

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

GERSON HENRIQUE WAMSER

DIVERGÊNCIA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA

LAGES, SC

2011

GERSON HENRIQUE WAMSER

DIVERGÊNCIA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Orientador: Dr. Jefferson Luís Meirelles
Coimbra

Co-orientador: Dr. Altamir Frederico
Guidolin

LAGES, SC

2011

GERSON HENRIQUE WAMSER

DIVERGÊNCIA EM GENÓTIPOS DE CEBOLA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Aprovada em: 20/05/2011

Homologada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Orientador/presidente: Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra (UDESC/Lages - SC)

Dr. Leo Rufato
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado em Produção Vegetal e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - UDESC/Lages - SC

Co-orientador/membro: Dr. Altamir Frederico Guidolin (UDESC/Lages - SC)

Co-orientador/membro: Dr. Sérgio Dias Lannes
(EPAGRI/Ituporanga - SC)

Dr. Cleimon Eduardo do Amaral Dias
Diretor Geral do Centro de Ciências Agroveterinárias - UDESC/Lages - SC

Membro: Dr. Gilberto Luiz Dalagnol
(EPAGRI/Lages - SC)

Lages, Santa Catarina, 20 de maio de 2011

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC)

W243v Wamser, Gerson Henrique
Divergência em genótipos de cebola / Gerson Henrique Wamser ;
orientador: Jefferson Luís Meirelles Coimbra . – Lages, 2011.
38f.

Inclui referências.
Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UEDESC.

1. *Allium cepa* L. 2. Variabilidade. 3. RAPD. 4. Análise Multivariada.
I. Título.

CDD – 635.25

À minha esposa Kelly e minha filha Elisa,
Aos meus pais, Sergio e Enite,
Aos meus irmãos Anderson e Viviam,
Com alegria e carinho dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha esposa Kelly e minha filha Elisa, que durante este período compreenderam e me apoiaram durante a minha ausência.

Agradeço aos meus pais, Sergio e Enite pelo apoio e incentivo (e empréstimo do carro). Aos meus irmãos Anderson e Viviam pela amizade e incentivo.

Aos amigos e colegas do IMEGEM, pela amizade e ensinamentos que me proporcionaram.

Aos colegas do laboratório de DNA.

Aos orientadores: Jefferson Luís Meirelles Coimbra, Altamir Frederico Guidolin, Sérgio Dias Lannes e Mário Ângelo Vidor.

À Epagri, que me proporcionou esta oportunidade.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e aos Professores do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, que depois de dezessete anos, proporcionaram este retorno, e a oportunidade de rever e conviver novamente com antigos colegas e professores.

À Embrapa pelo apoio financeiro através de concessão de bolsa de mestrado.

Ao pesquisador Gilberto Luiz Dalagnol, pelo auxílio.

À Estação Experimental da Epagri de Ituporanga e de Lages por colaborarem na instalação dos experimentos.

Àqueles que muitas vezes me socorreram: Juliano, Leiri, Naine, Carmelice, Ediane, Jaqueline, Tomás, Fabiani.

À Estela Maris Camargo Bernardelli pelo apoio.

A Deus, por ter colocado todas estas pessoas e oportunidades na minha vida.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma participaram comigo desta importante conquista.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

WAMSER, Gerson Henrique. **Divergência em genótipos de cebola**. 2011. 38 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

Considerando que a variabilidade genética é essencial para qualquer programa de melhoramento, um dos primeiros passos a ser dado pelo melhorista, é determinar a variabilidade disponível. Neste trabalho procurou-se determinar a divergência existente entre os genótipos estudados através de técnicas preditivas, ou seja, que têm por base as diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares, quantificadas em uma medida de dissimilaridade ou similaridade, que possa expressar o grau de diversidade genética entre os possíveis genitores. Foram estudados quinze genótipos utilizados no estado de Santa Catarina: Super Superprecoce, Bela Vista, Baía Indaial, Crioula Roxa e Crioula Branca (Populações); Empasc 352 - Bola Precoce, Empasc 355 - Juporanga Epagri 362 Crioula Alto Vale e Epagri 363 - Superprecoce (Populações comerciais da Epagri); Bella Catarina, Bella Vista e Bella Dura (Híbridos comerciais da empresa Sakata); Boreal e Gauchinha (Populações comerciais da empresa Hortec); Catarina (população comercial da empresa Agritu). A primeira parte do trabalho foi dividida em dois experimentos, sendo realizados nas estações experimentais da Epagri de Ituporanga e de Lages. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados com três repetições em cada local. Foram avaliadas as seguintes características: *i*) comprimento do pseudocaule em cm; *ii*) número de folhas por pseudocaule; *iii*) diâmetro do pseudocaule em mm; *iv*) diâmetro do bulbo em cm; *v*) altura do bulbo em cm; *vi*) peso do bulbo em gramas; *vii*) relação altura: diâmetro do bulbo (valor obtido pela razão entre a altura do bulbo e o diâmetro); *viii*) produção total de bulbos em kg ha⁻¹; *ix*) forma do bulbo; *x*) porcentagem de florescimento e *xi*) porcentagem de bulbos podres. Foi realizada a análise da variância multivariada e elaborada uma matriz de dissimilaridade, com base na distância de Mahalanobis. As variáveis que mais contribuíram para a divergência foram a produção total de bulbos e comprimento do pseudocaule para o ambiente Ituporanga e porcentagem de florescimento e peso do bulbo para o ambiente Lages. O segundo experimento foi realizado no Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC – IMEGEM. Os genótipos foram semeados em casa de vegetação, sendo realizada a extração de DNA das plantas ainda jovens. Foram utilizados onze oligonucleotídeos iniciadores de 10 bases, que produziram trinta e cinco bandas, sendo vinte e oito polimórficas. Foi utilizado o coeficiente de Jaccard como medida de similaridade e o método de agrupamento UPGMA para a elaboração de um dendrograma de similaridade genética. Os resultados demonstraram que existe divergência entre os genótipos estudados, sendo Crioula Roxa e Bola Precoce os mais divergentes, com 0,27 de similaridade e os menos divergentes foram Bella Vista e Bella Dura, com 0,89 de similaridade.

Palavras-chave: *Allium cepa* L. Variabilidade. RAPD. Análise Multivariada.

ABSTRACT

WAMSER, Gerson Henrique. **Divergence in genotypes of onion**. 2011. 38 f. Dissertation (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

Considering that genetic variability is essential for any breeding program, one of the first steps to be taken by the breeder is to determine the genetic variability available. In this study sought to determine the divergence between the genotypes studied using predictive techniques, ie, those based on the morphological, physiological or molecular, quantified in a measure of similarity or dissimilarity, which can express the degree of genetic diversity among the possible parents. We studied fifteen genotypes used in the state of Santa Catarina: Super superprecoce, Bela Vista, Baia Indaial, Crioula Roxa and Crioula Branca (Populations); Empasc 352 - Bola Precoce, Empasc 355 - Juporanga, Epagri 362 Crioula Alto Vale and Epagri 363 - Superprecoce (commercial populations Epagri) Bella Catarina, Bella Vista and Bella Dura (Hybrid's commercial Sakata) Boreal and Gauchinha (Hortec Populations company's business); Catarina (population Agritu commercial company). The first part of the work was divided into two experiments were conducted in experimental stations of Epagri Ituporanga and Lages. The design was a randomized block design with three replications at each location. We evaluated the following characteristics: i) length of pseudostem in cm, ii) number of leaves per pseudostem iii) stem diameter in mm; iv) bulb diameter in cm, v) height of the bulb in cm; vi) weight bulb in grams; vii) ratio of height: diameter of the bulb (value obtained by the ratio between height and diameter of the bulb), viii) total production of bulbs in kg ha⁻¹, ix) bulb shape, x) flowering percentage and xi) percentage of rotten bulbs. We performed multivariate analysis of variance and produced a matrix of dissimilarity based on Mahalanobis distance. The variables that contributed most to the divergence were the production of bulbs and total length of the pseudostem to the environment Ituporanga and percentage of flowering and bulb weight of the environment Lages. The second experiment was conducted at the Institute of Molecular Genetics and Breeding of UDESC - IMEGEM. Genotypes were planted in the greenhouse, thus, the extraction of DNA from plants are young. We used eleven primers of 10 bases, which produce thirty and five bands, with twenty-eight polymorphic. We used the Jaccard index as a measure of similarity and UPGMA clustering method for the preparation of a dendrogram of genetic similarity. The results showed that there is divergence between the genotypes studied, Crioula Roxa and Bola Precoce the most divergent, with 0.27 similarity and were less divergent Bella Vista and Bella Dura with 0.89 similarity.

