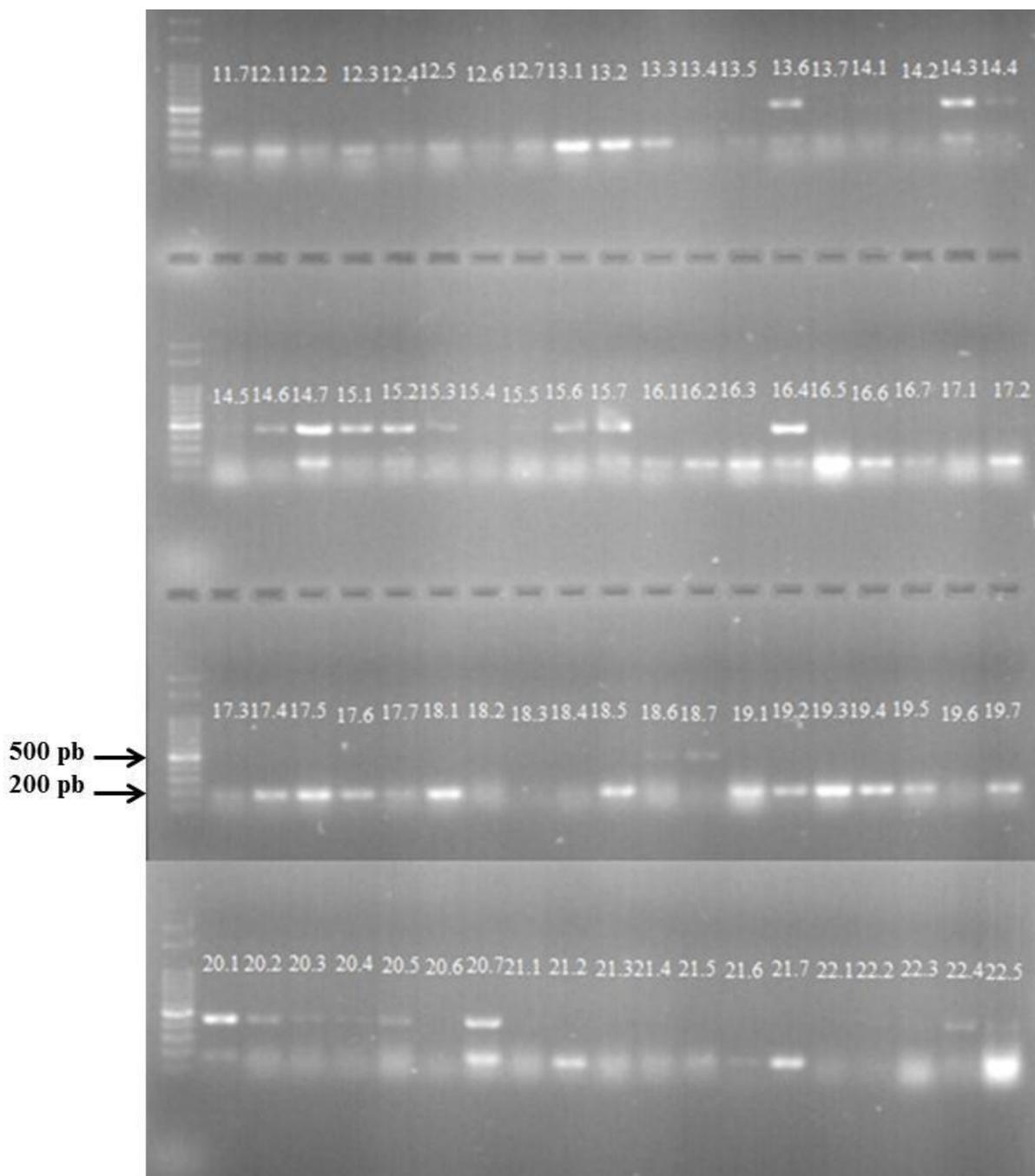
Figura 4. Viabilidade de grãos de pólen de cebola com carmim acético, solução de Alexander e germinação *in vitro* em CMS-T. Carmim acético: (A) pólen viável e (B) pólen inviável; Solução de Alexander: (C) pólen viável e (D) pólen inviável; Germinação *in vitro*: (E) pólen germinado (viável) e (F) pólen não germinado (inviável)

ANEXOS

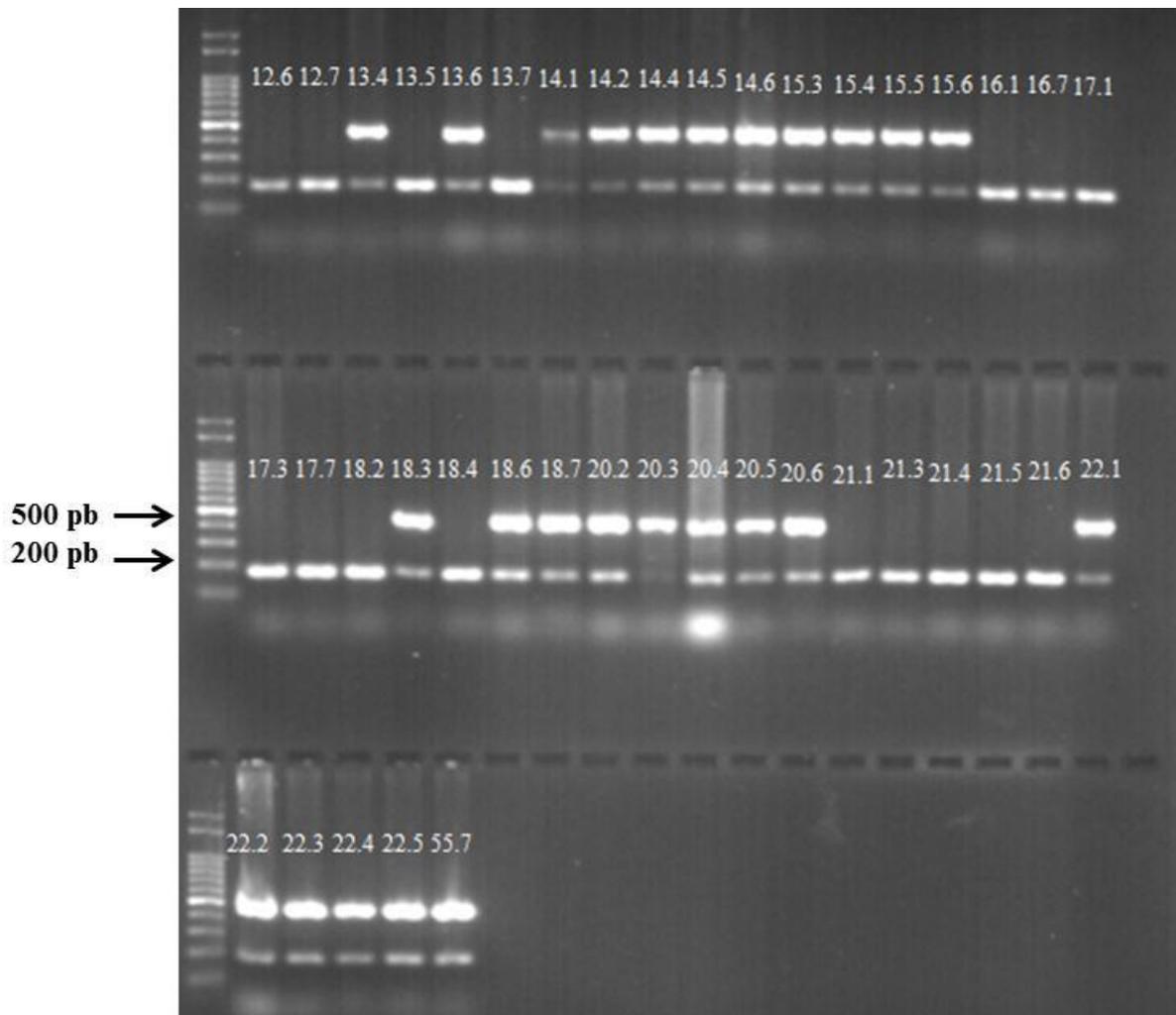
Anexo I – A. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 1.1 a 1.7=Serrana, 2.1 a 2.7 = Regia, 3.1 a 3.7= EHCEB 201525, 4.1 a 4.7= EHCEB 20151, 5.1 a 5.7=Optima F1, 6.1 a 6.7= EHCEB 20146, 7.1 a 7.7=EHCEB 201426, 8.1 a 8.7=Crioula Mercosul, 9.1 a 9.7=Sirius F1; 10.1 a 10.7=Primavera, 11.1 a 11.6= EHCEB 20142. Ladder 100 pb Ludwig.



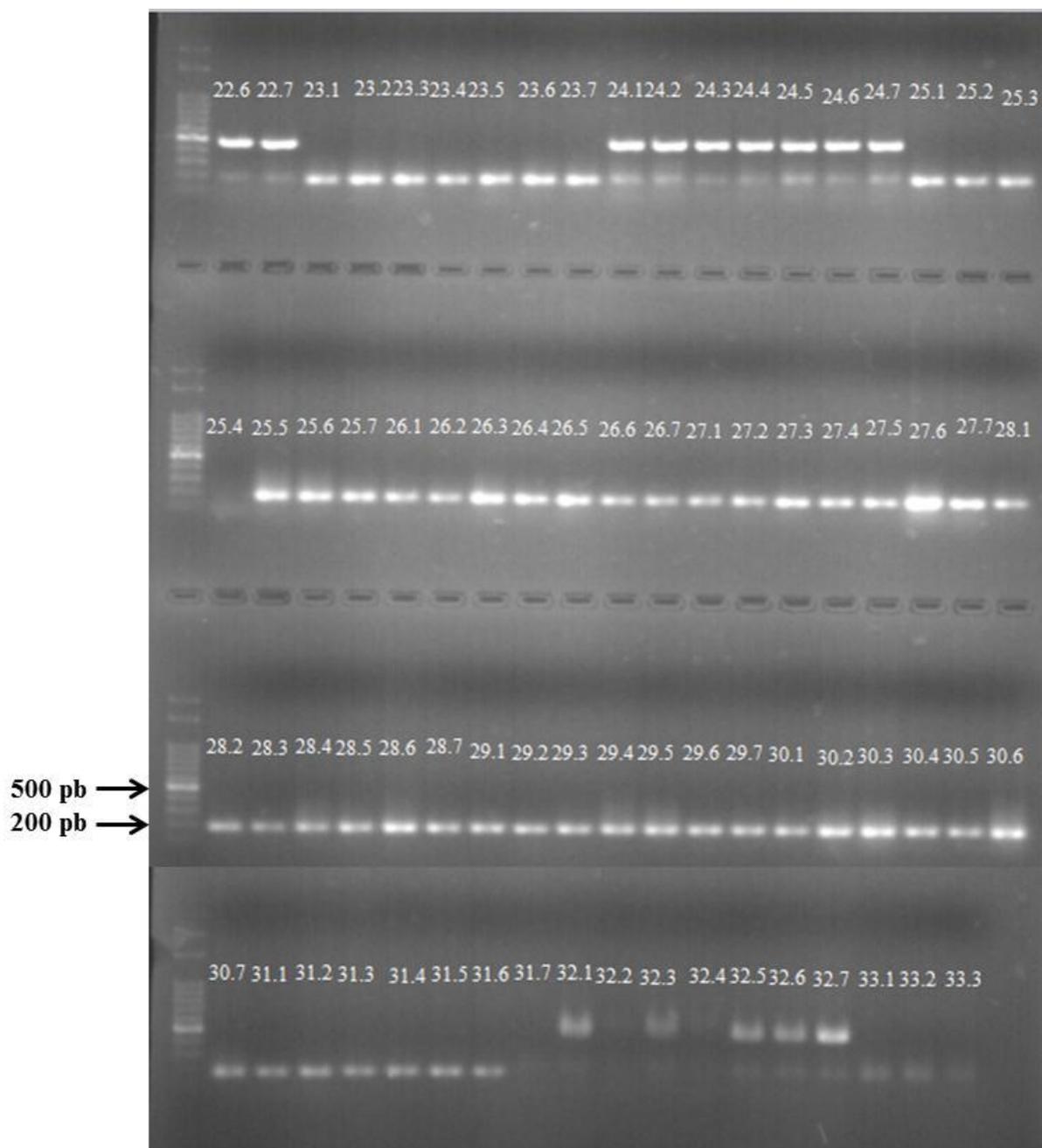
Anexo I – B. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 11.7=EHCEB 20142, 12.1 a 12.7=Bola Precoce, 13.1 a 13.7=EHCEB 201427, 14.1 a 14.7=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.1 a 15.7=F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 16.1 a 16.7=EHCEB 201124, 17.1 a 17.7=EHCEB 201513, 18.1 a 18.7=EHCEB 201423, 19.1 a 19.7=EHCEB 20142038, 20.1 a 20.7=EHCEB 20141038, 21.1 a 21.7=EHCEB 20112036, 22.1 a 22.5=EHCEB 20111036. Ladder 100 pb Ludwig.



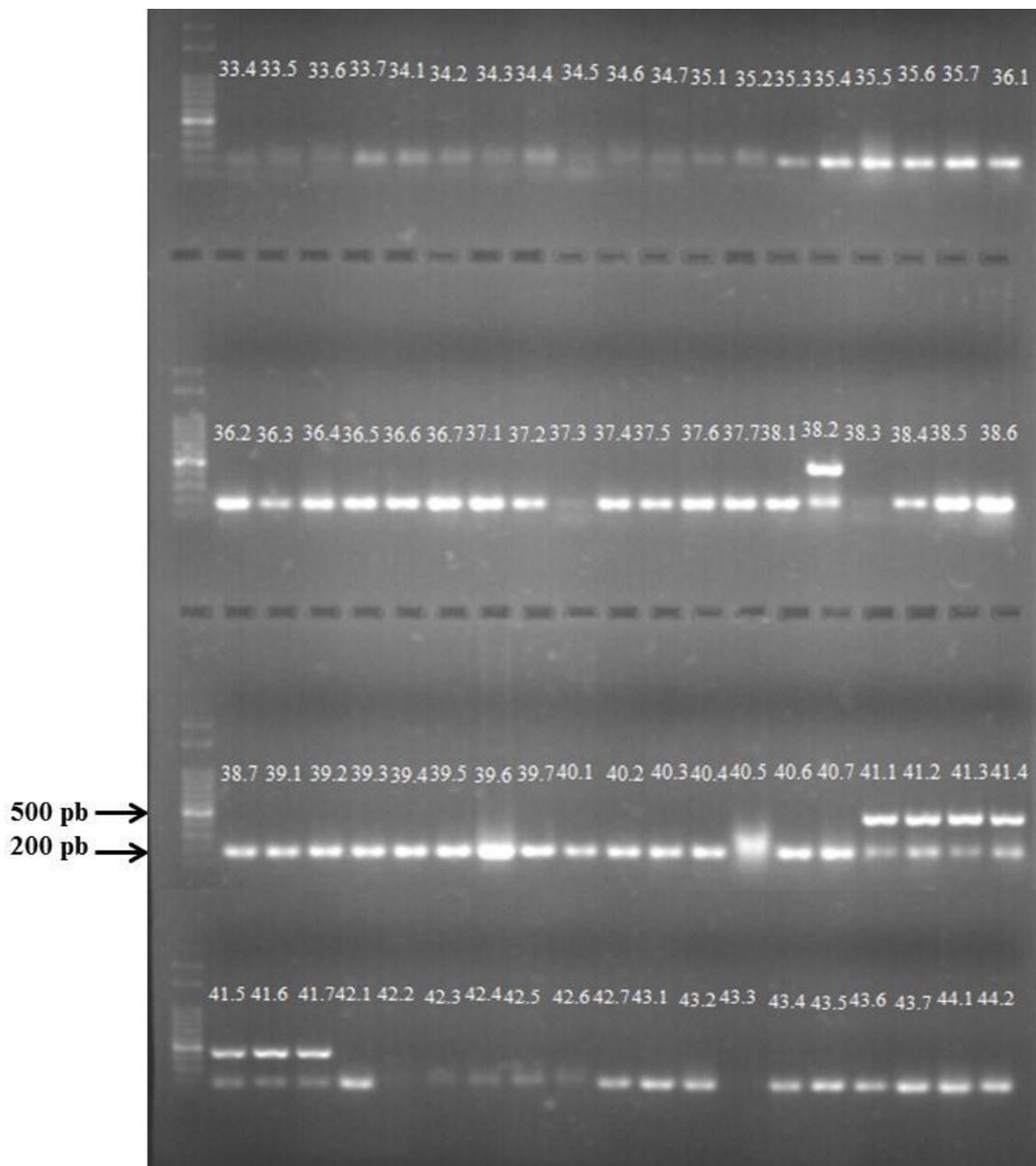
Anexo I – C. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 12.6 a 12.7=Bola Precoce, 13.4 a 13.7=EHCEB 201427, 14.1 a 14.6=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.3 a 15.6 =F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 16.1 e 16.7=EHCEB 201124, 17.1, 17.3 e 17.7=EHCEB 201513, 18.2 a 18.4 e 18.6 a 18.7=EHCEB 201423, 20.2 a 20.6=EHCEB 20141038, 21.1 a 21.6=EHCEB 20112036, 22.1 a 22.5=EHCEB 20111036; 55.7=IPA 12. Ladder 100 pb Ludwig.