Keywords: *Allium cepa* L. Variability. RAPD. Multivariate Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Eletroforese em gel de agarose com o Primer OPA-01. 1 a 15 (genótipos de cebola); (-) (amostra controle sem DNA); M (marcador 100pb DNA ladder).....	29
Figura 2 -	Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo da análise de variância multivariada, por meio de quatro testes estatísticos, indicando os graus de liberdade do numerador (NGL) e do denominador (DGL) e a probabilidade para o teste de F para as variáveis avaliadas: comprimento do pseudocaule; número de folhas por pseudocaule; diâmetro do pseudocaule; diâmetro do bulbo; altura do bulbo; peso do bulbo; relação diâmetro/altura do bulbo; produção total de bulbos; forma do bulbo; porcentagem de florescimento; porcentagem de bulbos podres, dos quinze genótipos de cebola testados nos locais: Ituporanga e Lages (SC).....	17
Tabela 2 -	Teste multivariado dos efeitos simples: genótipo de cebola entre os locais Lages e Ituporanga juntamente com o teste F para comparação dos contrastes testados (C_1 a C_{15}) [*] pela estatística de Wilks, denominada de U.....	18
Tabela 3 -	Coefficientes canônicos padronizados (CCP) e a estatística da razão de verossimilhança (Λ) das onze variáveis respostas avaliadas nos genótipos de cebola estudados, separadamente para cada um dos quinze contrastes testados (C_1 a C_{15}) [*]	19
Tabela 4 -	Estimativa da contribuição das variáveis analisadas para estimar a dissimilaridade dos genótipos de cebola, utilizando o procedimento <i>Stepdisc</i> do SAS nos locais Ituporanga e Lages.	20
Tabela 5 -	Distância de Mahalanobis, utilizada como medida de distância dos genótipos de cebola para os ambientes Ituporanga (A) e Lages(B).....	22
Tabela 6 -	Genótipos de cebola avaliados, categoria e origem das sementes.	27
Tabela 7 -	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores de 10 bases de seqüência arbitrária (primers) utilizados na reação em cadeia da polimerase.	28
Tabela 8 -	Oligonucleotídeos iniciadores, número total de bandas, número total de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas	30
Tabela 9 -	Coefficientes de similaridade de Jaccard de 15 genótipos de cebola obtidos com a utilização de marcadores RAPD.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA E ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE, POR MEIO DA ANÁLISE MULTIVARIADA	13
2.1	RESUMO	13
2.2	ABSTRACT	14
2.3	INTRODUÇÃO.....	14
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
2.6	CONCLUSÕES	23
3	CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD	24
3.1	RESUMO	24
3.2	ABSTRACT	24
3.3	INTRODUÇÃO.....	25
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.6	CONCLUSÃO.....	33
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização da variabilidade genética é fundamental para os programas de melhoramento, pois tende a reduzir a vulnerabilidade das culturas a estresses bióticos e abióticos e, ao mesmo tempo pode acelerar o progresso genético para determinados caracteres (CUI et al., 2001).

A importância da diversidade genética está no fato dos cruzamentos envolvendo progenitores geneticamente dissimilares (com diferenças nas frequências alélicas) serem os mais convenientes para produzir maior variabilidade genética em gerações segregantes (FALCONER, 1987).

O estudo de características agronômicas de plantas cultivadas permite estimar a divergência genética do germoplasma disponível para fins de utilização em programas de melhoramento genético (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Segundo os mesmos autores existem duas maneiras de inferir sobre a diversidade genética: de forma preditiva e de forma quantitativa, sendo que as análises dialélicas, onde são necessários os cruzamentos entre genitores e sua posterior avaliação é de natureza quantitativa, enquanto as preditivas têm por base as diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares, quantificadas em alguma medida de dissimilaridade que possa expressar o grau de diversidade genética entre os genitores.

Quando diversos caracteres morfológicos de diferentes genótipos são medidos simultaneamente, aos pares, as distâncias de Mahalanobis (D^2) podem ser tomadas como estimativa da diversidade genética entre eles. Um método que tem sido muito utilizado para análise de agrupamento (conglomerção) é o UPGMA. Neste método o critério utilizado para a formação de grupos é a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo (ELIAS et al., 2007).

Vários autores têm utilizado descritores morfológicos na caracterização da variabilidade de diferentes germoplasmas (CUI et al., 2001; VIEIRA et al., 2009) em soja, (BARBIERI et al., 2005; BUZAR et al., 2007) em cebola e (MARIOT et al., 2008) em Espinheira-santa.

A utilização de marcadores moleculares na quantificação da divergência genética vem crescendo nos últimos anos, uma vez que se constituem em excelente ferramenta para a obtenção de informações genéticas contidas no genoma de um organismo (VIEIRA et al., 2005). Segundo os mesmos autores, em relação aos caracteres fenotípicos, os marcadores moleculares apresentam a vantagem de não sofrerem influência do ambiente, porém apresentam a desvantagem de acessarem o genoma como um todo, não somente as regiões responsáveis pela manifestação dos caracteres de interesse.

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Dentre os marcadores moleculares, o RAPD merece destaque pelo baixo custo, pela rapidez e pela facilidade de execução, especialmente quando se trabalha com um grande número de amostras (BORÉM e CAIXETA, 2006)

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), ao se utilizar o ensaio RAPD, é fundamental adotar três procedimentos básicos: a) otimização das condições da reação, principalmente no que se refere à quantidade e qualidade do DNA genômico utilizado; b) abordagem sistemática na utilização do ensaio RAPD mantendo constantes as condições de concentrações de reagentes e perfil térmico do termociclador; c) adoção de um nível adequado de estringência na seleção de quais bandas utilizar, buscando aquelas mais intensas e registrada por mais de uma pessoa, de maneira independente.

O objetivo deste trabalho foi verificar divergência entre genótipos de cebola com a utilização de marcadores morfológicos e moleculares.

2 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA E ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE, POR MEIO DA ANÁLISE MULTIVARIADA

2.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar genótipos de cebola cultivados em Santa Catarina e estimar a diversidade existente entre os mesmos. Para isto foram avaliados quinze genótipos de cebola em dois ambientes no estado, Ituporanga e Lages. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com três repetições em cada ambiente. As características avaliadas foram: comprimento do pseudocaule; número de folhas por pseudocaule; diâmetro do pseudocaule; diâmetro do bulbo; altura do bulbo; peso do bulbo; relação altura:diâmetro do bulbo; produção total de bulbos; forma do bulbo; porcentagem de florescimento e porcentagem de bulbos podres. Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada, que revelou efeito significativo para a interação genótipo x ambiente, fato que causou diferenças nos valores de dissimilaridade em cada local. Foi elaborada uma matriz de dissimilaridade utilizando a distância de Mahalanobis. Os caracteres morfológicos e agrônômicos utilizados foram suficientes para caracterizar os genótipos. Existe variabilidade entre os genótipos utilizados no cultivo de cebola no Estado de Santa Catarina e isto indica que os programas de melhoramento dispõem de uma ampla base genética para o desenvolvimento de novas cultivares.