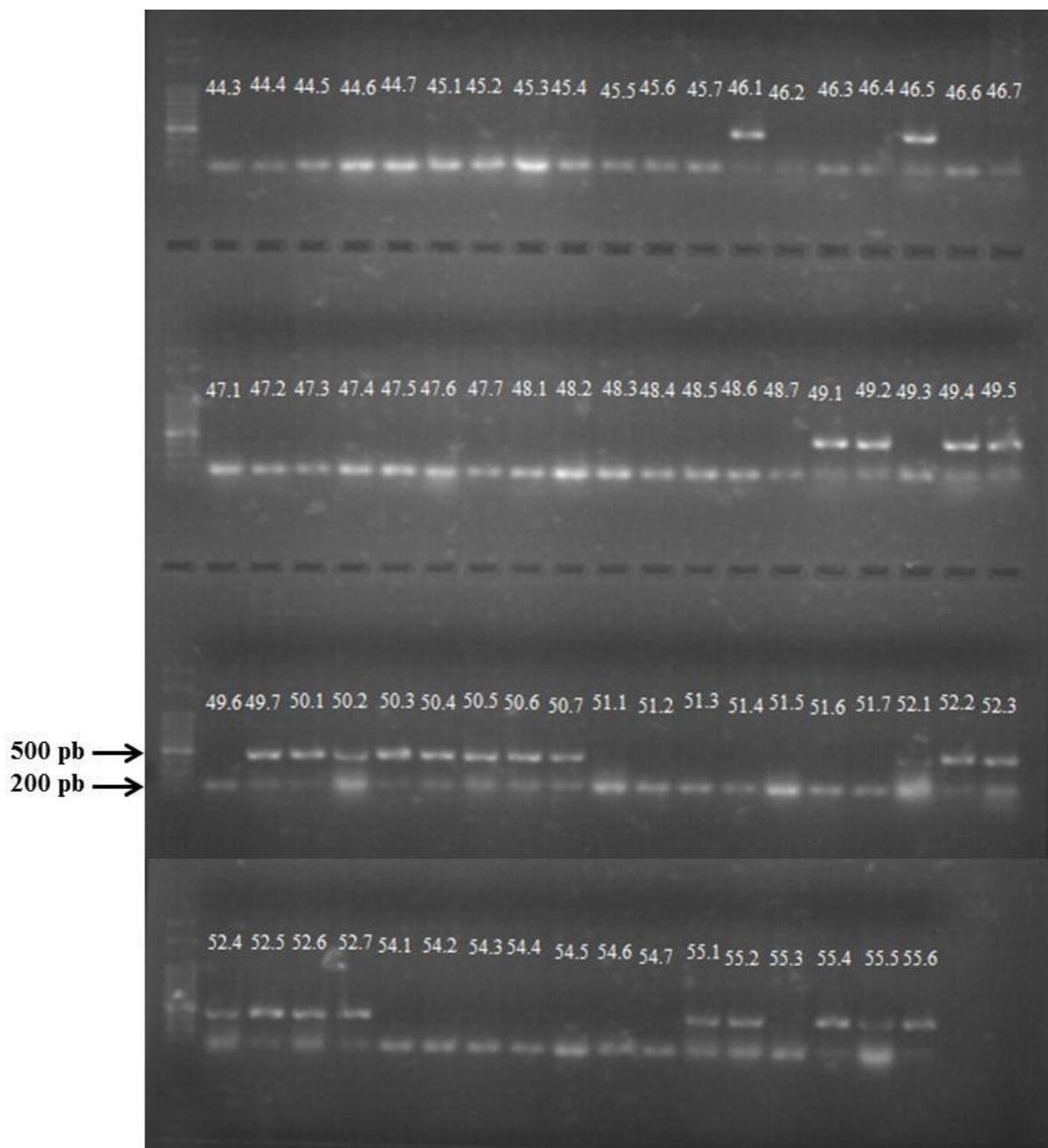
Anexo I – D. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 22.6 a 22.7=EHCEB 20111036, 23.1 a 23.7=EHCEB 20142040, 24.1 a 24.7=EHCEB 20141040, 25.1 a 25.7=EHCEB 20142027, 26.1 a 26.7=EHCEB 20141027, 27.1 a 27.7=EHCEB 2014 2028, 28.1 a 28.7=EHCEB 20141008, 29.1 a 29.7=EHCEB 20101003, 30.1 a 30.7=EHCEB 20101019, 31.1 a 31.7=EHCEB 20101017, 32.1 a 32.7=EHCEB 20111006, 33.1 a 33.3=EHCEB 20112006. Ladder 100 pb Ludwig.



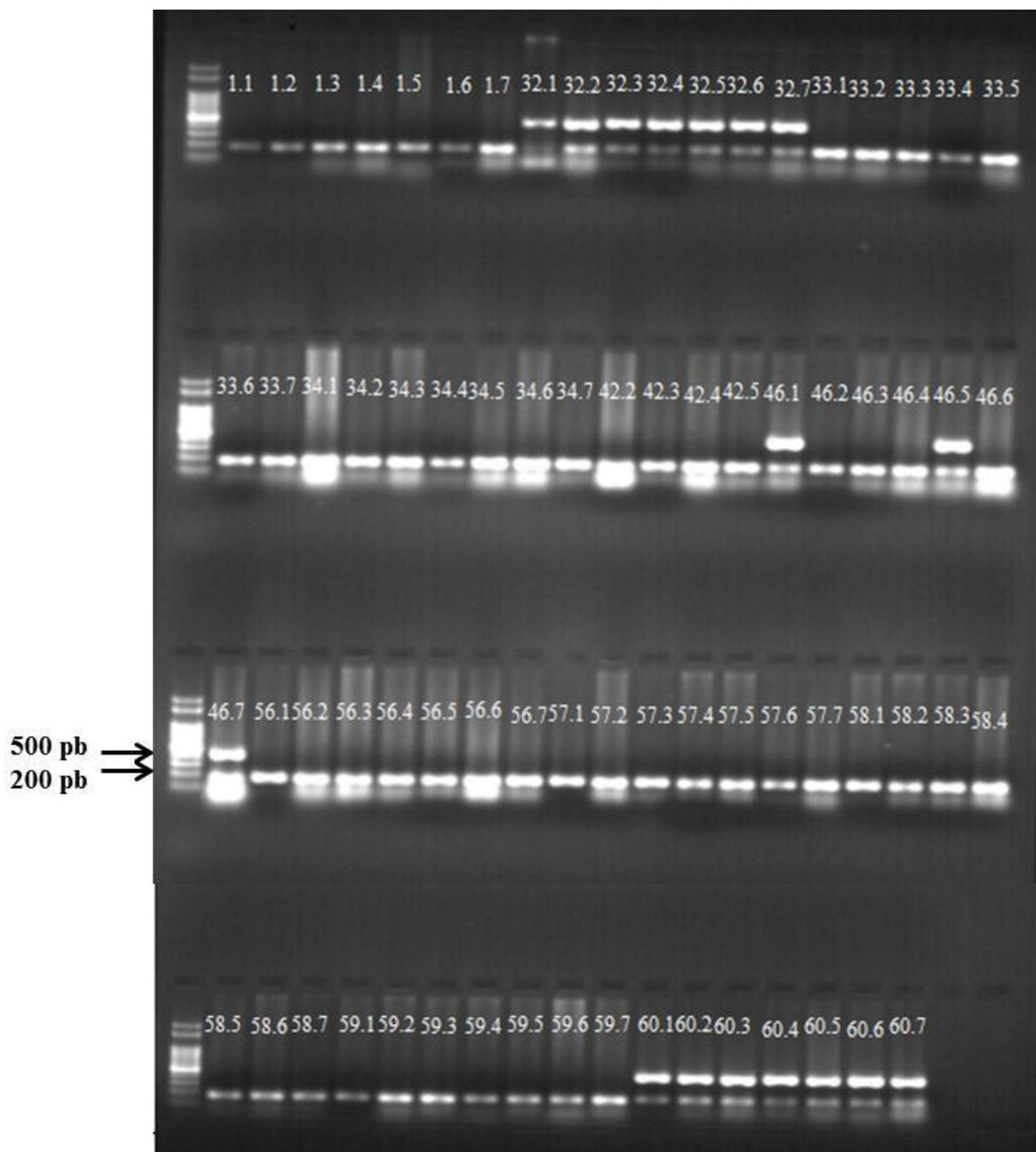
Anexo I – E. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 33.4 a 33.7=EHCEB 20112006, 34.1 a 34.7=EHCEB 20122003, 35.1 a 35.7=EHCEB 20102019, 36.1 a 36.7=EHCEB 20142008, 37.1 a 37.7=EHCEB 20102017, 38.1 a 38.7=Alvorada, 39.1 a 39.7=Roxa do Barreiro, 40.1 a 40.7 – Conquista, 41.1 a 41.7=Imperatriz, 42.1 a 42.7=São Paulo, 43.1 a 43.7=BRS 367 (Riva), 44.1 a 44.2=Rainha. Ladder 100 pb Ludwig.



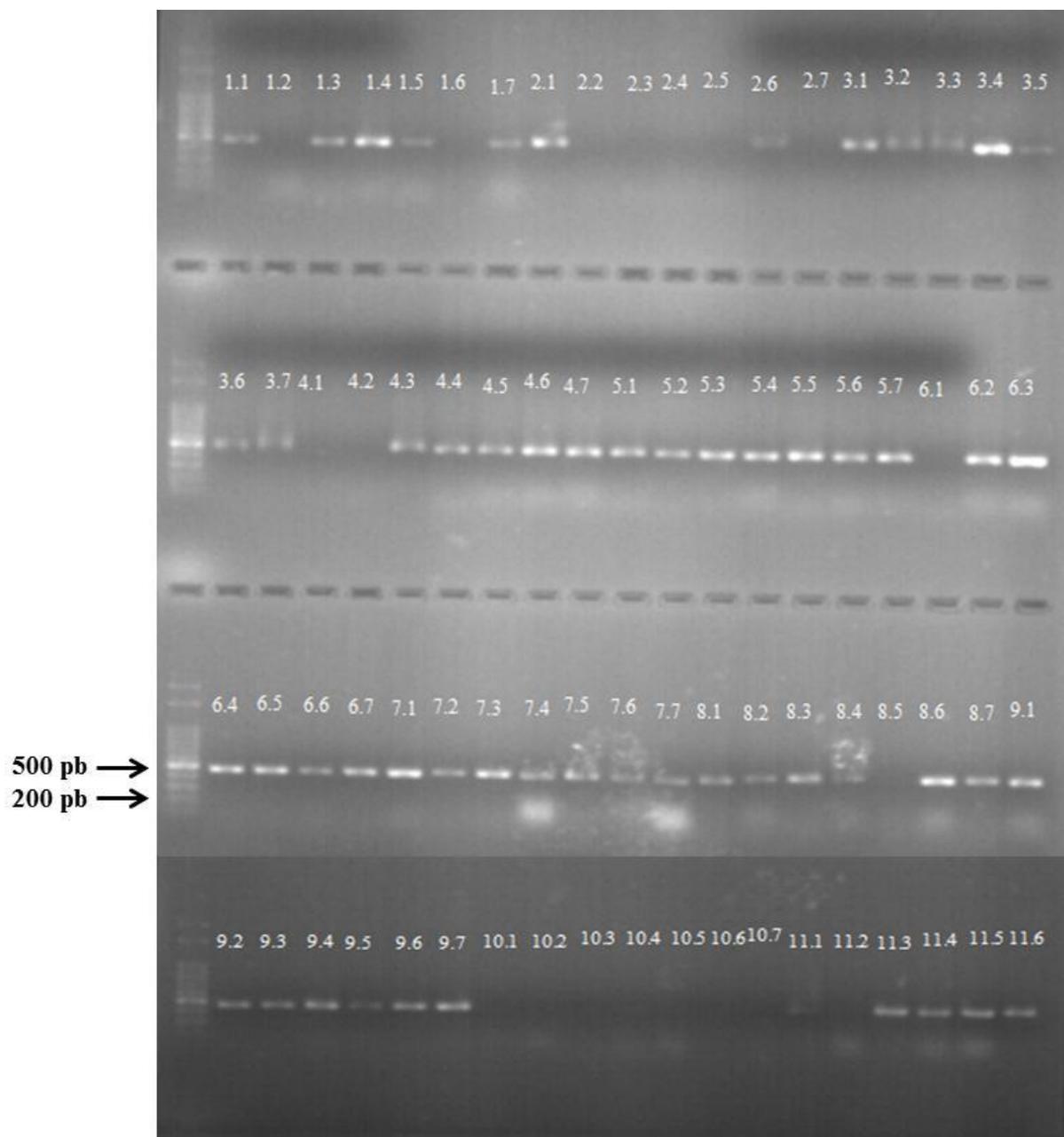
Anexo I – F. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 44.3 a 44.7=Rainha, 45.1 a 45.7=Juporanga, 46.1 a 46.7=Cascuda T8; 47.1 a 47.7=Cascuda T7, 48.1 a 48.7=Cascuda T6, 49.1 a 49.7=Cascuda T5, 50.1 a 50.7=Cascuda T4, 51.1 a 51.7=Cascuda T3, 52.1 a 52.7=Cascuda T2, 54.1 a 54.7=Alfa SF C-XI, 55.1 a 55.6=IPA 12. Ladder 100 pb Ludwig.



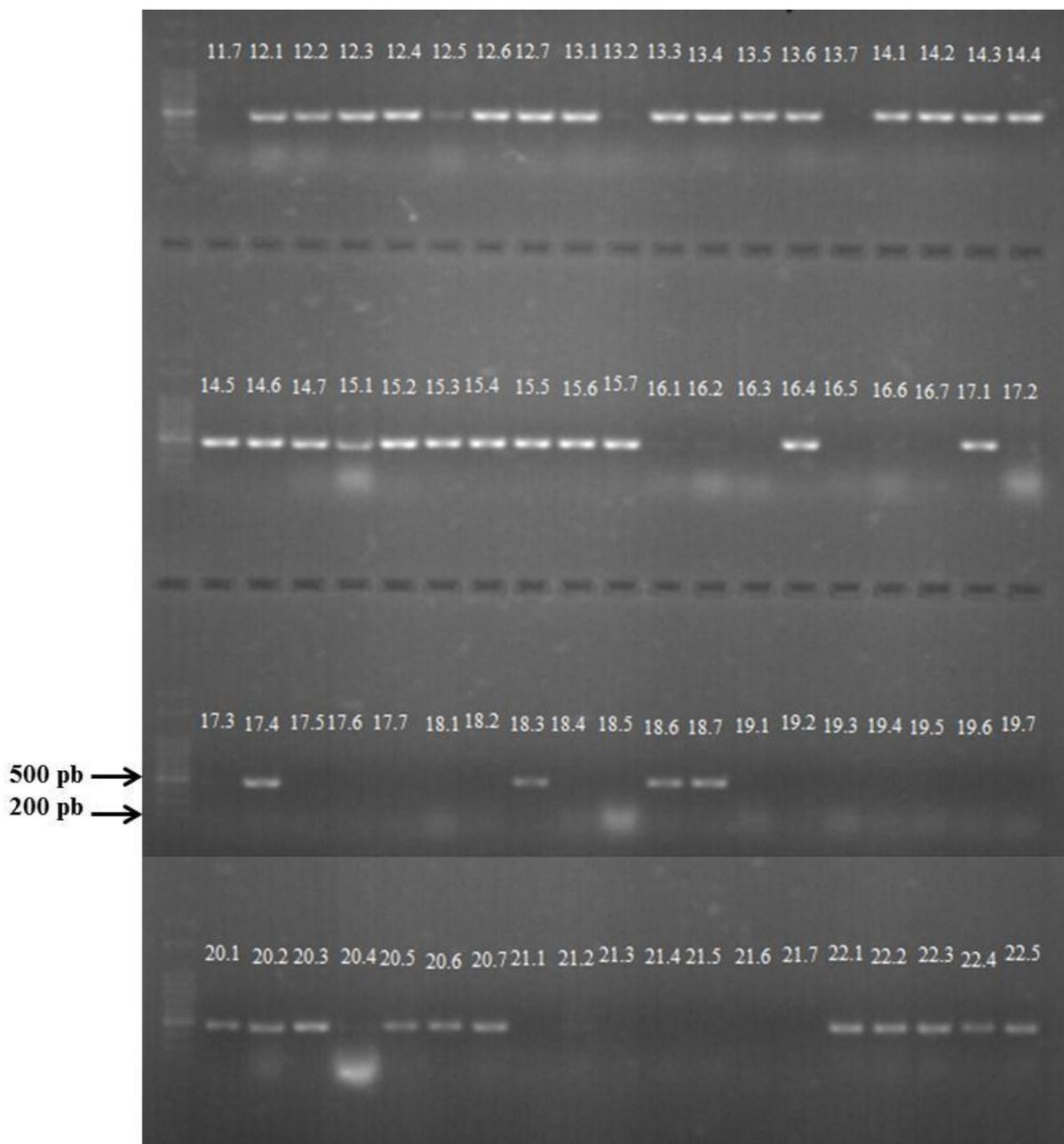
Anexo I – G. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador 5'cob: 1.1 a 1.7=Serrana, 32.1 a 32.7=EHCEB 20111006, 33.1 a 33.7=EHCEB 20112006, 34.1 a 34.7=EHCEB 20122003, 42.2 a 42.5=São Paulo, 46.1 a 46.7=Cascuda T8, 56.1 a 56.7=IPA 11, 57.1 a 57.7=IPA 10; 58.1 a 58.7=Alfa SF 'A', 59.1 a 59.7=Alfa SF 'B', 60.1 a 60.7=EHCEB 20141028. Ladder 100 pb Ludwig.



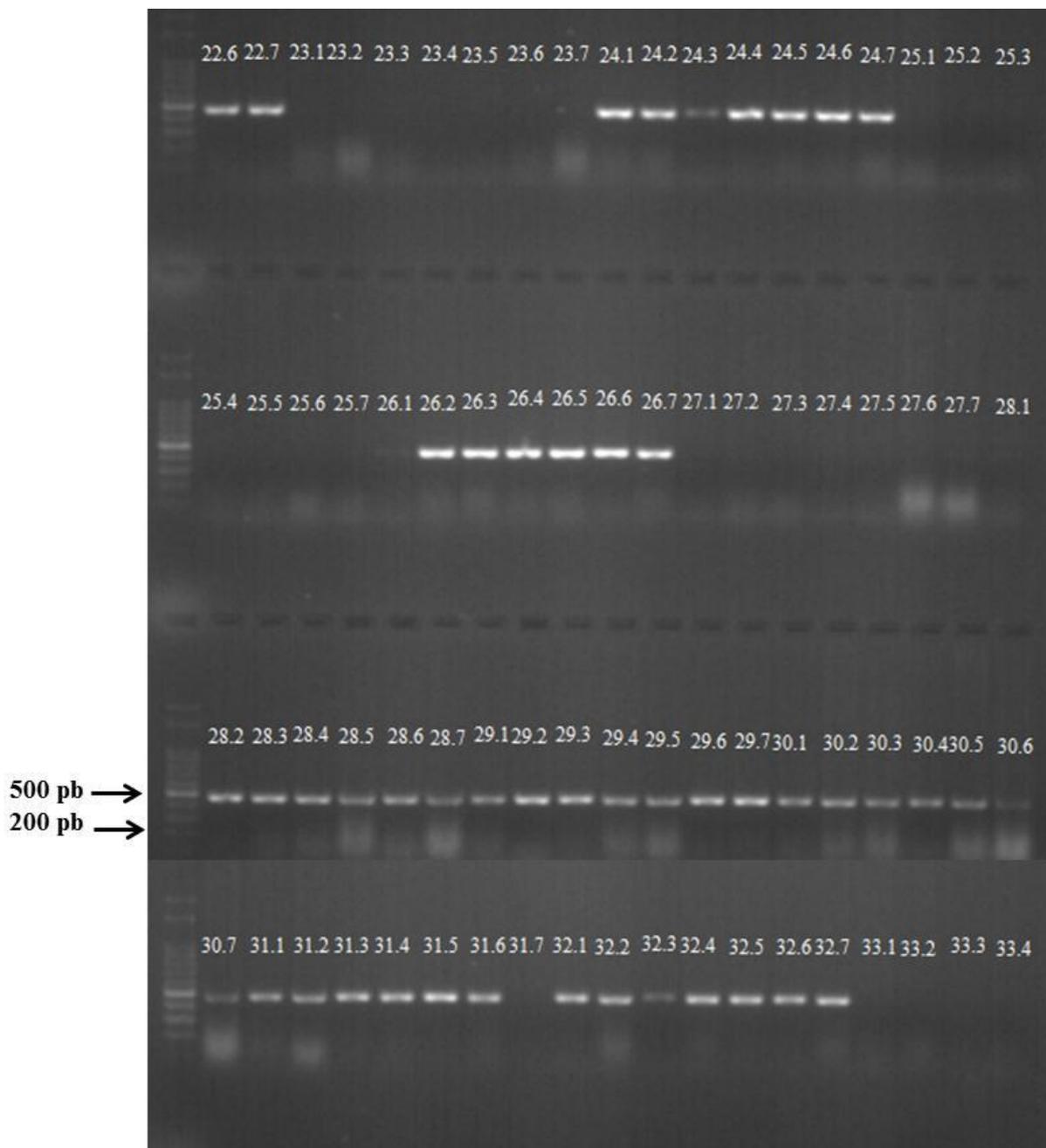
Anexo II – A. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orfA501*: 1.1 a 1.7=Serrana, 2.1 a 2.7 = Regia, 3.1 a 3.7= EHCEB 201525, 4.1 a 4.7= EHCEB 20151, 5.1 a 5.7=Optima F1, 6.1 a6.7= EHCEB 20146, 7.1 a 7.7=EHCEB 201426, 8.1 a 8.7=Crioula Mercosul, 9.1 a 9.7=Sirius F1; 10.1 a 10.7=Primavera, 11.1 a 11.6= EHCEB 20142. Ladder 100 pb Ludwig.



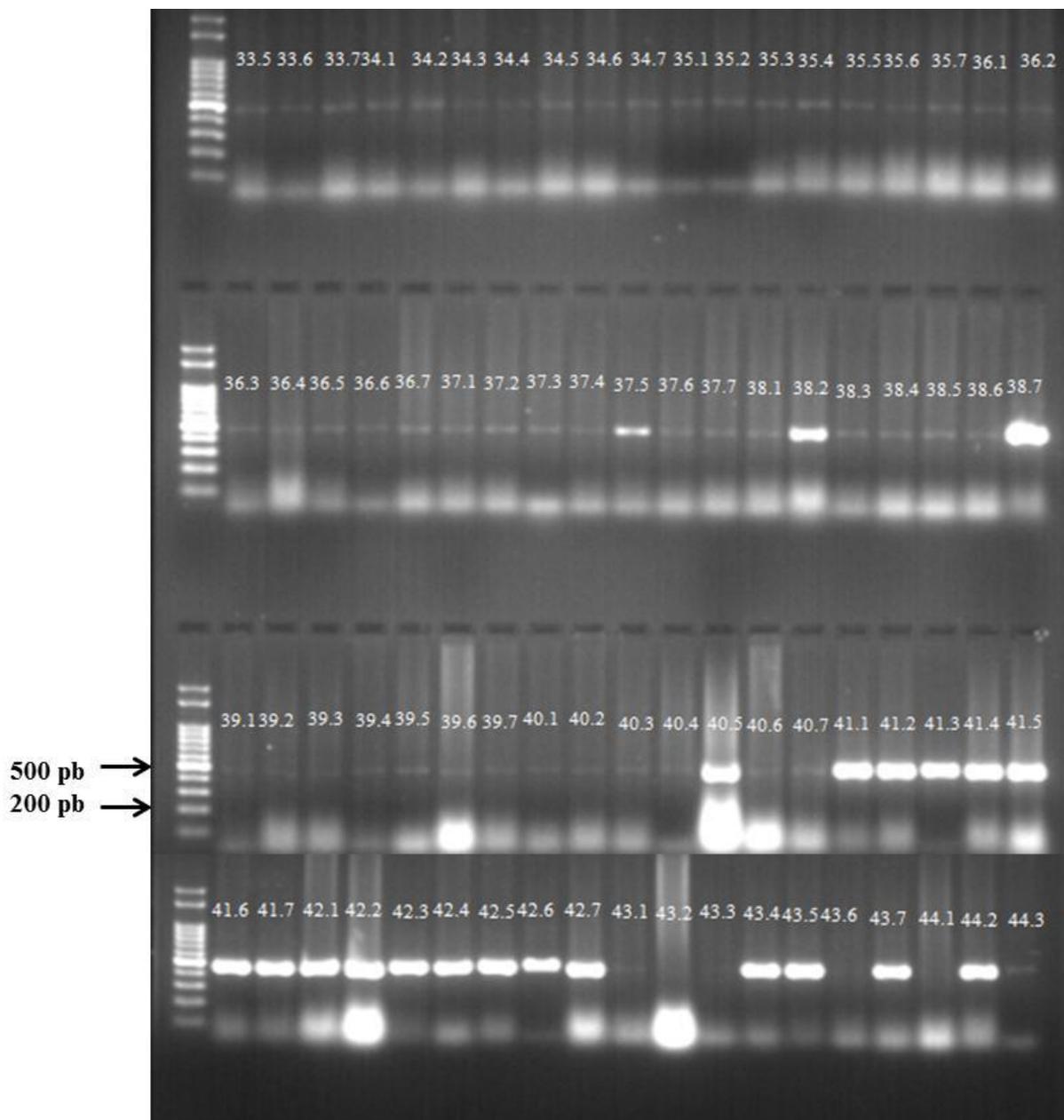
Anexo II – B. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orfA501*: 11.7=EHCEB 20142, 12.1 a 12.7=Bola Precoce, 13.1 a 13.7=EHCEB 201427, 14.1 a 14.7=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.1 a 15.7=F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 16.1 a 16.7=EHCEB 201124, 17.1 a 17.7=EHCEB 201513, 18.1 a 18.7=EHCEB 201423, 19.1 a 19.7=EHCEB 20142038, 20.1 a 20.7=EHCEB 20141038, 21.1 a 21.7=EHCEB 20112036, 22.1 a 22.5=EHCEB 20111036. Ladder 100 pb Ludwig.



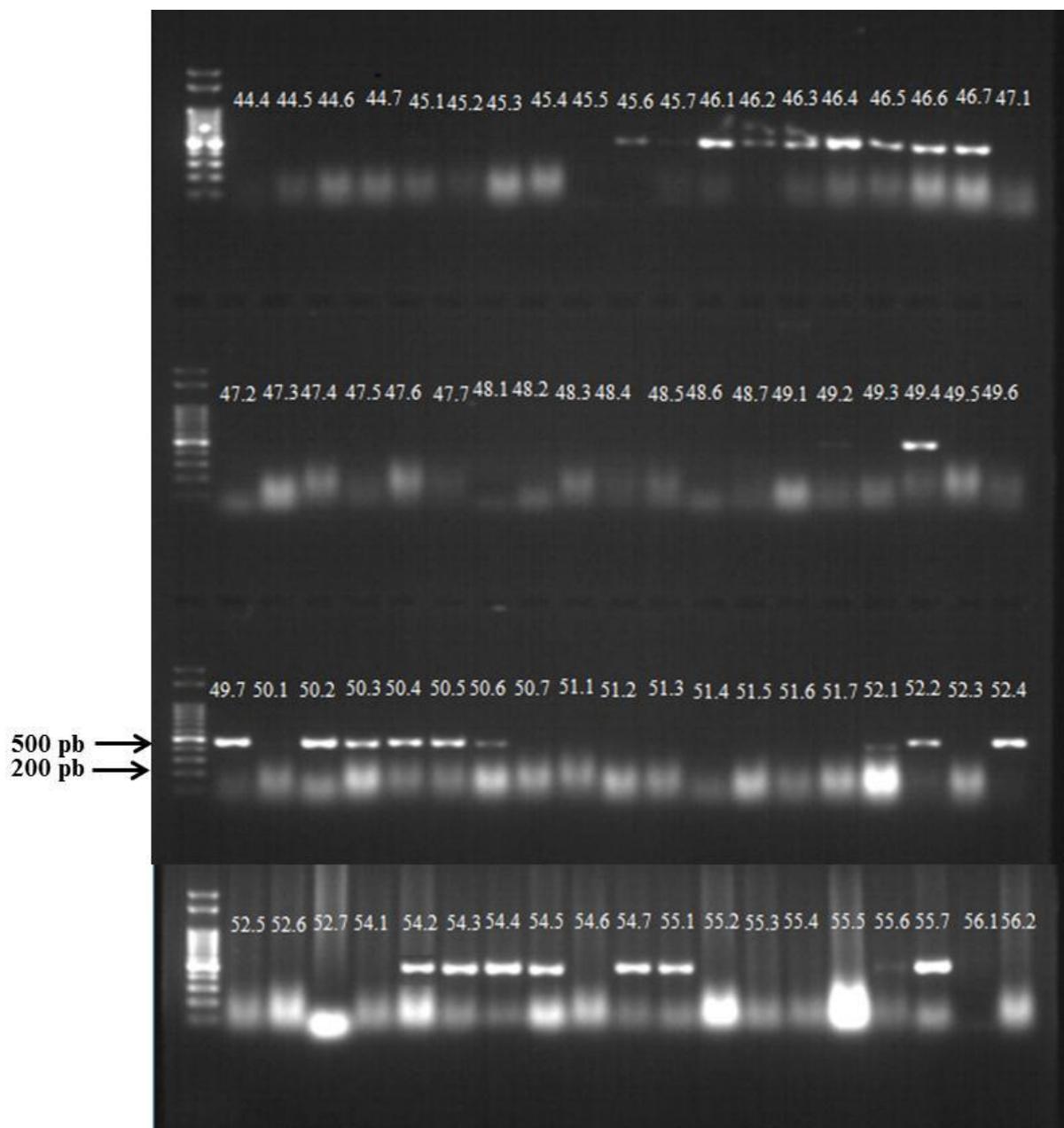
Anexo II – C. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orfA501*: 22.6 a 22.7=EHCEB 20111036, 23.1 a 23.7=EHCEB 20142040, 24.1 a 24.7=EHCEB 20141040, 25.1 a 25.7=EHCEB 20142027, 26.1 a 26.7=EHCEB 20141027, 27.1 a 27.7=EHCEB 2014 2028, 28.1 a 28.7=EHCEB 20141008, 29.1 a 29.7=EHCEB 20101003, 30.1 a 30.7=EHCEB 20101019, 31.1 a 31.7=EHCEB 20101017, 32.1 a 32.7=EHCEB 20111006, 33.1 a 33.4=EHCEB 20112006. Ladder 100 pb Ludwig.



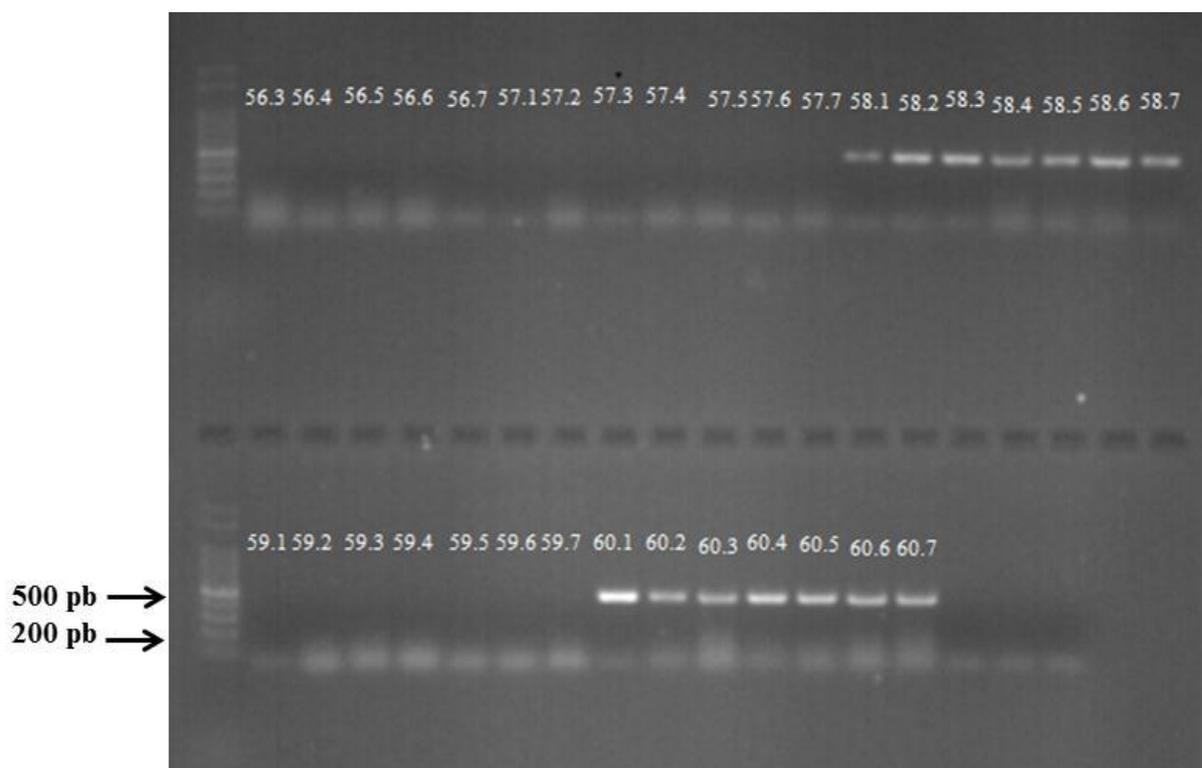
Anexo II – D. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orfA501*: 33.5 a 33.7=EHCEB 20112006, 34.1 a 34.7=EHCEB 20122003, 35.1 a 35.7=EHCEB 20102019, 36.1 a 36.7=EHCEB 20142008, 37.1 a 37.7=EHCEB 20102017, 38.1 a 38.7=Alvorada, 39.1 a 39.7=Roxa do Barreiro, 40.1 a 40.7 – Conquista, 41.1 a 41.7=Imperatriz, 42.1 a 42.7=São Paulo, 43.1 a 43.7=BRS 367 (Riva), 44.1 a 44.3=Rainha. Ladder 100 pb Ludwig.



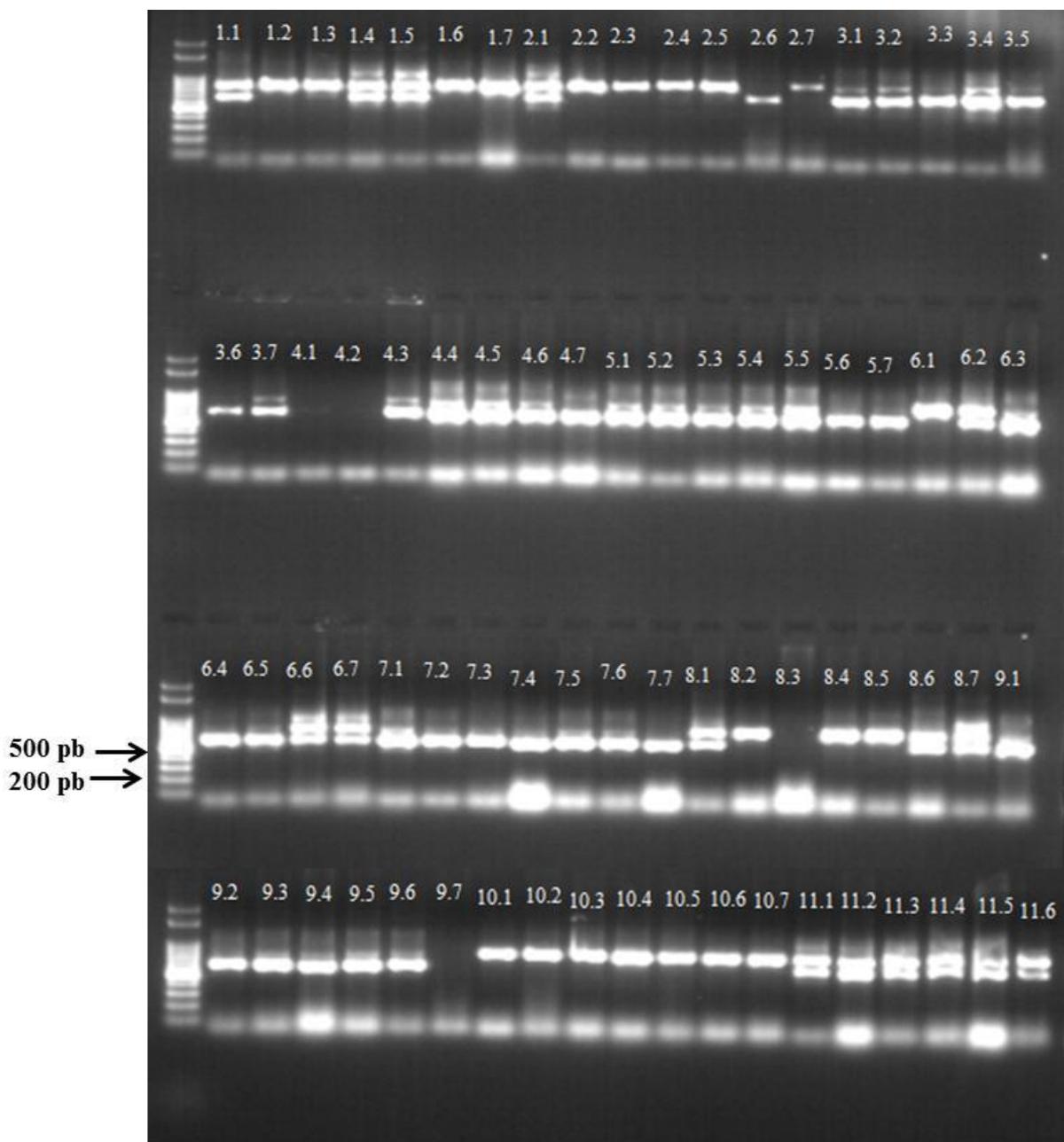
Anexo II – E. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orfA501*: 44.4 a 44.7=Rainha, 45.1 a 45.7=Juporanga, 46.1 a 46.7=Cascuda T8; 47.1 a 47.7=Cascuda T7, 48.1 a 48.7=Cascuda T6, 49.1 a 49.7=Cascuda T5, 50.1 a 50.7=Cascuda T4, 51.1 a 51.7=Cascuda T3, 52.1 a 52.7=Cascuda T2, 54.1 a 54.7=Alfa SF C-XI, 55.1 a 55.7=IPA 12, 56.1 a 56.2=IPA 11. Ladder 100 pb Ludwig.