Palavras-chave: *Allium cepa* L., genótipo x ambiente

2.2 ABSTRACT

This study had as objective to characterize onion genotypes grown in Santa Catarina and estimate the variability between them. To this were evaluated fifteen genotypes of onion in two locations in the state, Ituporanga and Lages. The experimental design used was a randomized block with three replications in each environment. The characteristics evaluated were length of pseudostem, number of leaves per pseudostem, stem diameter, bulb diameter, height of the bulb, bulb weight, ratio of height: diameter of the bulb; total production of bulbs, bulb shape, flowering percentage and percentage of rotten bulbs. The data were subjected to multivariate analysis of variance. The multivariate analysis of variance revealed significant effects for genotype-environment interaction, fact that was reflected in the values of dissimilarity in each location. Was prepared a matrix of dissimilarity using Mahalanobis distance. The morphological and agronomic traits used were sufficient to characterize the genotypes. There is variability among the genotypes of onions used in the cultivation in the State of Santa Catarina and this indicates that the breeding programs have an ample genetic base for the development of new cultivars.

Keywords: *Allium cepa* L., genotype x environment.

2.3 INTRODUÇÃO

A cebola é uma cultura olerícola de grande importância econômica para o Brasil, sendo a terceira hortaliça em área cultivada e superada apenas pela cultura da batata e do tomate. O Estado de Santa Catarina destaca-se como maior produtor nacional, com uma área plantada na safra 2009/2010 de 21.271 ha e uma produção de 454 mil toneladas, seguido pelos Estados da Bahia e São Paulo (EPAGRI/CEPA, 2010).

A maior parte da cebola cultivada hoje no estado é oriunda de cultivares de polinização aberta de ciclo precoce e médio, desenvolvidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), como por exemplo, a Empasc 352 Bola Precoce, Empasc 355 Juporanga, Epagri 362 Crioula Alto Vale e Epagri 363 Superprecoce. A utilização da variabilidade genética é fundamental para os programas de melhoramento, pois tende a aumentar a resistência das culturas a estresses bióticos e abióticos e, ao mesmo tempo pode acelerar o progresso genético para determinados caracteres (CUI et

al., 2001). A caracterização fenotípica dos genótipos constitui um importante subsídio para a escolha de genitores divergentes e complementares para o desenvolvimento de populações segregantes em programas de melhoramento genético de cebola, visando à diversificação de cultivares (BUZAR et al., 2007). De acordo, ainda, com os mesmos autores, quanto mais contrastantes forem os genitores dentro de um mesmo *pool* gênico, maior a tendência de encontrar variabilidade na população segregante.

Vários autores têm utilizado descritores morfológicos na caracterização da variabilidade de diferentes germoplasmas (BUZAR et al., 2007) em cebola (CUI et al., 2001) em soja e (MARIOT et al., 2008) em Espinheira-santa. Barbieri et al. (2005) observaram que os caracteres que mais contribuíram para a divergência entre acessos de cebola foram a cor da casca, o peso e a conservação pós-colheita dos bulbos e que o uso de caracteres morfológicos são suficientes para diferenciar as populações de cebola.

Para analisar a contribuição dos diversos descritores agronômicos na determinação da divergência genética pode ser adequado utilizar técnicas de análise multivariada. Este tipo de análise consiste na avaliação simultânea de vários caracteres e permite diferentes abordagens sobre os dados analisados, possibilitando esclarecer tanto a relação quanto o efeito de cada variável separadamente (COIMBRA et al., 2007). As técnicas multivariadas mais utilizadas são as de variáveis canônicas, dos componentes principais e das distâncias euclidiana e de Mahalanobis (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi caracterizar genótipos de cebola cultivados em Santa Catarina e estimar a diversidade existente entre os mesmos.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos na safra 2009/2010, na estação experimental da Epagri de Ituporanga (27° 25' S, 49° 38' W), com altitude de 475m e clima subtropical úmido (Cfa), segundo a classificação de Köppen e na estação experimental da Epagri de Lages (27°49' S e 50°19' W) com 913 m de altitude e clima temperado úmido (Cfb). Foram avaliados quinze genótipos de cebola cultivados no Estado de Santa Catarina, sendo assim categorizados: Super Superprecoce, Bela Vista, Baía Indaial, Crioula Roxa e Crioula Branca (Populações mantidas pela Epagri); Empasc 352 - Bola Precoce, Empasc 355 – Juporanga, Epagri 352 – Crioula Alto Vale e Epagri 363 - Superprecoce (Populações comerciais da Epagri); Bella Catarina, Bella Vista e Bella Dura (Híbridos comerciais da empresa Sakata);

Boreal e Gauchinha (Populações comerciais da empresa Hortec); Catarina (população comercial da empresa Agritu).

A condução dos experimentos seguiu as recomendações técnicas para a cultura (EPAGRI, 2000). O delineamento utilizado para ambos os experimentos foi de blocos casualizados com três repetições. As parcelas foram formadas por cinco linhas com três metros de comprimento, utilizando o espaçamento de 0,40m entre linhas, com dez plantas por metro linear, totalizando 150 plantas por parcela. A área útil consistiu das três linhas centrais da parcela descartando-se duas plantas de cada extremidade. A colheita foi realizada quando 60% das plantas estavam estaladas, sendo que os bulbos foram deixados por aproximadamente quinze dias a campo para a secagem das folhas (cura) e a seguir depositados em armazém convencional, na estação experimental da Epagri de Ituporanga.

As características avaliadas foram: *i*) comprimento do pseudocaule em cm; *ii*) número de folhas por pseudocaule; *iii*) diâmetro do pseudocaule em mm; *iv*) diâmetro do bulbo em cm; *v*) altura do bulbo em cm; *vi*) peso do bulbo em gramas; *vii*) relação altura: diâmetro do bulbo (valor obtido pela razão entre a altura do bulbo e o diâmetro); *viii*) produção total de bulbos em kg ha⁻¹; *ix*) forma do bulbo; *x*) porcentagem de florescimento e *xi*) porcentagem de bulbos podres. Para as avaliações utilizaram-se os descritores do *International Plant Genetic Resources Institute* - (IPGRI, 2001).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise da variância multivariada (Tabela 1), pode ser observado que o efeito da interação (genótipo x local) foi significativo pelo teste de F (Pr<0,05), evidenciando que o comportamento dos genótipos frente aos ambientes testados foi diferenciado. O efeito da interação genótipo x ambiente atua no comportamento diferencial dos genótipos frente às ambientes contrastantes. Pode inclusive levar os diferentes genótipos avaliados a uma grande diversidade de padrões e resultados (COIMBRA et al., 2009). Portanto, é importante que se conheça o quanto o ambiente influencia na expressão das características sob avaliação. De fato é observado na cultura da cebola, que o seu desenvolvimento é altamente dependente do clima, principalmente de fatores como o fotoperíodo e a temperatura. O produto final da cultura é o bulbo, sendo que o início da bulbificação ocorre quando as condições de luminosidade e temperatura ambiente são adequadas. Em situações em que estes fatores não atendam as necessidades da cultura, pode levar a uma não formação do bulbo e

conseqüentemente inviabilizar o cultivo. Portanto, é fundamental que os experimentos de seleção e avaliação de genitores elite, sejam feitos na região onde se pretende cultivar a nova variedade (LEITE, 2007).

Tabela 1- Resumo da análise de variância multivariada, por meio de quatro testes estatísticos, indicando os graus de liberdade do numerador (NGL) e do denominador (DGL) e a probabilidade para o teste de F para as variáveis avaliadas: comprimento do pseudocaule; número de folhas por pseudocaule; diâmetro do pseudocaule; diâmetro do bulbo; altura do bulbo; peso do bulbo; relação diâmetro/altura do bulbo; produção total de bulbos; forma do bulbo; porcentagem de florescimento; porcentagem de bulbos podres, dos quinze genótipos de cebola testados nos locais: Ituporanga e Lages (SC).