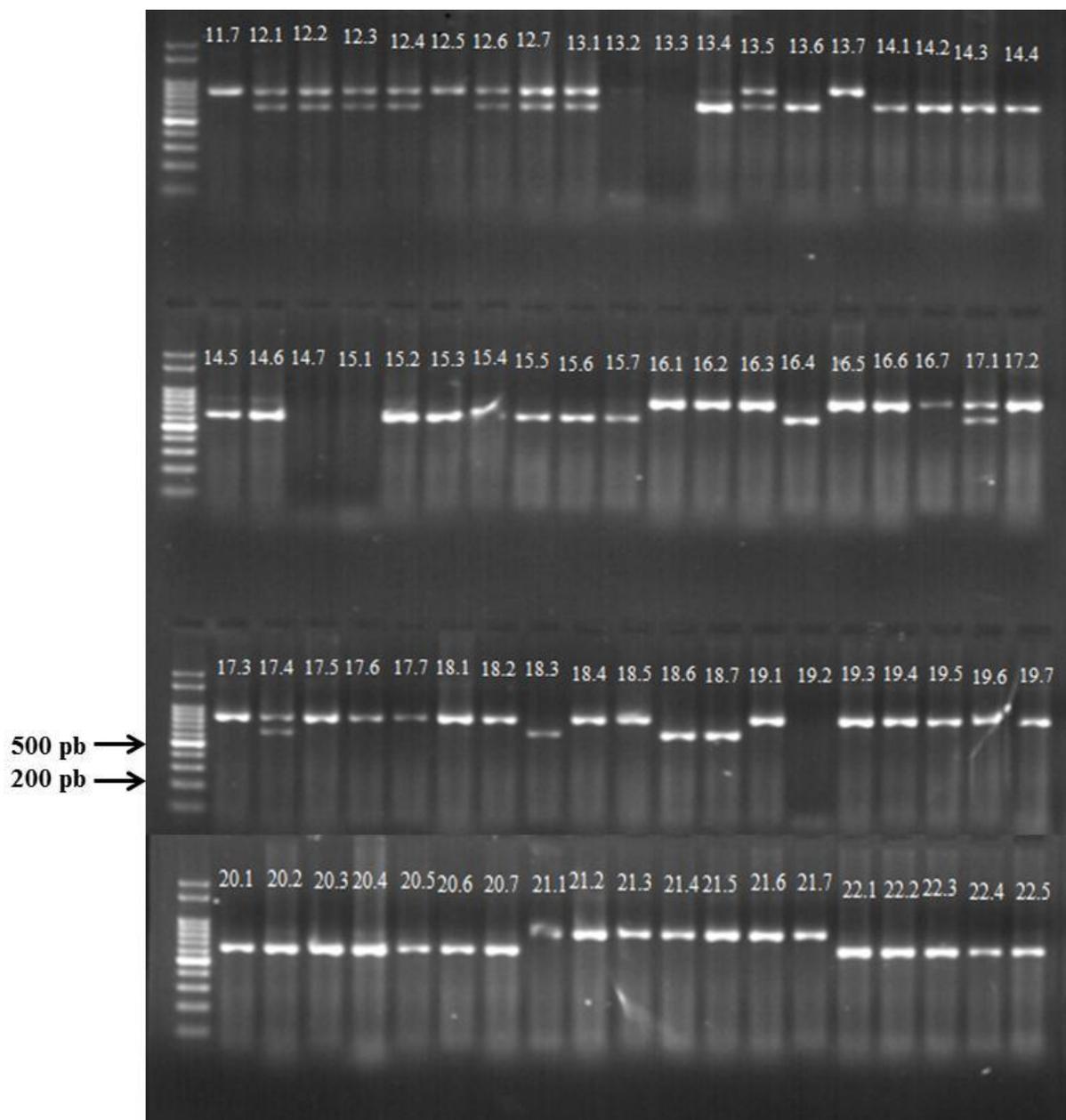
Anexo II – F. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orfA501*: 56.3 a 56.7=IPA 11, 57.1 a 57.7=IPA 10; 58.1 a 58.7=Alfa SF 'A', 59.1 a 59.7=Alfa SF 'B', 60.1 a 60.7=EHCEB 20141028. Ladder 100 pb Ludwig.



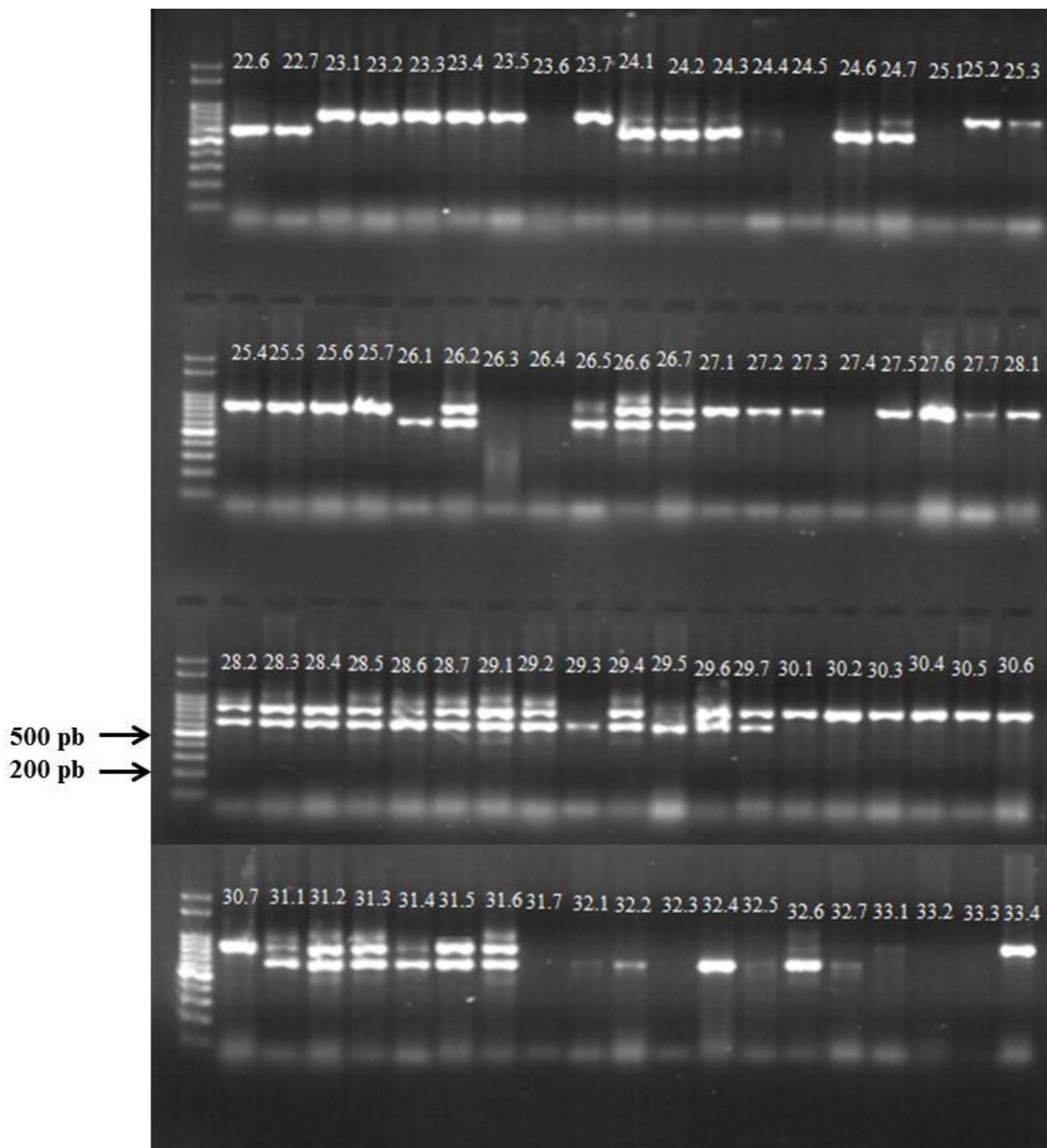
Anexo III – A. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 1.1 a 1.7=Serrana, 2.1 a 2.7 = Regia, 3.1 a 3.7= EHCEB 201525, 4.1 a 4.7= EHCEB 20151, 5.1 a 5.7=Optima F1, 6.1 a 6.7= EHCEB 20146, 7.1 a 7.7=EHCEB 201426, 8.1 a 8.7=Crioula Mercosul, 9.1 a 9.7=Sirius F1; 10.1 a 10.7=Primavera, 11.1 a 11.6= EHCEB 20142. Ladder 100 pb Ludwig



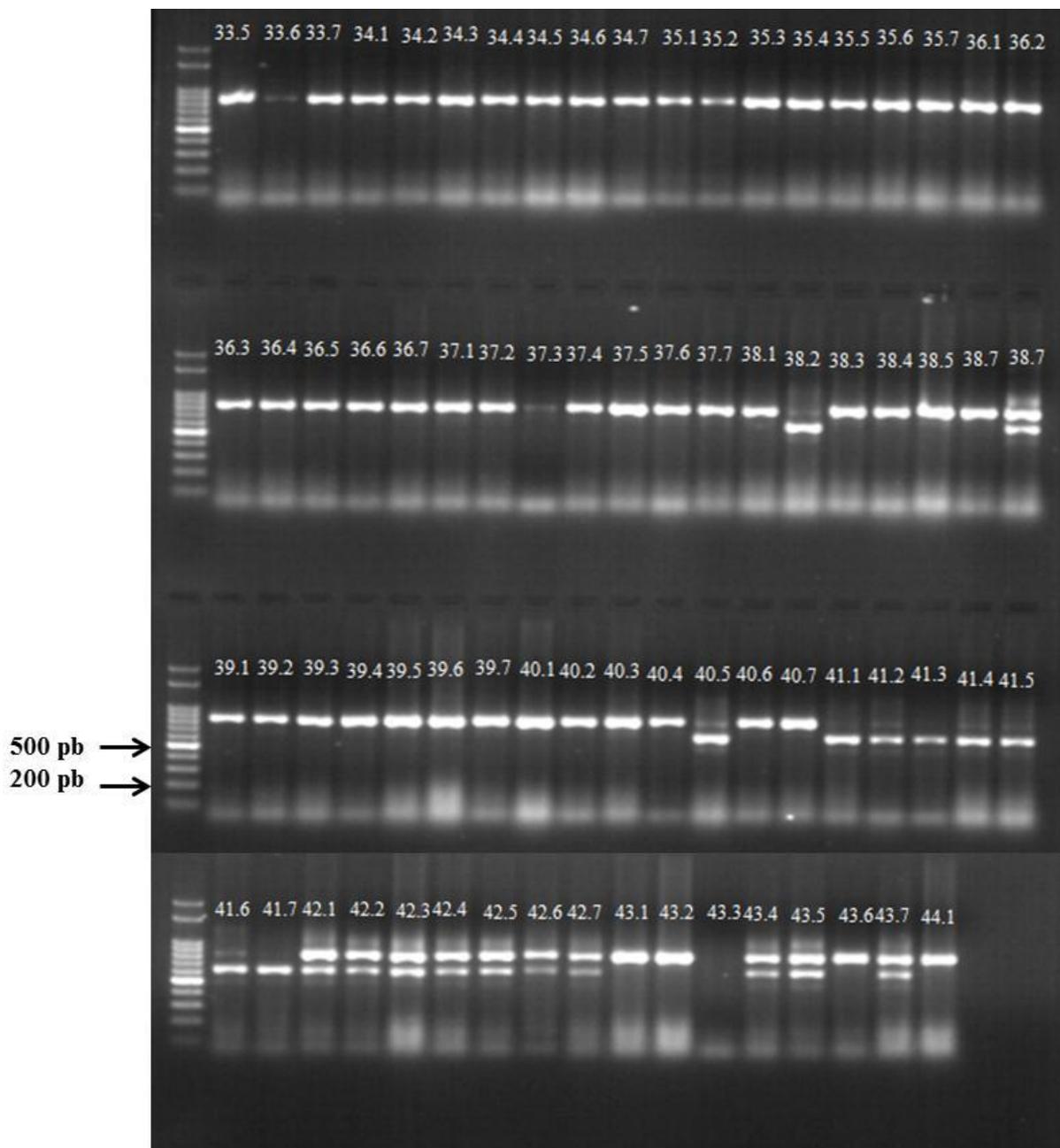
Anexo III – B. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 11.7=EHCEB 20142, 12.1 a 12.7=Bola Precoce, 13.1 a 13.7=EHCEB 201427, 14.1 a 14.7=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.1 a 15.7=F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 16.1 a 16.7=EHCEB 201124, 17.1 a 17.7=EHCEB 201513, 18.1 a 18.7=EHCEB 201423, 19.1 a 19.7=EHCEB 20142038, 20.1 a 20.7=EHCEB 20141038, 21.1 a 21.7=EHCEB 20112036, 22.1 a 22.5=EHCEB 20111036. Ladder 100 pb Ludwig.



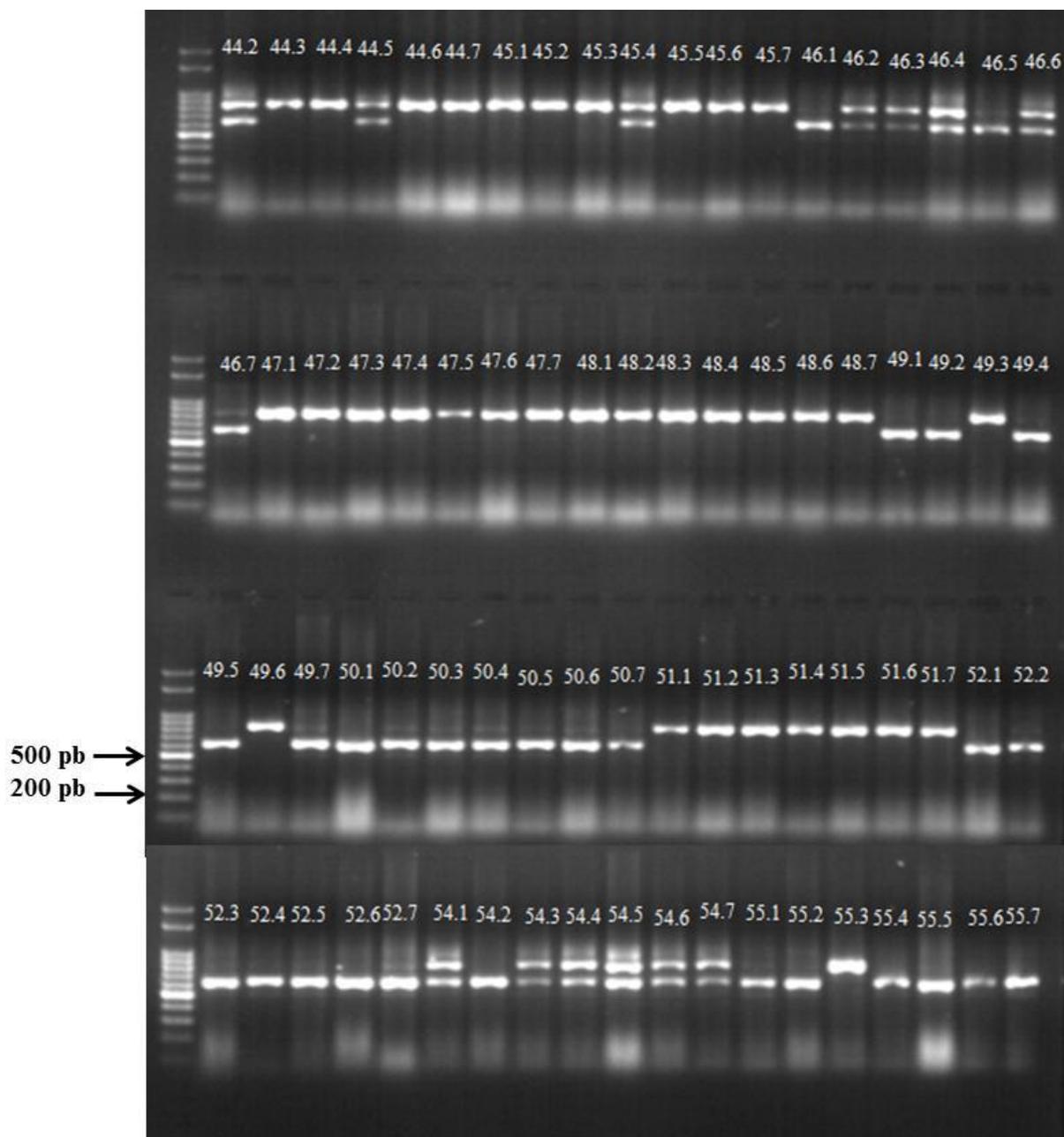
Anexo III – C. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 22.6 a 22.7=EHCEB 20111036, 23.1 a 23.7=EHCEB 20142040, 24.1 a 24.7=EHCEB 20141040, 25.1 a 25.7=EHCEB 20142027, 26.1 a 26.7=EHCEB 20141027, 27.1 a 27.7=EHCEB 2014 2028, 28.1 a 28.7=EHCEB 20141008, 29.1 a 29.7=EHCEB 20101003, 30.1 a 30.7=EHCEB 20101019, 31.1 a 31.7=EHCEB 20101017, 32.1 a 32.7=EHCEB 20111006, 33.1 a 33.4=EHCEB 20112006. Ladder 100 pb Ludwig.



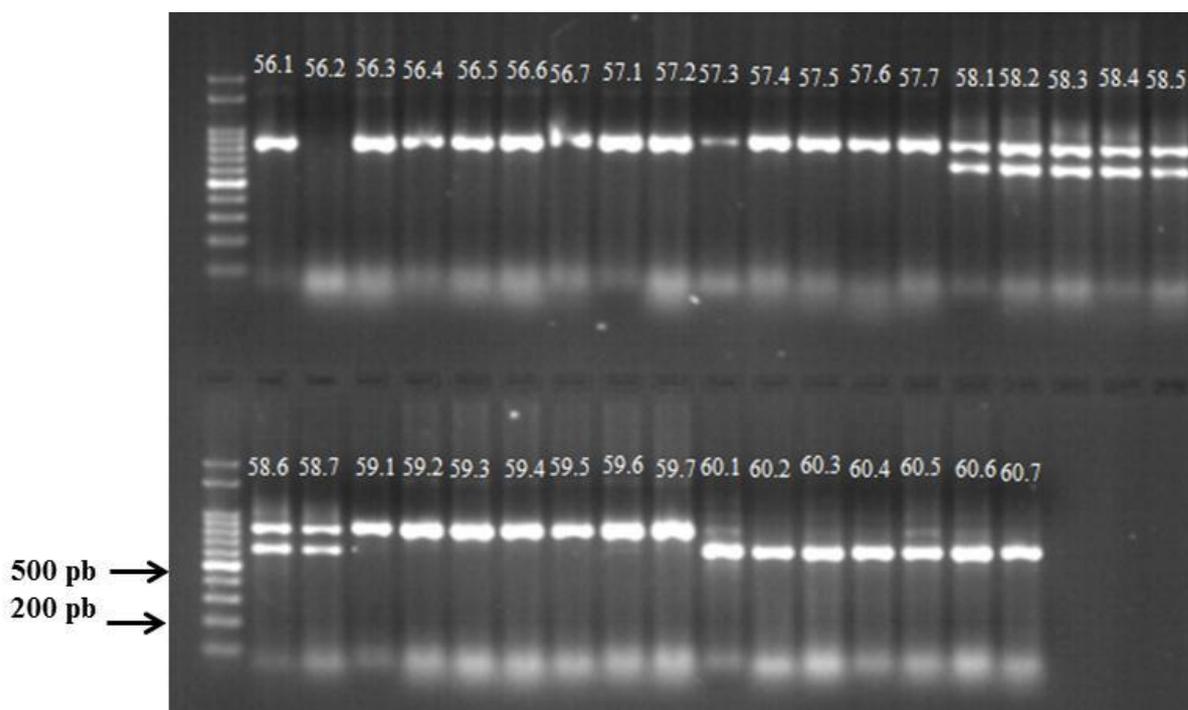
Anexo III – D. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 33.5 a 33.7=EHCEB 20112006, 34.1 a 34.7=EHCEB 20122003, 35.1 a 35.7=EHCEB 20102019, 36.1 a 36.7=EHCEB 20142008, 37.1 a 37.7=EHCEB 20102017, 38.1 a 38.7=Alvorada, 39.1 a 39.7=Roxa do Barreiro, 40.1 a 40.7 – Conquista, 41.1 a 41.7=Imperatriz, 42.1 a 42.7=São Paulo, 43.1 a 43.7=BRS 367 (Riva), 44.1=Rainha. Ladder 100 pb Ludwig.



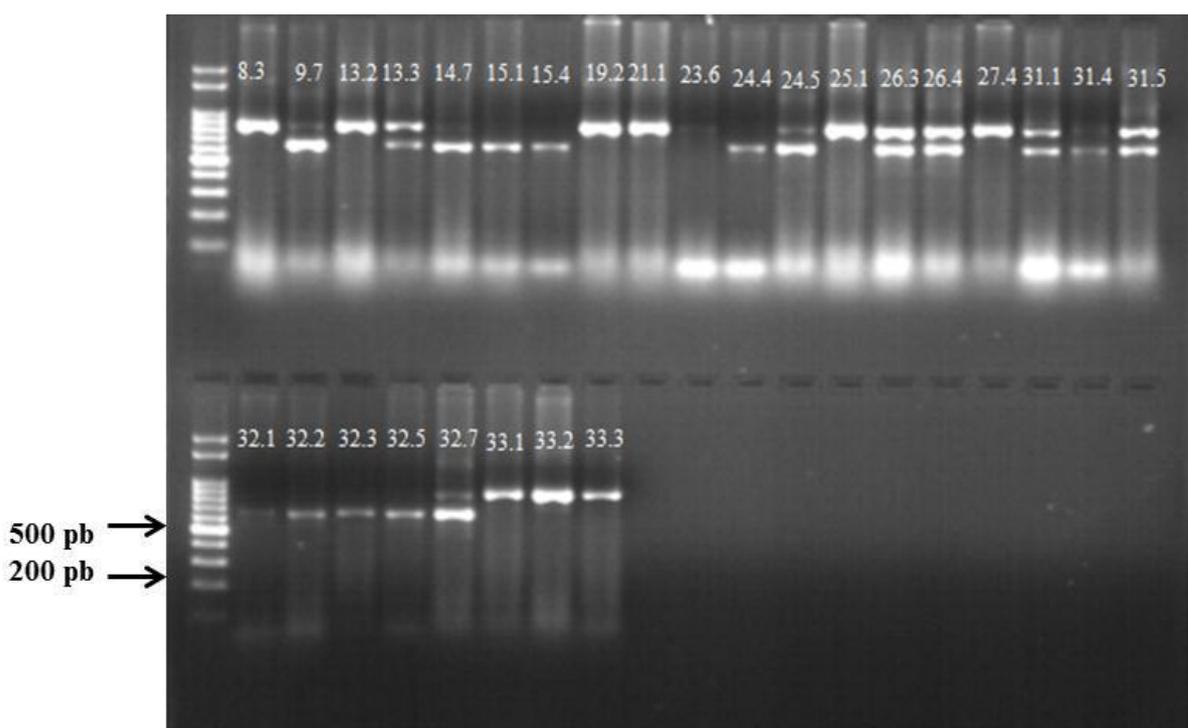
Anexo III – E. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 44.2 a 44.7=Rainha, 45.1 a 45.7=Juporanga, 46.1 a 46.7=Cascuda T8; 47.1 a 47.7=Cascuda T7, 48.1 a 48.7=Cascuda T6, 49.1 a 49.7=Cascuda T5, 50.1 a 50.7=Cascuda T4, 51.1 a 51.7=Cascuda T3, 52.1 a 52.7=Cascuda T2, 54.1 a 54.7=Alfa SF C-XI, 55.1 a 55.7=IPA 12. Ladder 100 pb Ludwig.



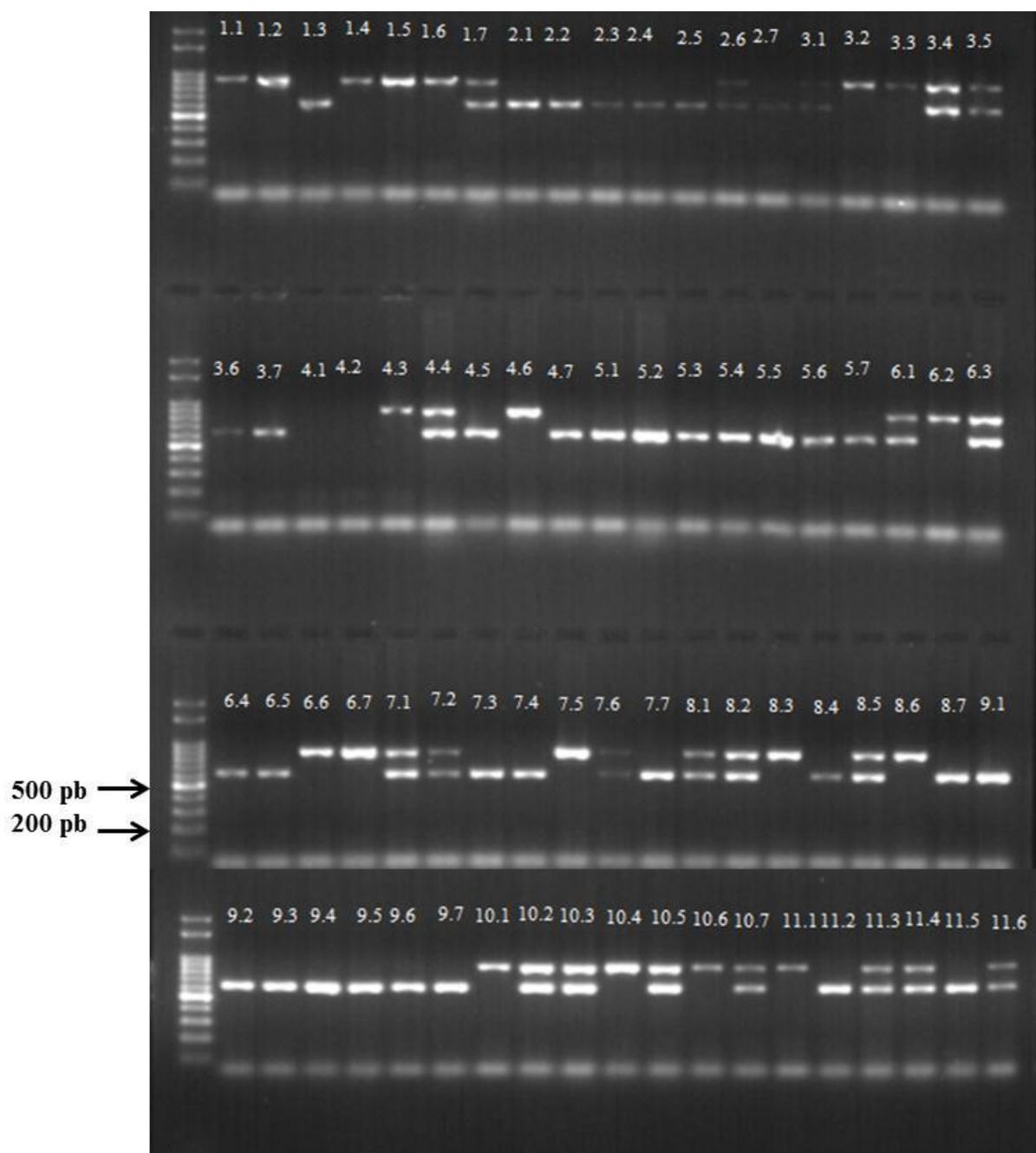
Anexo III – F. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 56.3 a 56.7=IPA 11, 57.1 a 57.7=IPA 10; 58.1 a 58.7=Alfa SF 'A', 59.1 a 59.7=Alfa SF 'B', 60.1 a 60.7=EHCEB 20141028. Ladder 100 pb Ludwig.



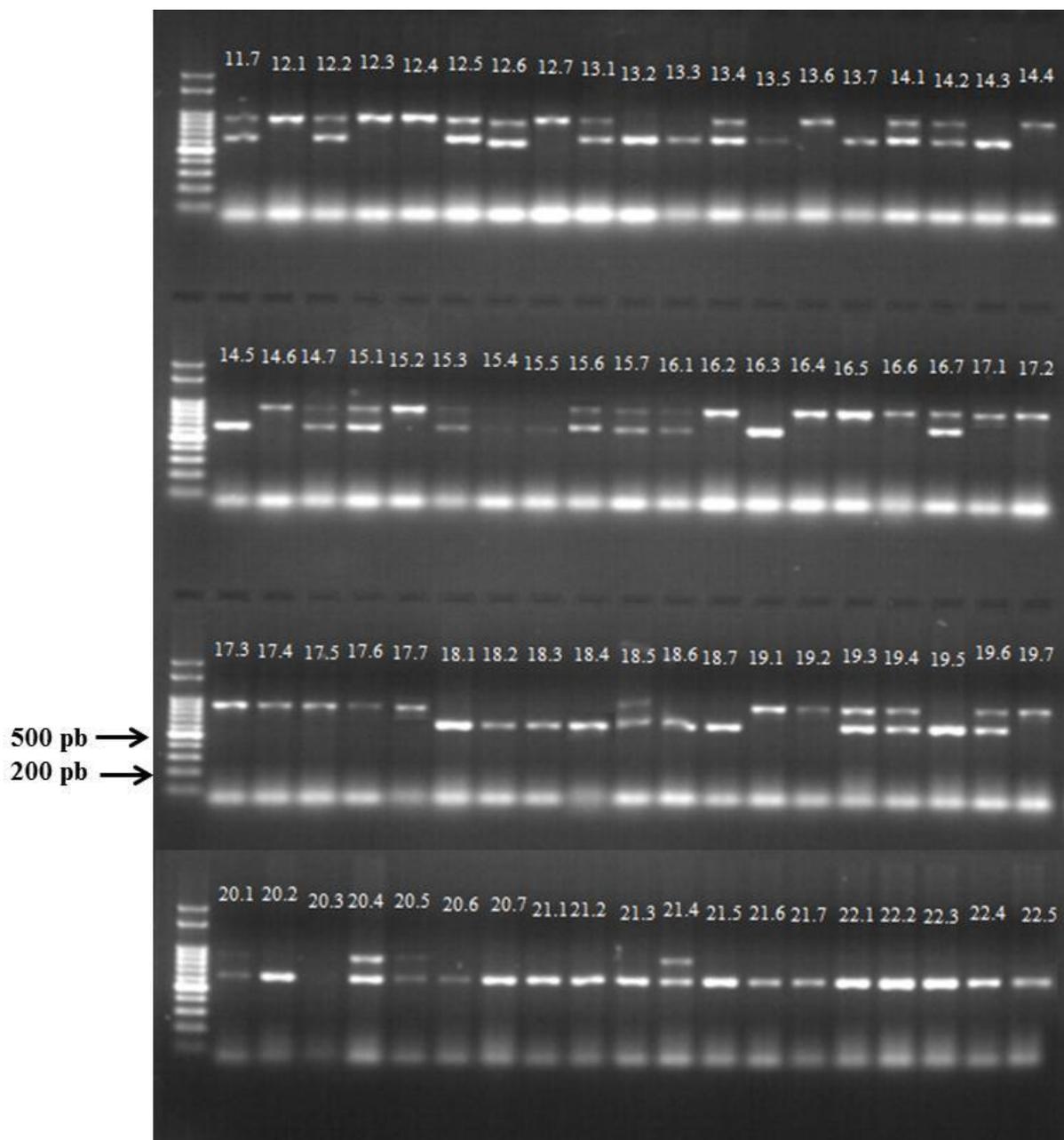
Anexo III – G. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *orf725*: 8.3=Crioula Mercosul, 9.7=Sirius F1, 13.2 a 13.3=EHCEB 201427, 14.7=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.1 e 15.4=F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 19.2=EHCEB 20142038, 21.1=EHCEB 20112036, 23.6=EHCEB 20142040, 24.4 e 24.5=EHCEB 20141040, 25.1=EHCEB 20142027, 26.3 a 26.4=EHCEB 20141027, 27.4=EHCEB 20142028, 31.1 e 31.4 a 31.5=EHCEB 20101017, 32.1 a 32.3, 32.5 e 32.7=EHCEB 20111006; 33.1 a 33.3=EHCEB 20112006. Ladder 100 pb Ludwig.



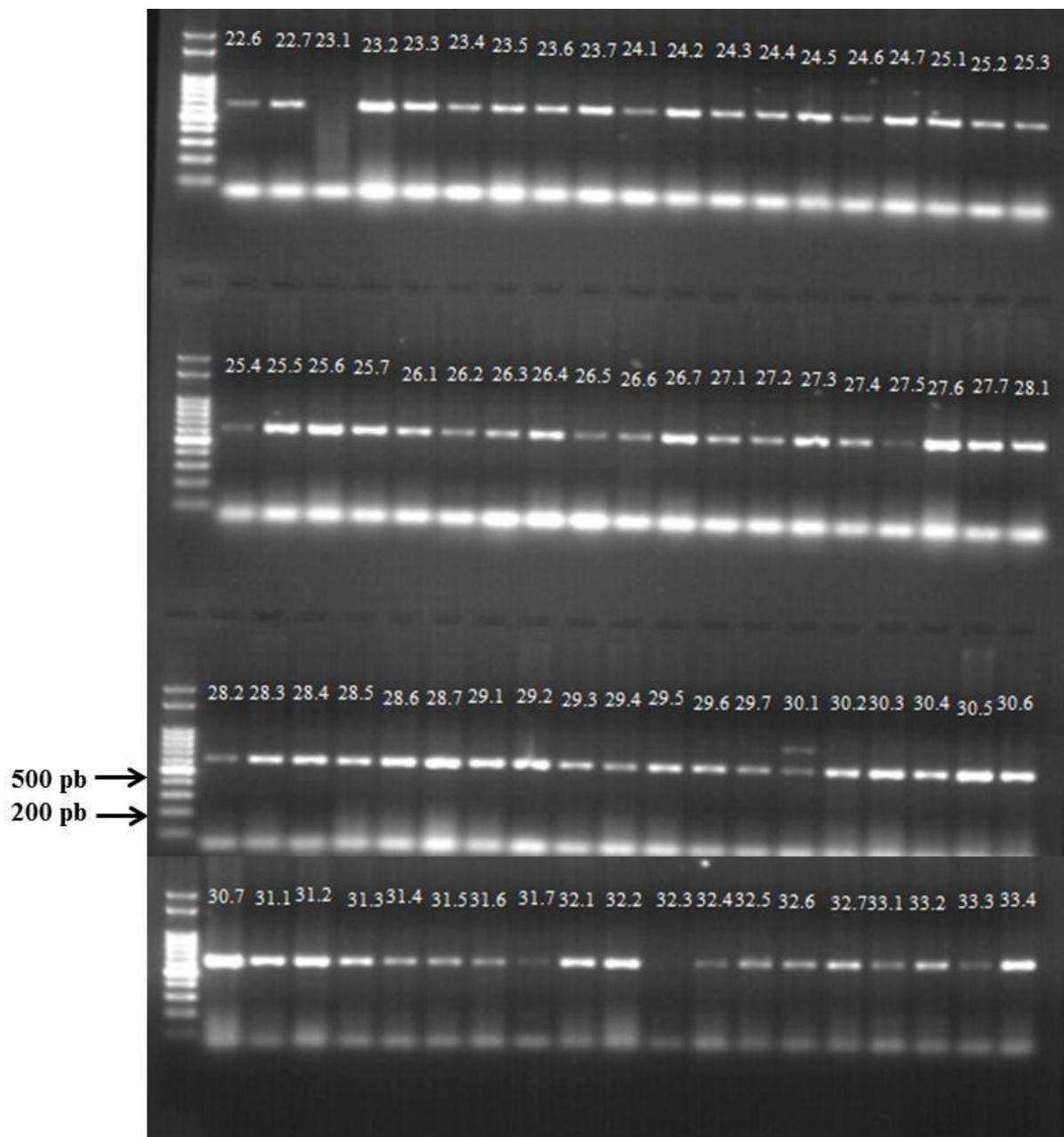
Anexo IV – A. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1: 1.1 a 1.7=Serrana, 2.1 a 2.7 = Regia, 3.1 a 3.7= EHCEB 201525, 4.1 a 4.7= EHCEB 20151, 5.1 a 5.7=Optima F1, 6.1 a6.7= EHCEB 20146, 7.1 a 7.7=EHCEB 201426, 8.1 a 8.7=Crioula Mercosul, 9.1 a 9.7=Sirius F1; 10.1 a 10.7=Primavera, 11.1 a 11.6= EHCEB 20142. Ladder 100 pb Ludwig.



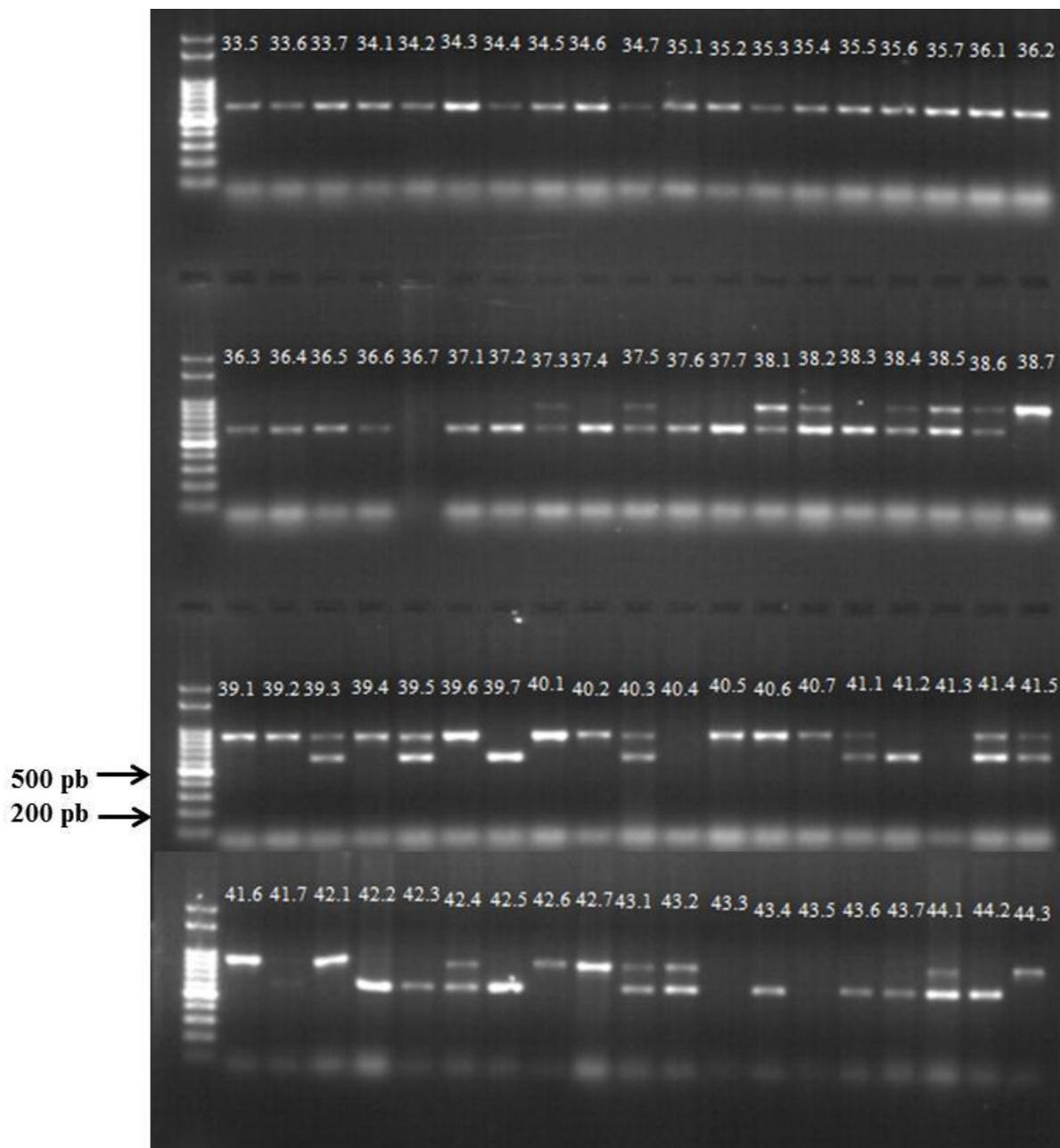
Anexo IV – B. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1: 11.7=EHCEB 20142, 12.1 a 12.7=Bola Precoce, 13.1 a 13.7=EHCEB 201427, 14.1 a 14.7=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.1 a 15.7=F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 16.1 a 16.7=EHCEB 201124, 17.1 a 17.7=EHCEB 201513, 18.1 a 18.7=EHCEB 201423, 19.1 a 19.7=EHCEB 20142038, 20.1 a 20.7=EHCEB 20141038, 21.1 a 21.7=EHCEB 20112036, 22.1 a 22.5=EHCEB 20111036. Ladder 100 pb Ludwig.