Efeito	Teste estatístico	NGL	DGL	Valor	Valor F
Genótipo	Lambda de Wilks	154	421	0,00004	6,00*
	Pillai's Trace	154	616	5,26797	3,68*
	Hotelling-Lawley	154	231	30,31700	8,74*
	Roy's Greatest Root	14	56	14,39740	57,59*
Local	Lambda de Wilks	11	46	0,06292	62,27*
	Pillai's Trace	11	46	0,93707	62,27*
	Hotelling-Lawley	11	46	14,89140	62,27*
	Roy's Greatest Root	11	46	14,89140	62,27*
Genótipo x Local	Lambda de Wilks	154	421	0,00004	2,19*
	Pillai's Trace	154	616	5,26797	1,88*
	Hotelling-Lawley	154	231	30,31700	2,45*
	Roy's Greatest Root	4	56	14,39740	11,85*

* Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Para verificar o comportamento dos genótipos frente aos locais avaliados, foram realizados contrastes multivariados. Os resultados evidenciaram que todos os contrastes foram significativos, com exceção do C₁₄ (contraste do genótipo Branca nos dois ambientes) e C₁₅ (contraste do genótipo Gauchinha nos dois ambientes) que apresentaram comportamento semelhante nos dois locais (Tabela 2). Tal resultado pode indicar um efeito significativo da interação genótipo x ambiente para a maioria dos genótipos avaliados e que o comportamento apresentado pelos genótipos “Branca” e “Gauchinha” merece ser melhor estudado, pois estes genótipos podem ser úteis no desenvolvimento de novas variedades que apresentem ampla adaptação às diferentes condições edafoclimáticas frequentemente encontradas no estado de Santa Catarina.

Tabela 2- Teste multivariado dos efeitos simples: genótipo de cebola entre os locais Lages e Ituporanga juntamente com o teste F para comparação dos contrastes testados (C₁ a C₁₅) * pela estatística de Wilks, denominada de U.

Efeito	Valor	Pr>F
C ₁ : Super Superprecoce (Lages vs Ituporanga)	0,5198	0,0006
C ₂ : Bela Vista (Lages vs Ituporanga)	0,3184	0,0001
C ₃ : Epagri 363 - Superprecoce (Lages vs Ituporanga)	0,3129	0,0001
C ₄ : Baía Indaial (Lages vs Ituporanga)	0,3511	0,0001
C ₅ : Empasc 352 - Bola Precoce (Lages vs Ituporanga)	0,4748	0,0001
C ₆ : Empasc 355 - Juporanga (Lages vs Ituporanga)	0,3374	0,0001
C ₇ : Epagri 362 - Crioula Alto Vale (Lages vs Ituporanga)	0,3095	0,0001
C ₈ : Bella Catarina (Lages vs Ituporanga)	0,3469	0,0001
C ₉ : Bella Vista (Lages vs Ituporanga)	0,3211	0,0001
C ₁₀ : Bella Dura (Lages vs Ituporanga)	0,2426	0,0001
C ₁₁ : Boreal (Lages vs Ituporanga)	0,4773	0,0001
C ₁₂ : Catarina (Lages vs Ituporanga)	0,3873	0,0001
C ₁₃ : Crioula Roxa (Lages vs Ituporanga)	0,6456	0,0245
C ₁₄ : Crioula Branca (Lages vs Ituporanga)	0,6974	0,079
C ₁₅ : Gauchinha (Lages vs Ituporanga)	0,7466	0,1971

*C₁ a C₁₅: Contrastes realizados com cada genótipo nos dois locais.

A partir dos valores dos coeficientes canônicos padronizados (CCP) foi possível identificar quais variáveis contribuíram para significância dos contrastes realizados (Tabela 3). Pode ser observado que nos contrastes realizados, as variáveis: número de folhas por pseudocaule, altura do bulbo, peso do bulbo e porcentagem de bulbos podres apresentaram valores positivos, enquanto que as variáveis: comprimento do pseudocaule, diâmetro do pseudocaule, relação diâmetro: altura do bulbo, produção total de bulbos, forma do bulbo e porcentagem de florescimento apresentaram valores negativos ou valores positivos muito baixos. De acordo com Amarante et al. (2006) valores positivos para os CCP, indicam efeito de diferenciação entre os tratamentos, enquanto os valores negativos expressam a similaridade.

Tabela 3 - Coeficientes canônicos padronizados (CCP) e a estatística da razão de verossimilhança (Λ) das onze variáveis respostas avaliadas nos genótipos de cebola estudados, separadamente para cada um dos quinze contrastes testados (C_1 a C_{15})^{*}

Contrastes ²	Variáveis ¹											Λ
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	l	
C_1	-0,57	2,40	-0,30	-1,40	2,66	-2,38	-2,16	0,91	0,20	1,23	-0,08	0,51 [*]
C_2	0,32	1,92	-0,35	-0,59	0,16	-0,01	-0,52	0,53	0,32	1,09	0,26	0,31 [*]
C_3	-1,08	3,42	-0,14	-4,89	4,06	0,61	-3,16	-0,29	0,24	0,39	0,77	0,31 [*]
C_4	-0,98	3,59	-0,45	-4,10	3,43	0,66	-2,50	-0,19	0,26	0,17	0,84	0,35 [*]
C_5	-0,27	2,83	-0,42	-3,34	2,41	1,36	-2,25	-0,63	0,26	0,72	0,38	0,48 [*]
C_6	-0,73	3,26	-0,26	-4,28	1,53	4,44	-1,25	-1,15	0,17	-1,01	0,48	0,33 [*]
C_7	-0,79	3,73	-0,46	-5,39	2,90	3,28	-2,38	-0,83	0,08	-1,09	0,59	0,30 [*]
C_8	0,32	3,59	-0,04	-2,31	1,31	0,75	-1,04	-1,08	-0,00	0,01	0,33	0,34 [*]
C_9	0,29	3,05	0,45	-1,22	0,18	1,25	-0,48	-0,72	0,41	-0,32	0,17	0,32 [*]
C_{10}	-0,57	2,83	-0,55	-5,26	3,10	3,59	-2,39	-1,22	0,27	-0,03	1,06	0,24 [*]
C_{11}	0,65	3,17	-0,89	3,36	-2,24	-0,26	1,68	0,52	-0,11	-0,47	0,35	0,47 [*]
C_{12}	0,20	3,16	-0,66	-1,72	0,18	3,17	-0,44	-0,79	-0,08	-0,44	0,41	0,38 [*]
C_{13}	0,16	-2,63	0,42	1,43	-0,86	-0,34	0,85	0,30	0,33	0,48	0,84	0,64 [*]
C_{14}	-2,03	1,98	-0,22	-6,83	5,69	1,93	-4,24	-0,63	-0,33	-0,02	1,29	0,69 ^{ns}
C_{15}	-1,61	1,00	-1,07	-3,42	0,20	6,71	0,58	-1,00	-0,21	-0,55	0,72	0,74 ^{ns}

¹/a: comprimento do pseudocaule; b: número de folhas por pseudocaule; c: diâmetro do pseudocaule; d: diâmetro do bulbo; e: altura do bulbo; f: peso do bulbo; g: relação diâmetro/altura do bulbo; h: produção total de bulbos; i: forma do bulbo; j: porcentagem de florescimento; l: porcentagem de bulbos podres.

²/ C_1 a C_{15} : Contrastes realizados com todos os genótipos nos dois locais.

Portanto, valores positivos indicam que a característica analisada contribuiu para que os genótipos apresentem comportamento diferenciado em cada ambiente. Por outro lado, valores negativos indicam que a característica contribuiu para que os contrastes não fossem significativos, ou seja, a característica apresentou uma expressão fenotípica semelhante nos dois ambientes. Pode-se observar também que os resultados apresentados na Tabela 3 explicam a significância dos contrastes realizados. Por exemplo, o contraste da cultivar branca (C_{14}) e o contraste da cultivar gauchinha (C_{15}) apresentaram valores negativos para a maioria das características avaliadas.

Como o efeito da interação genótipo x ambiente foi significativo, a expressão fenotípica das características avaliadas foi diferente para os dois locais (Tabela 4). Por exemplo, para o local Ituporanga as variáveis, produção total de bulbos e comprimento do pseudocaule,

tiveram a maior contribuição na dissimilaridade entre os genótipos. Já em Lages foram os caracteres porcentagem de florescimento, peso do bulbo que apresentaram maior contribuição. Portanto, em estudos de divergência genética, a escolha das características a serem avaliadas, muitas vezes pode não apresentar a mesma relevância em diferentes ambientes.

Tabela 4- Estimativa da contribuição das variáveis analisadas para estimar a dissimilaridade dos genótipos de cebola, utilizando o procedimento *Stepdisc* do SAS nos locais Ituporanga e Lages.

Local	Variável	R-square	Pr>F
Ituporanga	Produção total de bulbos	0,8655	0,0001
	Comprimento do pseudocaule	0,8484	0,0001
	Altura do bulbo	0,7862	0,0001
	Porcentagem de florescimento	0,7416	0,0001
	Folhas por pseudocaule	0,7367	0,0001
	Porcentagem de bulbos podres	0,6028	0,0144
	Diâmetro do bulbo	0,5876	0,0263
	Peso do bulbo	0,6363	0,0120
	Diâmetro do pseudocaule	0,5889	0,0428
	Forma do bulbo	0,6019	0,0436
	Relação diâmetro/altura do bulbo	0,5588	0,1099
Lages	Porcentagem de florescimento	0,8482	0,0001
	Peso do bulbo	0,8111	0,0001
	Comprimento do pseudocaule	0,6939	0,0008
	Porcentagem de bulbos podres	0,6936	0,0012
	Relação diâmetro/altura do bulbo	0,7254	0,0006
	Folhas por pseudocaule	0,7086	0,0016
	Diâmetro do pseudocaule	0,5299	0,1114
	Altura do bulbo	0,5513	0,0996

Dentre os diversos fatores de ambiente que podem ter contribuído para o resultado diferenciado nos dois locais pode-se destacar a influência da temperatura, que se manifesta em diversos aspectos da cultura: seja na capacidade de absorção de nutrientes, no ciclo e na indução do florescimento. De acordo com a classificação climática do Estado de Santa

Catarina – Koeppen, a classificação climática de Ituporanga é de Clima Subtropical Úmido (Cfa) onde a temperatura média do mês mais quente é maior que 22°C e a temperatura média do mês mais frio situa-se entre 10 e 15°C. Já para Lages a classificação climática é de Clima Temperado Úmido (Cfb), onde a temperatura média do mês mais quente é menor do que 22°C e a temperatura média do mês mais frio situa-se entre -3 e 18°C. Segundo Costa et al. (2002), sob condições prolongadas de temperaturas baixas, em torno de 12° C, pode ser induzido o florescimento prematuro. Tal fato pode ter ocorrido no ambiente Lages, em virtude das baixas temperaturas e o caráter florescimento ter maior contribuição para a variabilidade total do experimento.

Outra característica importante em Lages foi o maior peso do bulbo, o que pode ser explicado pela alta fertilidade do solo encontrada na área utilizada para o experimento, que, mesmo com a adubação sendo realizada conforme as recomendações técnicas teria favorecido o maior desenvolvimento dos bulbos pelos genótipos com maior potencial produtivo. Já para o ambiente Ituporanga a produção total de bulbos, que apresentou o maior valor, pode ter sido ocasionada por um número diferente de plantas por parcela, em função de perdas de plantas ou mesmo plantio não uniforme. Portanto, esta característica precisa ser melhor avaliada em outros trabalhos. O caráter comprimento do pseudocaule teve uma contribuição importante na dissimilaridade dos genótipos nos dois locais, em discordância com resultados obtidos por Buzar et al. (2007). Tal fato pode ser explicado pelo fato deste autor ter avaliado características diferentes das apresentadas neste trabalho e também pela influência do ambiente.

Para estimar a divergência entre os genótipos foi utilizada a distância de Mahalanobis como medida de dissimilaridade (Tabela 5). Houve diferenças nas medidas de dissimilaridade entre os dois ambientes. Em Ituporanga os valores foram maiores, chegando a 38,16 entre os genótipos “Roxa” e “Bella Catarina”. Doze medidas de distâncias entre os genótipos tiveram valores não significativos. Já em Lages o maior valor foi de 16,41 entre os genótipos “Boreal” e “Crioula” e 21 medidas de distância não foram significativas. Diante destes resultados pode-se dizer que o ambiente Ituporanga discriminou melhor os genótipos.

Tabela 5 - Distância de Mahalanobis, utilizada como medida de distância dos genótipos de cebola para os ambientes Ituporanga (A) e Lages(B)

Genótipo ¹	Local		Genótipo	Local		Genótipo	Local	
	A	B		A	B		A	B
1 - 2	1,33	2,06	3 - 12	2,32*	5,87*	7 - 9	3,77*	9,21*
1 - 3	6,51*	5,42*	3 - 13	17,07*	6,77*	7 - 10	14,41*	11,70*
1 - 4	3,62*	1,01	3 - 14	19,95*	7,52*	7 - 11	10,16*	16,41*
1 - 5	3,67*	0,95	3 - 15	5,95*	10,21*	7 - 12	5,99*	7,22*
1 - 6	12,48*	10,75*	4 - 5	5,05*	0,73	7 - 13	21,60*	6,38*
1 - 7	13,87*	13,84*	4 - 6	7,42*	6,75*	7 - 14	24,09*	6,76*
1 - 8	18,59*	0,75	4 - 7	9,08*	9,47*	7 - 15	10,08*	9,70*
1 - 9	8,75*	2,48	4 - 8	10,03*	1,46	8 - 9	10,81*	3,29*
1 - 10	2,84*	3,92*	4 - 9	5,91*	1,24	8 - 10	19,82*	4,52*
1 - 11	2,46*	2,45*	4 - 10	3,08*	2,38*	8 - 11	14,31*	5,15*
1 - 12	3,75*	3,33*	4 - 11	2,23	2,44*	8 - 12	15,24*	4,17*
1 - 13	9,63*	8,14*	4 - 12	4,30*	2,19	8 - 13	38,16*	7,53*
1 - 14	8,20*	7,74*	4 - 13	19,02*	5,98*	8 - 14	37,52*	6,69*
1 - 15	5,49*	7,04*	4 - 14	18,10*	5,66*	8 - 15	21,03*	7,11*
2 - 3	4,11*	6,16*	4 - 15	8,82*	5,85*	9 - 10	7,73*	2,03
2 - 4	4,45*	1,73	5 - 6	9,20*	7,84*	9 - 11	4,37*	2,38*
2 - 5	1,62	1,74	5 - 7	12,62*	11,15*	9 - 12	1,62	1,25
2 - 6	9,92	10,32*	5 - 8	23,68*	2,26	9 - 13	15,63*	5,90*
2 - 7	11,14*	14,70*	5 - 9	6,07*	0,83	9 - 14	17,57*	4,90*
2 - 8	20,83*	3,21*	5 - 10	2,31	1,86	9 - 15	4,75*	3,35*
2 - 9	5,95*	2,93*	5 - 11	2,96*	1,09	10 - 11	3,07*	3,45*
2 - 10	2,90*	2,88*	5 - 12	2,47*	1,05	10 - 12	4,33*	2,02
2 - 11	1,60	3,30*	5 - 13	8,24*	6,29*	10 - 13	11,04*	8,48*
2 - 12	1,61	3,97*	5 - 14	9,49*	5,93*	10 - 14	10,11*	4,92*
2 - 13	7,98*	11,23*	5 - 15	3,77*	4,37*	10 - 15	6,34*	4,64*
2 - 14	7,64*	9,43*	6 - 7	1,69	0,79*	11 - 12	1,78	2,73*
2 - 15	2,77*	8,88*	6 - 8	10,31*	9,41*	11 - 13	12,78*	8,95*
3 - 4	4,19*	3,47*	6 - 9	3,49*	5,99*	11 - 14	11,94*	7,88*
3 - 5	4,08*	5,68*	6 - 10	10,48*	8,40*	11 - 15	3,36*	5,65*
3 - 6	4,87*	3,36*	6 - 11	9,37*	12,55*	12 - 13	9,44*	4,30*
3 - 7	5,50*	3,97*	6 - 12	5,75*	4,79*	12 - 14	10,47*	4,02*
3 - 8	14,06*	3,84*	6 - 13	19,38*	6,03*	12 - 15	1,89	2,28
3 - 9	2,91*	5,22*	6 - 14	22,01*	6,30*	13 - 14	1,69	2,25
3 - 10	7,20*	6,84*	6 - 15	9,69*	7,98*	13 - 15	5,89*	3,75*
3 - 11	3,61*	10,06*	7 - 8	9,26*	11,62*	14 - 15	6,71	1,86*