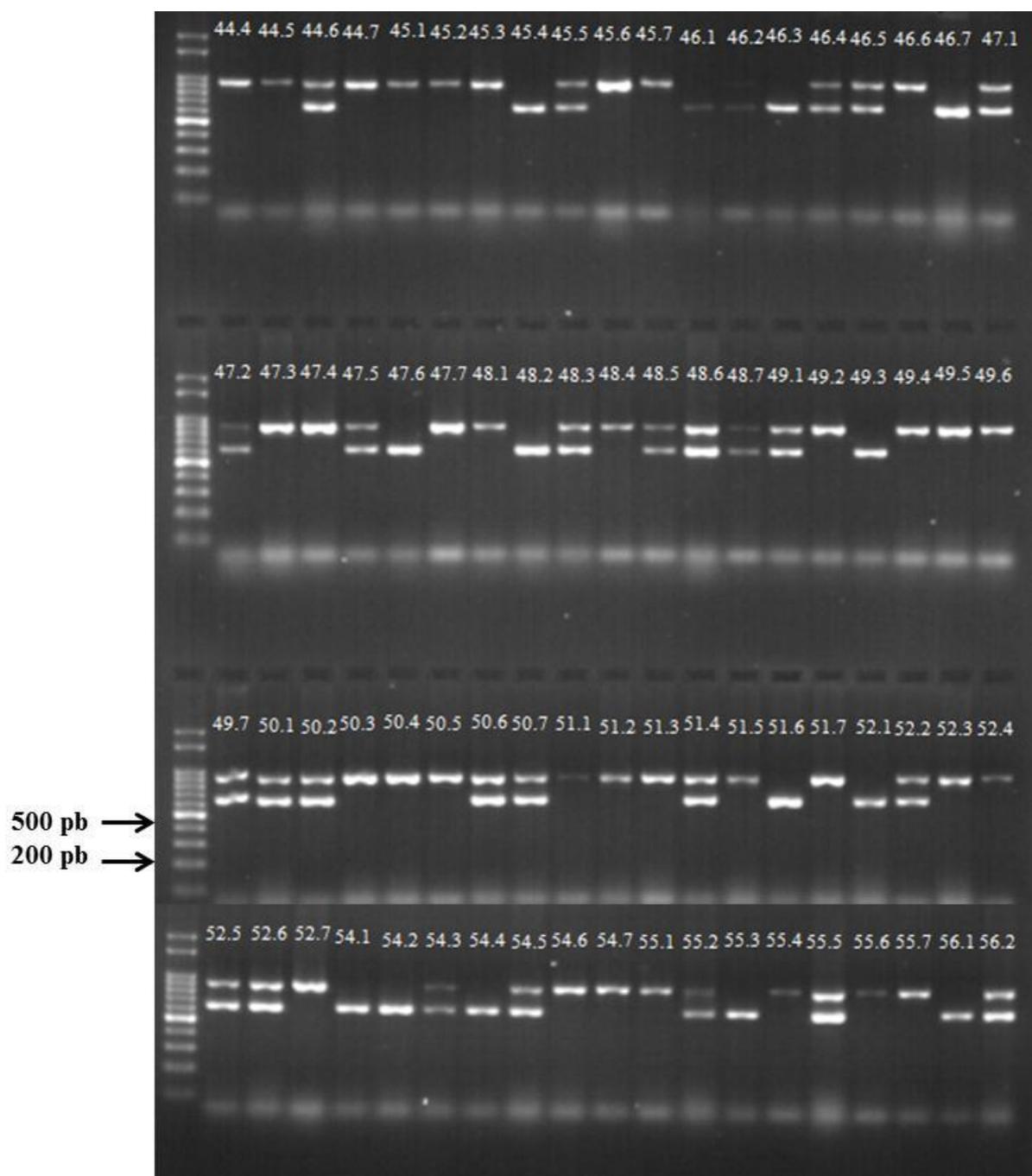
Anexo IV – C. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1: 22.6 a 22.7=EHCEB 20111036, 23.1 a 23.7=EHCEB 20142040, 24.1 a 24.7=EHCEB 20141040, 25.1 a 25.7=EHCEB 20142027, 26.1 a 26.7=EHCEB 20141027, 27.1 a 27.7=EHCEB 2014 2028, 28.1 a 28.7=EHCEB 20141008, 29.1 a 29.7=EHCEB 20101003, 30.1 a 30.7=EHCEB 20101019, 31.1 a 31.7=EHCEB 20101017, 32.1 a 32.7=EHCEB 20111006, 33.1 a 33.4=EHCEB 20112006. Ladder 100 pb Ludwig.



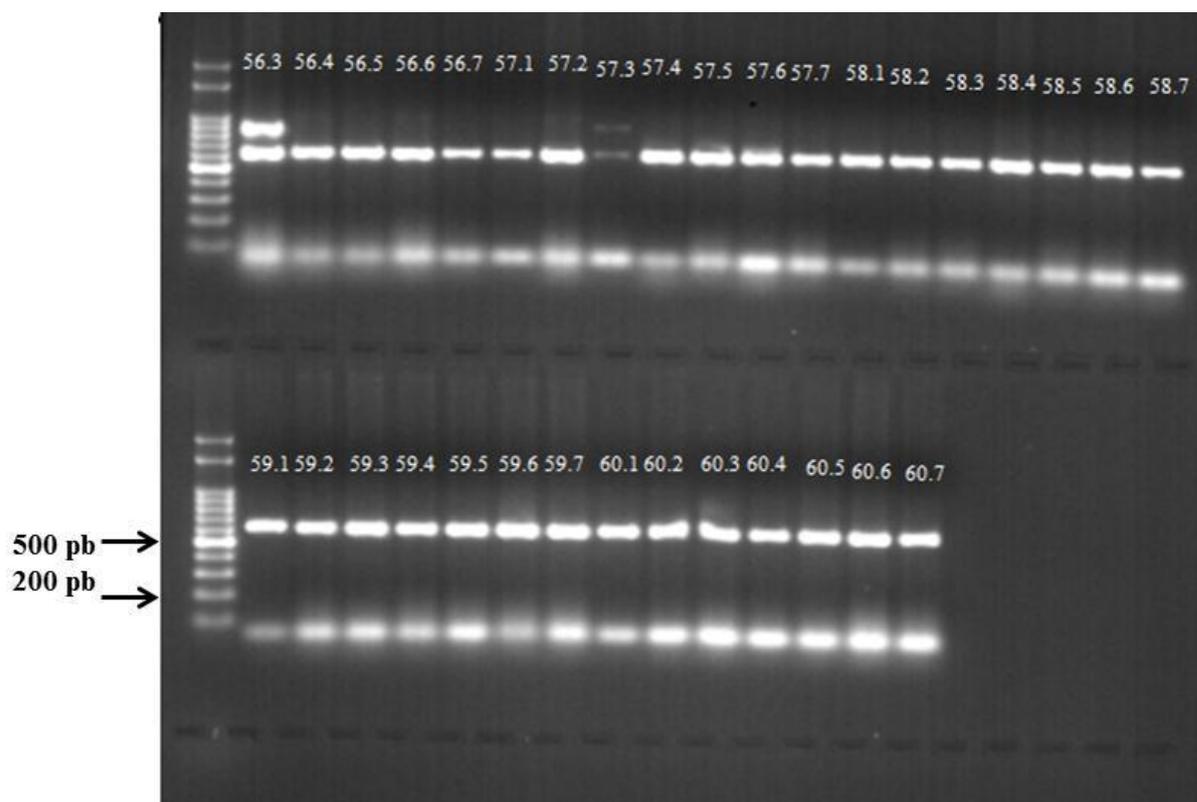
Anexo IV – D. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1: 33.5 a 33.7=EHCEB 20112006, 34.1 a 34.7=EHCEB 20122003, 35.1 a 35.7=EHCEB 20102019, 36.1 a 36.7=EHCEB 20142008, 37.1 a 37.7=EHCEB 20102017, 38.1 a 38.7=Alvorada, 39.1 a 39.7=Roxa do Barreiro, 40.1 a 40.7 – Conquista, 41.1 a 41.7=Imperatriz, 42.1 a 42.7=São Paulo, 43.1 a 43.7=BRS 367 (Riva), 44.1 a 44.3=Rainha. Ladder 100 pb Ludwig.



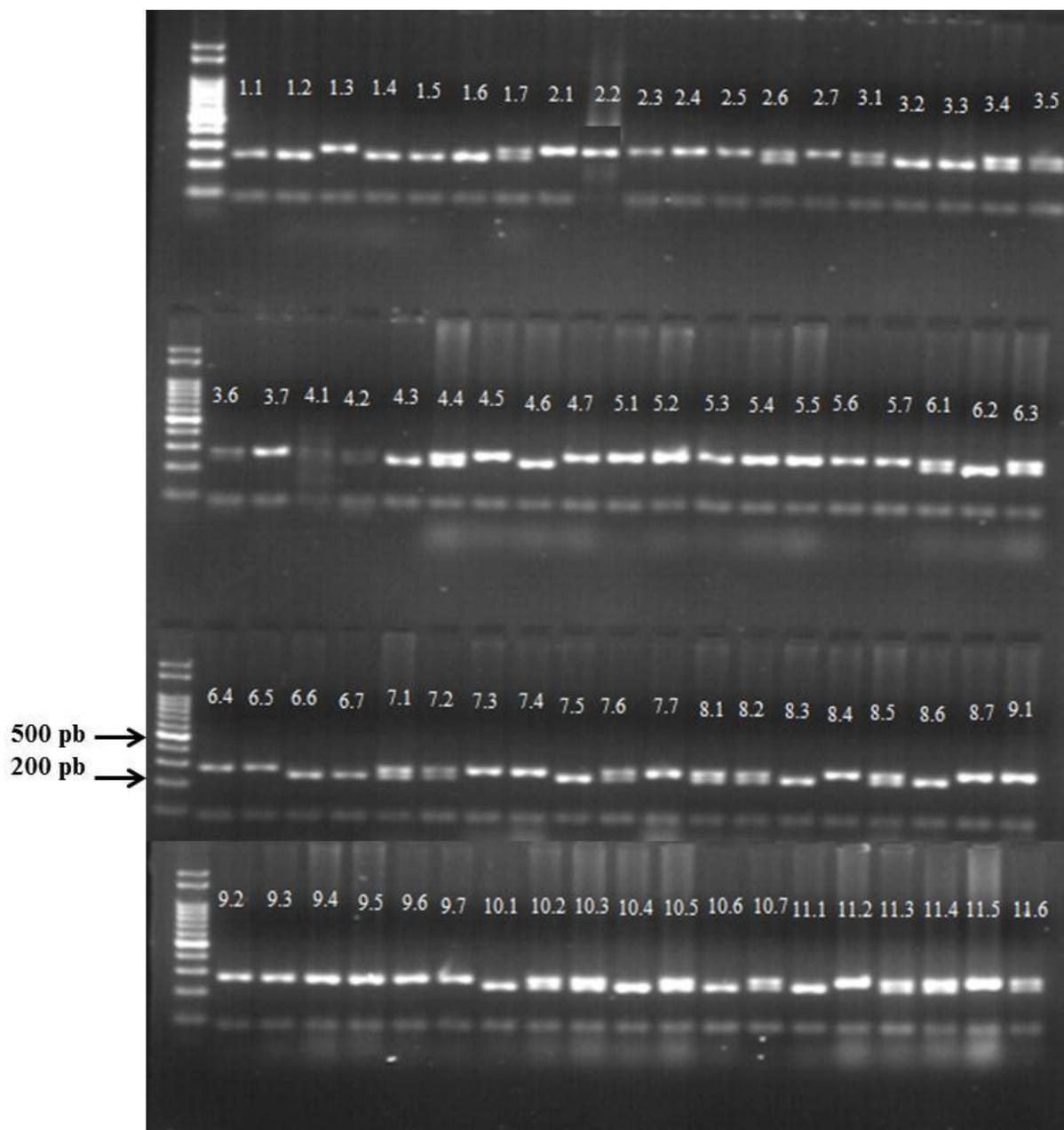
Anexo IV – E. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1: 44.4 a 44.7=Rainha, 45.1 a 45.7=Juporanga, 46.1 a 46.7=Cascuda T8; 47.1 a 47.7=Cascuda T7, 48.1 a 48.7=Cascuda T6, 49.1 a 49.7=Cascuda T5, 50.1 a 50.7=Cascuda T4, 51.1 a 51.7=Cascuda T3, 52.1 a 52.7=Cascuda T2, 54.1 a 54.7=Alfa SF C-XI, 55.1 a 55.7=IPA 12, 56.1 a 56.2=IPA 11. Ladder 100 pb Ludwig.



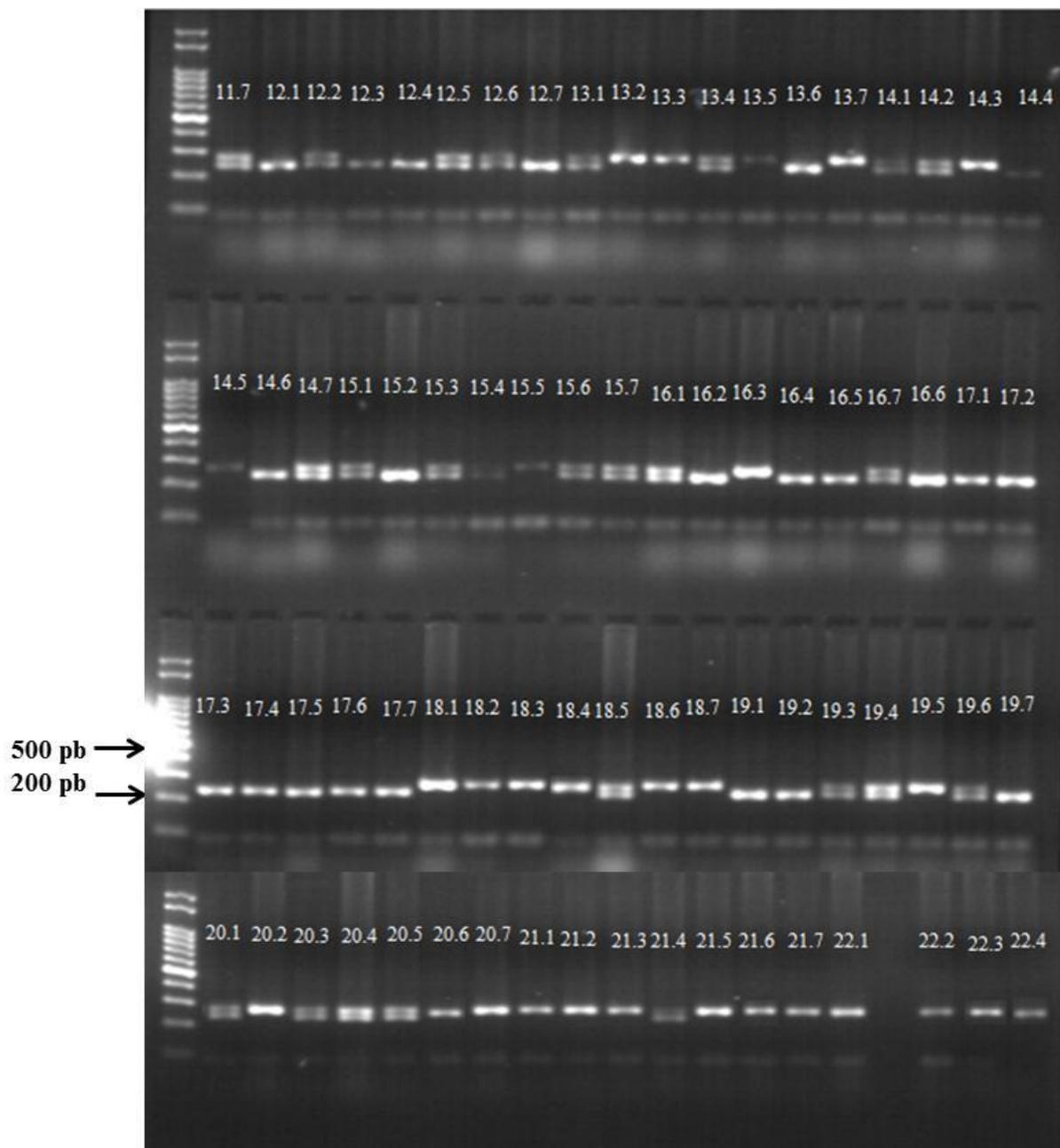
Anexo IV – F. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcSKP1: 56.3 a 56.7=IPA 11, 57.1 a 57.7=IPA 10; 58.1 a 58.7=Alfa SF 'A', 59.1 a 59.7=Alfa SF 'B', 60.1 a 60.7=EHCEB 20141028. Ladder 100 pb Ludwig.