*: significativo a 5% de probabilidade de erro.

¹: 1- Super Superprecoce; 2- Bela Vista; 3-Superprecoce; 4-Baia Indaial; 5- Bola Precoce; 6-Juporanga; 7-Crioula; 8-Bella Catarina; 9-Bella Vista; 10-Bella Dura; 11-Boreal; 12-Catarina; 13-Crioula Roxa; 14-Crioula Branca; 15-Gauchinha

Desta maneira pode-se dizer que para o ambiente Ituporanga os cruzamentos entre o genótipo “Bella Catarina” e “Roxa” ou “Branca” podem proporcionar uma população segregante com genes de interesse. Visto que estes dois últimos genótipos não apresentam boas características agronômicas pode-se recomendar o cruzamento da “Bella Catarina” com os genótipos “Gauchinha”, “Catarina” e “Boreal”, que são cultivares com boa aceitação comercial. Já para o ambiente Lages os cruzamentos mais divergentes seriam entre os genótipos “Boreal” e “Crioula” ou “Boreal” e “Juporanga”. Outra possibilidade seria o cruzamento entre “Crioula” e “Bela Vista”.

2.6 CONCLUSÕES

Os caracteres morfológicos e agronômicos utilizados foram suficientes para caracterizar os genótipos.

Existe variabilidade entre os genótipos utilizados no cultivo de cebola no Estado de Santa Catarina.

As variáveis analisadas sofreram influência do ambiente, produzindo resultados diferentes nos dois locais.

3 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

3.1 RESUMO

Foi avaliada a divergência genética entre quinze genótipos de cebola cultivados em Santa Catarina com a utilização de marcadores moleculares RAPD. Foram utilizados 11 oligonucleotídeos iniciadores da série Operon Technologies que produziram 35 marcadores, sendo 28 polimórficos. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídeo. A partir dos dados moleculares obtidos foi construída uma matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Para melhor visualização da similaridade genética gerou-se um dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA. Utilizando o coeficiente de similaridade 0,6 como ponto de corte, foram formados três grupos. O primeiro grupo reuniu os genótipos Super Superprecoce e Gauchinha. O segundo grupo reuniu doze genótipos, sendo que os genótipos Bella Vista e Bella Dura foram os que apresentaram o maior coeficiente de similaridade, em torno de 0,89, e também Bela Vista e Superprecoce e Catarina e o híbrido Bella Vista, ambos com 0,88. O terceiro grupo apresentou apenas o genótipo Crioula Roxa, que obteve o menor valor para o coeficiente de similaridade, 0,31, comparativamente. Tendo em vista os resultados obtidos, sugere-se o cruzamento entre os genótipos do primeiro e segundo grupo. Por exemplo, Juporanga x Super Superprecoce, Crioula x Gauchinha, Bela Vista x Gauchinha, que apresentam maior divergência entre si. A técnica de RAPD mostrou-se eficaz na caracterização molecular dos genótipos de cebola, evidenciando que existe variabilidade entre os genótipos estudados.

Palavras-chave: *Allium cepa* L., UPGMA, Coeficiente de Jaccard, divergência genética.

3.2 ABSTRACT

Were evaluated the genetic similarity between fifteen onion genotypes grown in Santa Catarina using RAPD markers. Were used 11 primers from Operon Technologies series that

produced 40 markers, 31 were polymorphic. The amplification products were visualized on 1.4% agarose gel stained with ethidium bromide. From the molecular data was constructed a similarity matrix using the Jaccard coefficient. To better visualize the genetic similarity dendrogram was generated using a clustering method UPGMA. Using the similarity coefficient 0.6 as the cutoff point, three groups were formed. The first group met genotypes Super Superprecoce and Gauchinha. The second group met twelve genotypes, and genotypes Bella Vista and Bella Dura showed the largest similarity coefficient, around 0.89, and also Bela Vista and Superprecoce and Catarina and Bella Vista, both with 0.88 . The third group showed only genotype Crioula roxa, which had the lowest value for the similarity coefficient, 0.31, comparatively. Considering these results, we suggest a cross between the genotypes of the first and second group. For example, Juporanga x Super Superprecoce, Crioula x Gauchinha, Gauchinha x Bela Vista, with the greatest divergence among them. The RAPD technique proved effective in the molecular characterization of genotypes of onion, showing that differences among genotypes.

Keywords: *allium cepa* L., UPGMA, Jaccard Coefficient, genetic divergence.

3.3 INTRODUÇÃO

A cebola, *Allium cepa* L. é originária das regiões que compreendem o Afeganistão, Irã e partes do sul da antiga União Soviética (COSTA et al., 2002). É uma das plantas cultivadas de mais ampla difusão no mundo, sendo consumida por quase todos os povos do planeta, independente da origem étnica e cultural, constituindo-se em um importante elemento de ocupação de mão-de-obra familiar (BOITEUX e MELO, 2004). A partir de acessos de cebola introduzidos da Europa foram selecionadas as populações Baia Periforme, no Rio Grande do Sul e Crioula, em Santa Catarina, onde o grupo Baia Periforme se caracteriza por sua ampla adaptação às condições de cultivo no Brasil, boa tolerância às principais doenças da cultura e boa conservação pós-colheita, enquanto as cultivares do grupo Crioula são mais adaptadas à região Sul, apresenta bulbos de coloração amarelo escuro, ótima conservação pós colheita e ampla aceitação no mercado (BUZAR et al., 2007). No Estado de Santa Catarina, por meio do isolamento geográfico natural das áreas agrícolas, houve conservação da diversidade genética da população Crioula, a partir da qual é possível obter-se populações

melhoradas em relação à resistência às doenças, ciclo vegetativo, formato coloração e conservação dos bulbos (BOFF et al., 1999).

Quanto às técnicas de melhoramento pode-se afirmar que os híbridos são mais uniformes e seu desenvolvimento tem sido uma tendência nos programas de melhoramento, no entanto, as cultivares de polinização aberta continuam importantes, pois possuem uma base genética mais ampla que os híbridos, podendo ser melhor adaptadas sob condições adversas (LEITE, 2007.)

Visando determinar a divergência genética em cebola, vários autores têm utilizado descritores morfológicos, moleculares e bioquímicos, como exemplo: Barbieri et al. (2005), com marcadores morfológicos; Buzar et al. (2007), com descritores morfológicos, agrônômicos e bioquímicos; Leite e Anthonisen (2009) e Maniruzzaman et al. (2010), com RAPD; Santos et al. (2010), com microssatélites; Santos et al. (2011) com AFLP. A tendência atual do melhoramento genético é a utilização e a integração das metodologias tradicionais com as modernas técnicas biotecnológicas (LEITE e ANTHONISEN, 2009).

Um dos marcadores moleculares mais utilizados é o RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), por ser uma técnica rápida e de custo relativamente baixo, porém com razoável potencial informativo (AREIAS et al., 2006). Dentre as vantagens dos marcadores RAPD estão: a) envolve um processo simples e rápido; b) um conjunto único e universal de oligos arbitrários pode ser utilizado e rapidamente rastreado em vários organismos; c) a análise pode ser feita em gel de agarose; d) não requer sondas isoladas; e) uma menor quantidade de DNA é utilizada; f) mais sensível na detecção de polimorfismo ao nível de DNA, quando comparado aos RFLPs e isoenzimas; g) menor custo da técnica (OLIVEIRA et al., 2007). Por outro lado, um número de aspectos negativos faz a análise de RAPD uma técnica difícil de ser padronizada, com variabilidade nos resultados tendo os seguintes itens discutidos sobre a validade da técnica: a) competição entre produtos; b) reprodutibilidade; c) homologia dos produtos; d) estrutura do primer; e) dominância; f) formação de heteroduplex; g) variação alélica; e h) amostragem genômica (BINNECK, et al., 2002).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a similaridade existente entre genótipos de cebola cultivados no Estado de Santa Catarina utilizando marcadores RAPD.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados quinze genótipos de cebola (Tabela 6). Para tanto foi extraído o DNA de plantas jovens, cultivadas em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC em Lages, SC. As plantas coletadas foram imediatamente liofilizadas e em seguida armazenadas em freezer com temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O protocolo de extração de DNA utilizado foi o CTAB 2 x (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998) com algumas modificações: utilização de 6000 RPM na primeira centrifugação e betamercaptoetanol a 2%. Após a extração, as amostras de DNA foram observadas em gel de agarose 1% para verificar a qualidade da extração e a seguir quantificadas em espectrofotômetro. Após a quantificação o DNA foi diluído para uma concentração de $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ em água estéril e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 6 - Genótipos de cebola avaliados, categoria e origem das sementes.

Genótipo	Categoria	Origem
Empasc 352 - Bola Precoce	População Comercial	Epagri
Empasc 355 - Juporanga	População Comercial	Epagri
Epagri 362 - Crioula Alto Vale	População Comercial	Epagri
Epagri 363 - Superprecoce*	População Comercial	Epagri
Super Superprecoce	População	Epagri
Bela Vista	População	Epagri
Baia Indaial	População	Epagri
Crioula Roxa	População	Epagri
Crioula Branca	População	Epagri
Bella Catarina	Híbrido	Sakata
Bella Vista	Híbrido	Sakata
Bella Dura	Híbrido	Sakata
Boreal	População Comercial	Hortec
Gauchinha	População Comercial	Hortec
Catarina	População Comercial	Agritu

*Nomes em negrito correspondem à denominação usual dos genótipos e podem ser utilizados no decorrer do artigo

Para as reações de amplificação foram testados 20 iniciadores de 10 bases da “Operon Technologies”, a fim de verificar aqueles que apresentassem amplificação, qualidade

e repetibilidade nos testes realizados, sendo que destes, foram selecionados onze iniciadores (Tabela 7). As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo de 2 minutos a uma temperatura de 94°C; três ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C (amplificação dos fragmentos proporcionando menor estringência); trinta e cinco ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 40°C e 2 minutos a 72°C (amplificação dos fragmentos com maior estringência) ; um ciclo com 5 minutos a 72°C para a finalização da extensão. As reações foram preparadas com um volume de 15 µL com os seguintes componentes e respectiva concentração: Tampão PCR 1X e MgCl 2,5 mM ; dNTPs 0,25 mM cada nucleotídeo; iniciador 0,4mM; Enzima *Taq* DNA polimerase 0,5 U; solução de DNA 40 ng; água qsp 15 µL.

Tabela 7- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de 10 bases de sequência arbitrária (primers) utilizados na reação em cadeia da polimerase.

Iniciador*	Seqüência dos nucleotídeos (5' -3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-06	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPB-04	GGACTGGAGT
OPB-12	CCTTGACGCA
OPC-04	CCGCATCTAC
OPC-05	GATGACCGCC
OPAM-13	CACGGCACAA
OPR-02	CACAGCTGCC
OPO-16	TCGGCGGTTC

*Nomenclatura dos oligonucleotídeos iniciadores de 10 bases de sequência arbitrária conforme denominação da Operon Technologies Inc., Alameda CA, USA, 1999.

A separação dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,4%, corado com brometo de etídio na concentração de 0,15 µg.mL⁻¹ de gel e submerso em tampão TBE 1X (Tris HCl, Ácido Bórico e EDTA). Aplicou-se 6 µL da reação juntamente com 1 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol). A separação foi realizada durante três horas, em cuba de eletroforese com uma tensão de 120V (5,0 V por centímetro). A eletroforese era encerrada após o tampão de carregamento percorrer 10 cm no gel, permitindo assim, uma boa separação dos fragmentos. O resultado da

eletroforese foi visualizado com o auxílio da luz ultravioleta e em seguida capturado com fotodocumentador.

A obtenção dos resultados foi através da observação da presença (1) ou ausência (0) de banda de cada marcador de cada primer, constituindo-se assim os dados moleculares binários. A presença de um marcador em mais de um indivíduo significa que os indivíduos partilham da mesma seqüência nos sítios de hibridização com o primer e que estes sítios são separados pelo mesmo número de pares de bases (BINNECK et al., 2002).

A partir da matriz binária gerada pelo conjunto de bandas observado (Figura 1), foi feita a estimativa das medidas de similaridade utilizando o Coeficiente de Jaccard, que mede a proporção de produtos presentes nos dois perfis de RAPD. O valor 0 significa nenhuma similaridade, enquanto valores próximos de 1 indicam maior similaridade entre os itens (DIAS, 2006). Em seguida, utilizando a matriz de similaridade e o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Mean), foi elaborado um dendrograma de similaridade entre os genótipos.