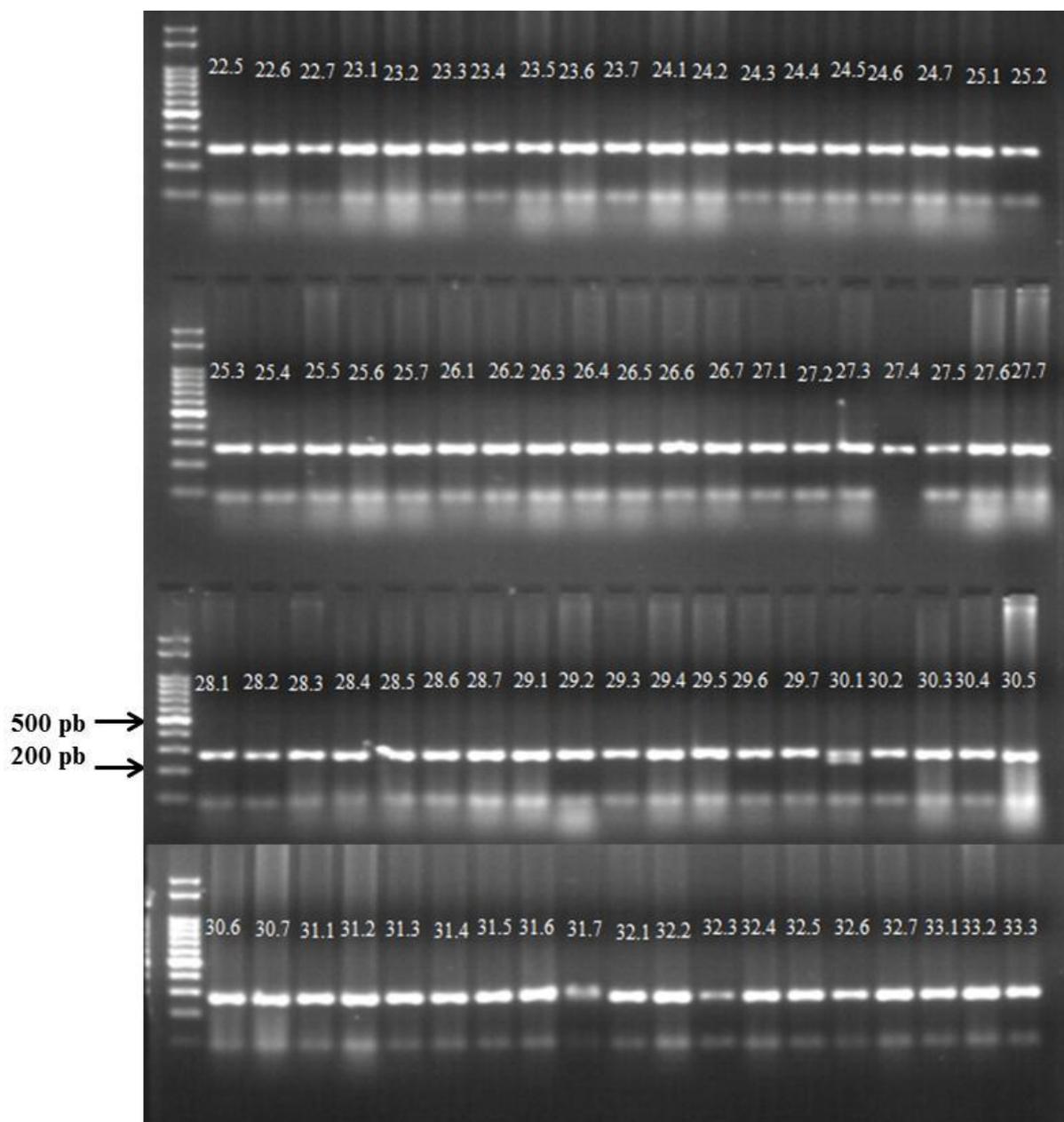
Anexo V – A. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1: 1.1 a 1.7=Serrana, 2.1 a 2.7 = Regia, 3.1 a 3.7= EHCEB 201525, 4.1 a 4.7= EHCEB 20151, 5.1 a 5.7=Optima F1, 6.1 a 6.7= EHCEB 20146, 7.1 a 7.7=EHCEB 201426, 8.1 a 8.7=Crioula Mercosul, 9.1 a 9.7=Sirius F1; 10.1 a 10.7=Primavera, 11.1 a 11.6= EHCEB 20142. Ladder 100 pb Ludwig.



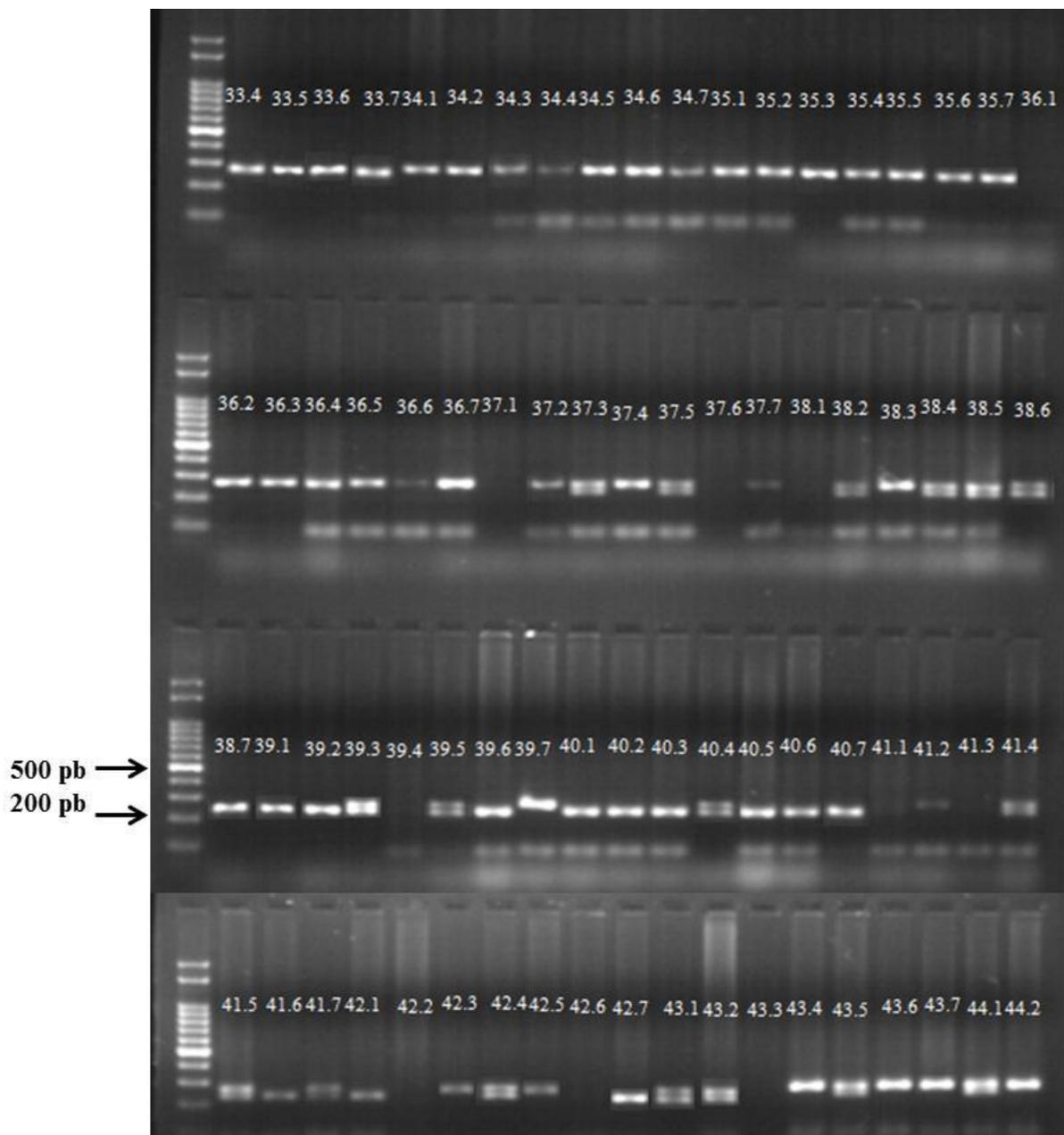
Anexo V – B. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1: 11.7=EHCEB 20142, 12.1 a 12.7=Bola Precoce, 13.1 a 13.7=EHCEB 201427, 14.1 a 14.7=F2 (EHCEB 20131006 x EHCEB 20133014), 15.1 a 15.7=F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), 16.1 a 16.7=EHCEB 201124, 17.1 a 17.7=EHCEB 201513, 18.1 a 18.7=EHCEB 201423, 19.1 a 19.7=EHCEB 20142038, 20.1 a 20.7=EHCEB 20141038, 21.1 a 21.7=EHCEB 20112036, 22.1 a 22.4=EHCEB 20111036. Ladder 100 pb Ludwig.



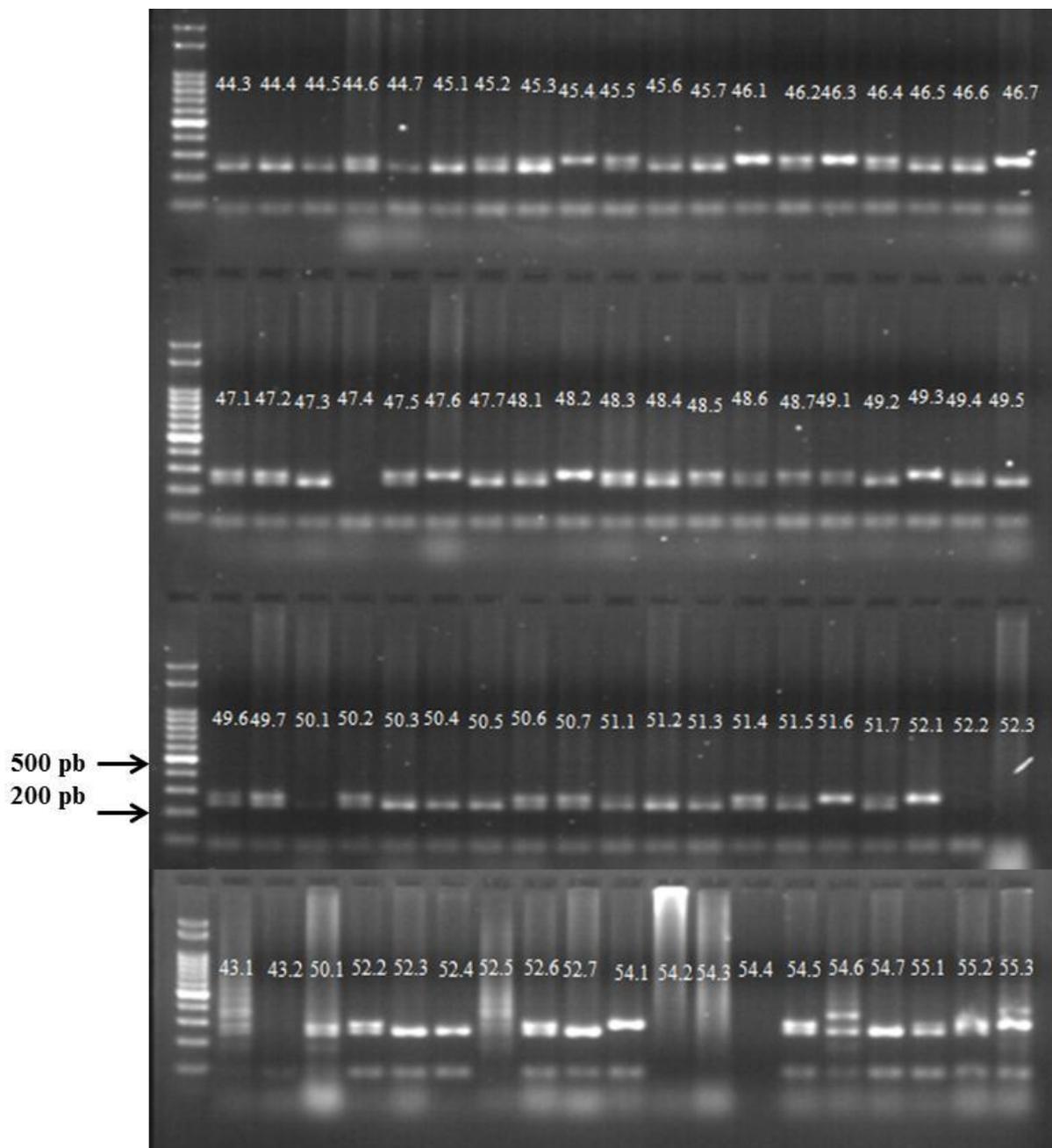
Anexo V – C. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1: 22.5 a 22.7=EHCEB 20111036, 23.1 a 23.7=EHCEB 20142040, 24.1 a 24.7=EHCEB 20141040, 25.1 a 25.7=EHCEB 20142027, 26.1 a 26.7=EHCEB 20141027, 27.1 a 27.7=EHCEB 2014 2028, 28.1 a 28.7=EHCEB 20141008, 29.1 a 29.7=EHCEB 20101003, 30.1 a 30.7=EHCEB 20101019, 31.1 a 31.7=EHCEB 20101017, 32.1 a 32.7=EHCEB 20111006, 33.1 a 33.3=EHCEB 20112006. Ladder 100 pb Ludwig.



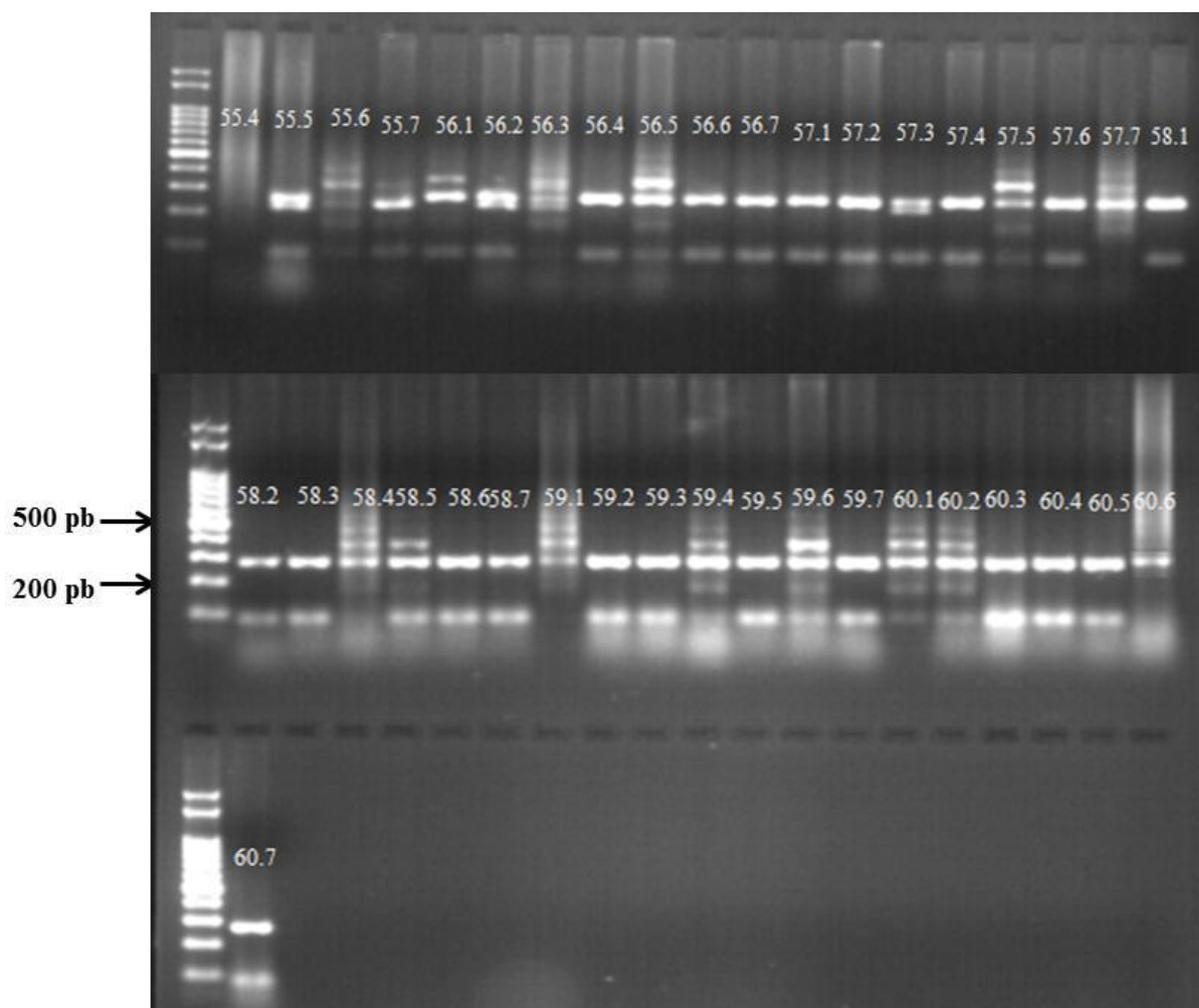
Anexo V – D. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1: 33.4 a 33.7=EHCEB 20112006, 34.1 a 34.7=EHCEB 20122003, 35.1 a 35.7=EHCEB 20102019, 36.1 a 36.7=EHCEB 20142008, 37.1 a 37.7=EHCEB 20102017, 38.1 a 38.7=Alvorada, 39.1 a 39.7=Roxa do Barreiro, 40.1 a 40.7 – Conquista, 41.1 a 41.7=Imperatriz, 42.1 a 42.7=São Paulo, 43.1 a 43.7=BRS 367 (Riva), 44.1 a 44.2=Rainha. Ladder 100 pb Ludwig.



Anexo V – E. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1: 44.3 a 44.7=Rainha, 45.1 a 45.7=Juporanga, 46.1 a 46.7=Cascuda T8; 47.1 a 47.7=Cascuda T7, 48.1 a 48.7=Cascuda T6, 49.1 a 49.7=Cascuda T5, 50.1 a 50.7=Cascuda T4, 51.1 a 51.7=Cascuda T3, 52.1 a 52.7=Cascuda T2, 54.1 a 54.7=Alfa SF C-XI, 55.1 a 55.3=IPA 12. Ladder 100 pb Ludwig.



Anexo V – F. Fragmentos de DNA amplificados com o marcador AcPMS1: 56.3 a 56.7=IPA 11, 57.1 a 57.7=IPA 10; 58.1 a 58.7=Alfa SF 'A', 59.1 a 59.7=Alfa SF 'B', 60.1 a 60.7=EHCEB 20141028. Ladder 100 pb Ludwig.



Anexo VI – Percentagem de viabilidade polínica em quatro anteras (1, 2, 3, 4) de plantas (P_) de acessos de cebola avaliados pelos métodos da coloração com carmim acético 2% (CCA), solução de Alexander modificada (SAM) e germinação *in vitro* (GIV): fértil (F) e estéril (E).

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
Alfa SF 'A'-P1							EHCEB 20102017-P3						
1	70	30	90	10	30	70	1	100	0	100	0	10	90
2	100	0	98	2	20	80	2	100	0	100	0	15	85
3	97	3	97	3	50	50	3	100	0	100	0	15	85
4	100	0	99	1	57	43	4	100	0	98	2	10	90
Alfa SF 'A'-P2							EHCEB 20102017-P4						
1	97	3	95	5	30	70	1	100	0	100	0	90	10
2	85	15	70	30	25	75	2	100	0	100	0	95	5
3	60	40	60	40	20	80	3	100	0	100	0	92	8
4	98	2	87	13	34	66	4	100	0	100	0	90	10
Alfa SF 'A'-P3							EHCEB 20102017-P5						
1	98	2	93	7	27	73	1	100	0	100	0	90	10
2	97	3	95	5	31	69	2	100	0	100	0	91	9
3	100	0	97	3	24	76	3	100	0	100	0	90	10
4	93	7	90	10	20	80	4	100	0	100	0	93	7
Alfa SF 'A'-P4							EHCEB 20102017-P6						
1	100	0	88	12	36	64	1	100	0	100	0	90	10
2	92	8	90	10	43	57	2	100	0	97	3	92	8
3	95	5	90	10	38	62	3	100	0	100	0	90	10
4	85	15	60	40	30	70	4	100	0	98	2	91	9
Alfa SF 'A'-P5							EHCEB 20102017-P7						
1	0	100	0	100	0	100	1	10	90	8	92	85	15
2	0	100	0	100	0	100	2	2	98	98	2	87	13
3	0	100	0	100	0	100	3	85	15	98	2	85	15
4	0	100	0	100	0	100	4	3	97	1	99	90	10
Alfa SF 'A'-P6							EHCEB 20102017-P8						
1	0	100	0	100	0	100	1	100	0	100	0	85	15
2	0	100	0	100	0	100	2	99	1	98	2	90	10
3	0	100	0	100	0	100	3	100	0	100	0	79	21
4	0	100	0	100	0	100	4	100	0	100	0	90	10
Alfa SF 'A'-P7							EHCEB 20102017-P9						
1	99	1	97	3	56	44	1	100	0	100	0	90	10
2	70	30	90	10	35	65	2	98	2	97	3	92	8
3	100	0	97	3	46	54	3	100	0	95	5	92	8
4	96	4	95	5	30	70	4	100	0	100	0	90	10

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)		
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E	
Alfa SF 'A'-P8							EHCEB 20102017-P10							
1	82	18	87	13	25	75	1	50	50	0	100	0	100	
2	87	13	91	9	35	65	2	60	40	5	95	0	100	
3	88	12	88	12	43	57	3	97	3	0	100	40	60	
4	86	14	90	10	40	60	4	3	97	75	25	50	50	
Alfa SF 'A'-P9							EHCEB 20102017-P11							
1	100	0	95	5	50	50	1	98	2	97	3	97	3	
2	100	0	85	15	48	52	2	100	0	98	2	95	5	
3	100	0	82	18	55	45	3	100	0	98	2	95	5	
4	90	10	90	10	52	48	4	100	0	98	2	96	4	
Alfa SF 'A'-P10							EHCEB 20102017-P12							
1	100	0	95	5	74	26	1	100	0	100	0	15	85	
2	100	0	98	2	83	17	2	100	0	100	0	20	80	
3	98	2	96	4	66	34	3	100	0	97	3	15	85	
4	100	0	80	20	75	25	4	100	0	98	2	20	80	
Alfa SF 'A'-P11							EHCEB 20141028-P1							
1	80	20	78	22	32	68	1	0	100	0	100	0	100	
2	95	5	90	10	41	59	2	0	100	0	100	0	100	
3	60	40	7	93	15	85	3	0	100	0	100	0	100	
4	15	85	15	85	22	78	4	0	100	0	100	0	100	
Alfa SF 'A'-P12							EHCEB 20141028-P2							
1	95	5	85	15	15	85	1	0	100	0	100	0	100	
2	98	2	50	50	29	71	2	0	100	0	100	0	100	
3	2	98	1	99	22	78	3	0	100	0	100	0	100	
4	1	99	1	99	5	95	4	0	100	0	100	0	100	
Alfa SF 'B'-P1							EHCEB 20141028-P3							
1	97	3	94	6	20	80	1	0	100	0	100	0	100	
2	100	0	95	5	20	80	2	0	100	0	100	0	100	
3	100	0	20	80	60	40	3	0	100	0	100	0	100	
4	95	5	70	30	70	30	4	0	100	0	100	0	100	
Alfa SF 'B'-P2							EHCEB 20141028-P4							
1	100	0	97	3	50	50	1	0	100	0	100	0	100	
2	100	0	94	6	80	20	2	0	100	0	100	0	100	
3	100	0	98	2	70	30	3	0	100	0	100	0	100	
4	100	0	100	0	85	15	4	0	100	0	100	0	100	

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
Alfa SF 'B'- P3							EHCEB 20141028-P5						
1	90	10	90	10	80	20	1	0	100	0	100	0	100
2	85	15	2	98	80	20	2	0	100	0	100	0	100
3	98	2	70	30	70	30	3	0	100	0	100	0	100
4	60	40	45	55	65	35	4	0	100	0	100	0	100
Alfa SF 'B'- P4							EHCEB 20141028-P6						
1	100	0	97	3	80	20	1	0	100	0	100	0	100
2	99	1	95	5	78	22	2	0	100	0	100	0	100
3	100	0	97	3	64	36	3	0	100	0	100	0	100
4	97	3	96	4	75	25	4	0	100	0	100	0	100
Alfa SF 'B'- P5							EHCEB 20141028-P7						
1	95	5	100	0	75	25	1	0	100	0	100	0	100
2	100	0	96	4	80	20	2	0	100	0	100	0	100
3	97	3	97	3	57	43	3	0	100	0	100	0	100
4	100	0	95	5	71	29	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367- P1							EHCEB 20141028-P8						
1	90	10	60	40	50	50	1	0	100	0	100	0	100
2	60	40	60	40	40	60	2	0	100	0	100	0	100
3	70	30	60	40	60	40	3	0	100	0	100	0	100
4	40	60	20	80	70	30	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367- P2							EHCEB 20141028-P9						
1	100	0	96	4	85	15	1	0	100	0	100	0	100
2	100	0	97	3	80	20	2	0	100	0	100	0	100
3	99	1	98	2	90	10	3	0	100	0	100	0	100
4	100	0	98	2	80	20	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367('B')-P3							EHCEB 20141028-P10						
1	100	0	99	1	50	50	1	0	100	0	100	0	100
2	100	0	100	0	70	30	2	0	100	0	100	0	100
3	100	0	99	1	40	60	3	0	100	0	100	0	100
4	100	0	96	4	80	20	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367- P4							EHCEB 20141028-P11						
1	100	0	50	50	79	21	1	0	100	0	100	0	100
2	98	2	80	20	85	15	2	0	100	0	100	0	100
3	100	0	100	0	85	15	3	0	100	0	100	0	100
4	99	1	99	1	80	20	4	0	100	0	100	0	100

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
BRS 367('B')-P5							EHCEB 20141028-P12						
1	100	0	99	1	10	90	1	3	97	1	99	0	100
2	100	0	100	0	10	90	2	0	100	2	98	0	100
3	99	1	95	5	20	80	3	0	100	0	100	0	100
4	100	0	98	2	30	70	4	2	98	1	99	0	100
BRS 367('B')-P6							EHCEB 20141028-P13						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367- P7							EHCEB 20141028-P14						
1	90	10	95	5	70	30	1	0	100	0	100	0	100
2	96	4	96	4	80	20	2	0	100	0	100	0	100
3	95	5	93	7	50	50	3	0	100	0	100	0	100
4	100	0	99	1	85	15	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367- P8							EHCEB 20141028-P15						
1	100	0	98	2	90	10	1	2	98	2	98	0	100
2	100	0	93	7	85	15	2	2	98	2	98	0	100
3	99	1	97	3	85	15	3	0	100	0	100	0	100
4	99	1	96	4	90	10	4	0	100	0	100	0	100
BRS 367- P9							EHCEB 20141028-P16						
1	100	0	99	1	60	40	1	0	100	0	100	0	100
2	99	1	97	3	60	40	2	0	100	0	100	0	100
3	100	0	98	2	60	40	3	0	100	0	100	0	100
4	100	0	99	1	60	40	4	0	100	0	100	0	100
Cascuda T5 ('A')							EHCEB 20141028-P17						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0,5	99,5	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0,5	99,5	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	1	99	2	98	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	1	99	0,5	99,5	0	100
Cascuda T7 ('B')							EHCEB 20141028-P18						
1	100	0	92	8	60	40	1	0	100	0	100	0	100
2	100	0	98	2	75	25	2	0	100	0	100	0	100
3	100	0	99	1	60	40	3	0	100	0	100	0	100
4	98	2	98	2	70	30	4	0	100	0	100	0	100

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
EHCEB 20141027-P1							EHCEB 20141028-P19						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P2							EHCEB 20141028-P20						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	2	98	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	1	99	0	100	0	100
4	2	98	0	100	0	100	4	0,5	99,5	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P3							EHCEB 20141028-P21						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	1	99	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P4							EHCEB 20141028-P22						
1	1	99	1	99	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	3	97	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P5							EHCEB 20141028-P23						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P6							EHCEB 20141028-P24						
1	0	100	0	100	2	98	1	80	20	0	100	5	95
2	10	90	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	5	95	5	95	0	100	3	0	100	80	20	0	100
4	0	100	0	100	3	97	4	30	70	10	90	4	96
EHCEB 20141027-P7							EHCEB 20141028-P25						
1	3	97	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	3	97	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	3	97	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P8							EHCEB 20141028-P26						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
EHCEB 20141027-P9							EHCEB 20141028-P27						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P10							EHCEB 20141028-P28						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P11							EHCEB 20141028-P29						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P12							EHCEB 20141028-P30						
1	1	99	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	1	99	1	99	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	1	99	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P13							EHCEB 20141028-P31						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141027-P14							EHCEB 20141028-P32						
1	10	90	8	92	4	96	1	0	100	0	100	0	100
2	2	98	2	98	2	98	2	0	100	0	100	0	100
3	15	85	2	98	3	97	3	0	100	0	100	0	100
4	3	97	1	99	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20142027-P1							EHCEB 20141028-P33						
1	10	90	15	85	3	97	1	3	97	1	99	0	100
2	0	100	0	100	0	0	2	3	97	1	99	0	100
3	0	100	0	100	0	0	3	0	100	0	100	0	100
4	35	65	25	75	5	95	4	0	100	0	100	0	100

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
EHCEB 20142027-P2							EHCEB 20141028-P34						
1	85	15	82	18	75	25	1	1	99	0	100	0	100
2	100	0	95	5	85	15	2	5	95	2	98	0	100
3	100	0	100	0	90	10	3	2	98	2	0	0	100
4	100	0	99	1	96	4	4	4	96	0	100	0	100
EHCEB 20142027-P3							EHCEB 20141028-P35						
1	100	0	99	1	10	90	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	0	2	0	100	0	100	0	100
3	1	99	0	100	0	0	3	0	100	0	100	0	100
4	15	85	35	65	20	80	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P1							EHCEB 20141028-P36						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P2							EHCEB 20141028-P37						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P3							EHCEB 20141028-P38						
1	4	96	0	100	2	98	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	5	95	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P4							EHCEB 20141028-P39						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P5							EHCEB 20141028-P40						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
EHCEB 20141017-P6							EHCEB 20141028- P41						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P7							EHCEB 20141028- P42						
1	0	100	0	100	0	100	1	0	100	0	100	0	100
2	0	100	0	100	0	100	2	0	100	0	100	0	100
3	0	100	0	100	0	100	3	0	100	0	100	0	100
4	0	100	0	100	0	100	4	0	100	0	100	0	100
EHCEB 20141017-P8							EHCEB 20142028-P1						
1	0	100	0	100	0	100	1	60	40	75	25	50	50
2	0	100	0	100	0	100	2	15	85	80	20	45	55
3	0	100	0	100	0	100	3	15	85	15	85	10	90
4	0	100	0	100	0	100	4	30	70	30	70	35	65
EHCEB 20141017-P9							EHCEB 20142028-P2						
1	20	80	0	100	7	93	1	99	1	97	3	55	45
2	0	100	10	90	0	100	2	95	5	95	5	60	40
3	0	100	0	100	0	100	3	90	10	90	10	55	45
4	1	99	1	99	0	100	4	95	5	87	13	60	40
EHCEB 20141017-P10							EHCEB 20142028-P3						
1	0	100	0	100	0	100	1	50	50	50	50	40	60
2	0	100	0	100	0	100	2	15	85	15	85	40	60
3	0	100	0	100	0	100	3	55	45	45	55	40	60
4	0	100	1	99	0	100	4	80	20	5	95	40	60
EHCEB 20102017-P1							EHCEB 20142028-P4						
1	97	3	95	5	90	10	1	75	25	74	26	50	50
2	100	0	95	5	87	13	2	90	10	91	9	50	50
3	99	1	99	1	90	10	3	25	75	65	35	50	50
4	100	0	94	6	95	5	4	90	10	75	25	46	54
EHCEB 20102017-P2							EHCEB 20142028-P5						
1	98	2	96	4	95	5	1	94	6	94	6	75	25
2	100	0	96	4	90	10	2	0	100	92	8	80	20
3	100	0	95	5	93	7	3	95	5	98	2	80	20
4	98	2	96	4	90	10	4	100	0	55	45	80	20

(continua)

(continuação Anexo VI)

Acesso/ Repetição	CCA (%)		SAM (%)		GIV (%)		Acesso/ Repetição	CCA(%)		SAM (%)		GIV (%)	
	F	E	F	E	F	E		F	E	F	E	F	E
EHCEB 20142028-P6							EHCEB 20142028-P7						
1	75	25	70	30	15	85	1	80	20	55	45	20	80
2	25	75	3	97	10	90	2	70	30	10	90	20	80
3	10	90	2	98	15	85	3	80	20	85	85	20	80
4	80	20	75	25	10	90	4	90	10	45	55	20	80
EHCEB 20142028-P8							EHCEB 20142028-P9						
1	100	0	100	0	50	50	1	40	60	40	60	0	100
2	100	0	100	0	50	50	2	50	50	35	65	0	100
3	100	0	100	0	50	50	3	55	45	45	55	0	100
4	90	10	97	3	50	50	4	85	15	70	30	0	100
EHCEB 20142028-P10							EHCEB 20142028-P11						
1	98	2	95	5	15	85	1	80	20	50	50	60	40
2	98	2	97	3	10	90	2	60	40	70	30	60	40
3	97	3	100	0	14	86	3	80	20	60	40	60	40
4	100	0	98	2	10	90	4	0	100	0	100	5	95
EHCEB 20142028-P12							EHCEB 20142028-P13						
1	40	60	30	70	40	60	1	85	15	85	15	55	45
2	60	40	50	50	40	60	2	50	50	50	50	55	45
3	50	50	80	20	40	60	3	95	5	85	15	55	45
4	90	10	20	80	40	60	4	85	15	50	50	55	45

Anexo VII – Normas internas do PPGA – Melhoramento Genético de Plantas para redação de dissertação ou tese

1. Normas Gerais

1.1. Dissertação constitui o produto final de pesquisas desenvolvidas em cursos de Mestrado e a Tese constitui o produto final de pesquisas desenvolvidas em cursos de Doutorado. Exigem investigações próprias à área de especialização e métodos específicos.

1.2. A Dissertação ou Tese é de responsabilidade do discente, da Comissão Orientadora e da Banca Examinadora.

2. Estrutura

2.1. A Dissertação ou Tese deverá ser composta de: (i) capa, (ii) páginas pré-textuais, (iii) corpo propriamente dito e, (iv) anexo (páginas pós-textuais).

2.2. A capa deverá conter a autoria, título, local e ano da aprovação. As capas encadernadas em mais de um volume deverão conter as mesmas informações acrescidas da identificação do respectivo volume. Dois (2) exemplares devem ser de capas duras de cor preta e letras amarelas.

2.3. As páginas pré-textuais serão compostas:

2.3.1. Primeira folha interna (página de rosto), contendo: (i) autoria, (ii) título; (iii) nota explicativa de que se trata de um trabalho de Dissertação ou Tese, mencionando o Programa de Pós-Graduação, a Universidade e o grau pretendido (Mestrado ou Doutorado); (iv) comitê de orientação e (v) local e ano de aprovação. Conterá, no verso desta folha, a ficha catalográfica.

2.3.2. Segunda folha interna deve conter, o título, o nome do pós-graduando(a), a data de aprovação, os nomes e as assinaturas do orientador e dos participantes da Banca Examinadora, local e data.

2.3.3. Opcionalmente, poderão ser incluídas páginas adicionais contendo: (i) agradecimento (ii) oferecimento, (iii) dedicatória e (iv) biografia do autor, obrigatoriamente, deve conter (v) lista de símbolos, figuras, tabelas e sumário.

2.3.4. Folha (s) em que conste (m) o resumo em português, palavras-chave, o abstract em inglês e key words. O resumo com no máximo 800 palavras deve destacar: o local da pesquisa, delineamento estatístico, caracterização do problema, focalizar o(s) objetivo(s), síntese da metodologia, resultados obtidos e conclusões.

2.4. O corpo da Dissertação ou Tese conterá todo o trabalho impresso, avaliado e aprovado pela Banca Examinadora. O corpo poderá ser organizado na forma de capítulos.

2.5. O corpo em capítulos será composto das seções:

Capítulo I: Introdução e Referencial Teórico; Capítulos (I ou mais a depender do número de artigos científicos); e Considerações Finais (opcional). As referências bibliográficas e citações seguirão as normas da Crop Breeding and Applied Biotechnology. As referências bibliográficas deverão aparecer ao final de cada capítulo.

2.6. O anexo (páginas pós-textuais) conterá material pertinente e suplementar.

2.7. Inserir cabeçalho com citação do autor e nome da dissertação ou tese, sendo a fonte tipo arial e tamanho 10, a partir do Capítulo I até a página inicial da folha anexo(s).

3. Editoração

3.1. Composição tipográfica. As dissertações ou teses deverão ser impressas em forma permanente e legível, com caracteres de alta definição e de cor preta no tipo Arial tamanho 12, com espaçamento 1,5.

3.2. Notação científica e medidas. A nomenclatura científica deverá ser diferenciada contextualmente, de acordo com as normas internacionais. As unidades métricas deverão seguir o padrão do Sistema Internacional de Unidades.

3.3. Papel. Utilizar papel A-4 (210 x 297 mm) branco, e suficientemente opaco para leitura normal.

3.4. Margens. A margem esquerda deve ser de 3 cm e as outras margens de 2 cm.

3.5. Paginação. Todas as páginas textuais e pós-textuais deverão ser numeradas em sequência contínua, isto é, desde a página do Capítulo I (texto corrido), até a última página, em algarismos arábicos. A sequência deverá incluir tudo que estiver como mapas, diagramas, páginas em branco e outros. As páginas pré-textuais deverão ser numeradas, sequencialmente, como algarismos romanos minúsculos.

3.6. Ilustrações. Fotografias e outras ilustrações deverão ser montadas de forma definitiva e incluídas no corpo da Dissertação ou Tese. É admitido o uso de cores nas figuras e ilustrações. Em nenhuma circunstância dever-se-á empregar fita adesiva ou material similar para afixação de ilustrações no corpo da Dissertação ou Tese. Folhas de tamanho superior a A4 serão aceitáveis, desde que dobradas, de forma a resultar em dimensões inferiores ao tamanho do papel adotado.