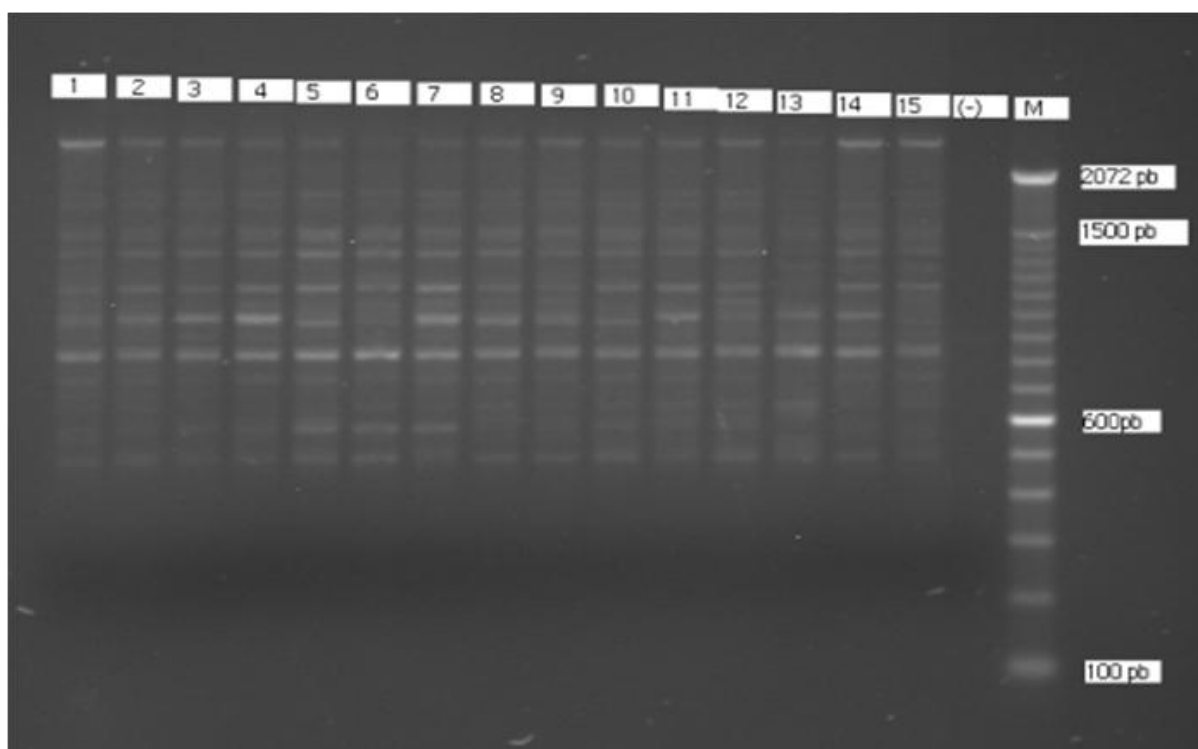


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose com o Primer OPA-01. 1 a 15 (genótipos de cebola); (-) (amostra controle sem DNA); M (marcador 100pb DNA ladder).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os onze iniciadores utilizados geraram 28 bandas polimórficas (80%) de um total de 35 bandas, perfazendo 3,18 bandas por iniciador (Tabela 8). Estes valores ficaram abaixo dos encontrados por Leite e Anthonisen, (2009) e Maniruzzamann et al. (2010) com 15 e 14 bandas por iniciador respectivamente, ambos em cebola. Por outro lado, Vieira e Nodari (2007), trabalhando com divergência genética em alho obtiveram 5,7 bandas por iniciador e Carvalho (2008) obteve 4,6 bandas por iniciador, trabalhando com a cultura do feijão. Tem sido constatado que o número médio de bandas ou marcadores polimórficos por iniciador é três (RAMALHO et al., 2008). No caso dos marcadores RAPD, uma grande vantagem que existe e que deve ser explorada pelo experimentador, é que muitos marcadores são gerados, o que permite uma flexibilidade para selecionar sempre aqueles mais robustos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). As diferenças encontradas no número de marcadores podem ser explicadas por Binneck et al. (2002), que sugerem que a competição entre produtos pode gerar bandas distintas e instáveis, tornando-se um reflexo direto do grau da competitividade do sítio e variando com fatores como a complementaridade ao primer e estruturas secundárias no DNA molde. Foram testados os efeitos de vários fatores sobre o padrão de bandas obtidas com marcadores RAPD em *A. sexdens rubropilosa*, sendo que os fatores mais relevantes para a obtenção de condições ótimas de amplificação dos fragmentos foram o programa de amplificação e a quantidade de DNA (CARVALHO e VIEIRA, 2001).

Tabela 8 – Oligonucleotídeos iniciadores, número total de bandas, número total de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas.

Iniciador*	Nº total bandas	Nº total de bandas polimórficas	% de bandas polimórficas
OPA-01	4	3	75
OPA-05	4	3	75
OPA-06	2	2	100
OPA-07	3	2	66
OPB-04	3	3	100
OPB-12	7	5	71
OPC-04	1	1	100
OPC-05	1	1	100
OPAM-13	6	4	66
OPR-02	3	3	100
OPO-16	1	1	100
Total	35	28	

Analisando os valores dos coeficientes de similaridade de Jaccard (Tabela 9), verifica-se que existe variabilidade entre os genótipos estudados. Os maiores valores encontrados foram entre os híbridos Bella Vista e Bella Dura, com o valor de 0,89 e entre Superprecoce e Bela Vista e também entre Catarina e Bella Vista com o valor de 0,88. O menor valor de similaridade foi entre os genótipos Super Superprecoce e Crioula Roxa, com 0,29. O coeficiente médio de similaridade de todo o experimento foi de 0,64. Outros pesquisadores que trabalharam com divergência em cebola, encontraram valores de similaridade semelhantes, por exemplo valores superiores a 0,39 com Santos et al. (2011) O genótipo Crioula Roxa apresentou o menor coeficiente de similaridade médio, sendo, portanto o mais divergente entre os genótipos estudados.

Tabela 9- Coeficientes de similaridade de Jaccard de 15 genótipos de cebola obtidos com a utilização de marcadores RAPD.

* 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	1,00														
2	0,71	1,00													
3	0,61	0,88	1,00												
4	0,53	0,68	0,78	1,00											
5	0,48	0,70	0,70	0,70	1,00										
6	0,50	0,59	0,57	0,57	0,81	1,00									
7	0,48	0,71	0,76	0,76	0,70	0,64	1,00								
8	0,58	0,57	0,57	0,65	0,52	0,61	0,58	1,00							
9	0,53	0,68	0,68	0,68	0,70	0,71	0,61	0,74	1,00						
10	0,55	0,70	0,70	0,70	0,71	0,73	0,63	0,67	0,89	1,00					
11	0,55	0,64	0,68	0,68	0,56	0,64	0,68	0,58	0,68	0,77	1,00				
12	0,53	0,78	0,78	0,68	0,70	0,64	0,68	0,65	0,88	0,79	0,68	1,00			
13	0,28	0,30	0,30	0,37	0,27	0,30	0,35	0,35	0,37	0,33	0,29	0,30	1,00		
14	0,58	0,83	0,83	0,83	0,75	0,61	0,73	0,70	0,74	0,75	0,65	0,74	0,29	1,00	
15	0,69	0,67	0,58	0,76	0,60	0,48	0,59	0,63	0,58	0,60	0,52	0,58	0,26	0,72	1,00

*Genótipos: 1- Super superprecoce; 2- Bela Vista; 3-Epagri 363 Superprecoce; 4-Baia Indaial; 5-Empasc 352 Bola Precoce; 6-Epagri 363 Juporanga; 7-Empasc 362 Crioula Alto Vale; 8-Bella Catarina; 9-Bella Vista; 10-Bella Dura; 11-Boreal; 12-Catarina; 13-Crioula Roxa; 14-Crioula Branca; 15-Gauchinha

Adotando como ponto de corte no dendrograma o coeficiente de similaridade de 0,6 observa-se a formação de três grupos principais (Figura 2). No primeiro grupo estão os genótipos Super Superprecoce e Gauchinha, sendo a Super Superprecoce uma população

selecionada e mantida pela Epagri e a Gauchinha uma população comercial da empresa Hortec. O segundo grupo engloba a maioria dos genótipos estudados. Neste grupo todos os genótipos apresentam coloração da casca de cor amarelada, à exceção do genótipo Crioula Branca, que é de uma população mantida pela Epagri, mas que não se sabe ao certo sua origem. Este genótipo apresenta coloração da casca de cor branca, ciclo precoce e baixa capacidade de armazenamento. Já os genótipos Bella Vista (9) e Bella Dura (10) foram os que agruparam mais próximos, com 0,89 de similaridade. São híbridos que pertencem à empresa Sakata e que apresentam características fenotípicas semelhantes com pequenas variações no ciclo vegetativo e no formato. Também agruparam próximos, Bela Vista (2) e Superprecoce (3), com 0,88 de similaridade. Superprecoce tem sua origem em quatro populações precoces originadas da cultivar Baia Periforme, sendo que foram feitas seleções anuais das plantas que apresentaram precocidade e os bulbos selecionados foram recombinados em campos isolados de polinização aberta (GANDIN et al., 1998). Já o genótipo Bela Vista foi selecionado no município de Ituporanga, SC sendo mantida pela Epagri e podendo ser lançada como uma variedade comercial.

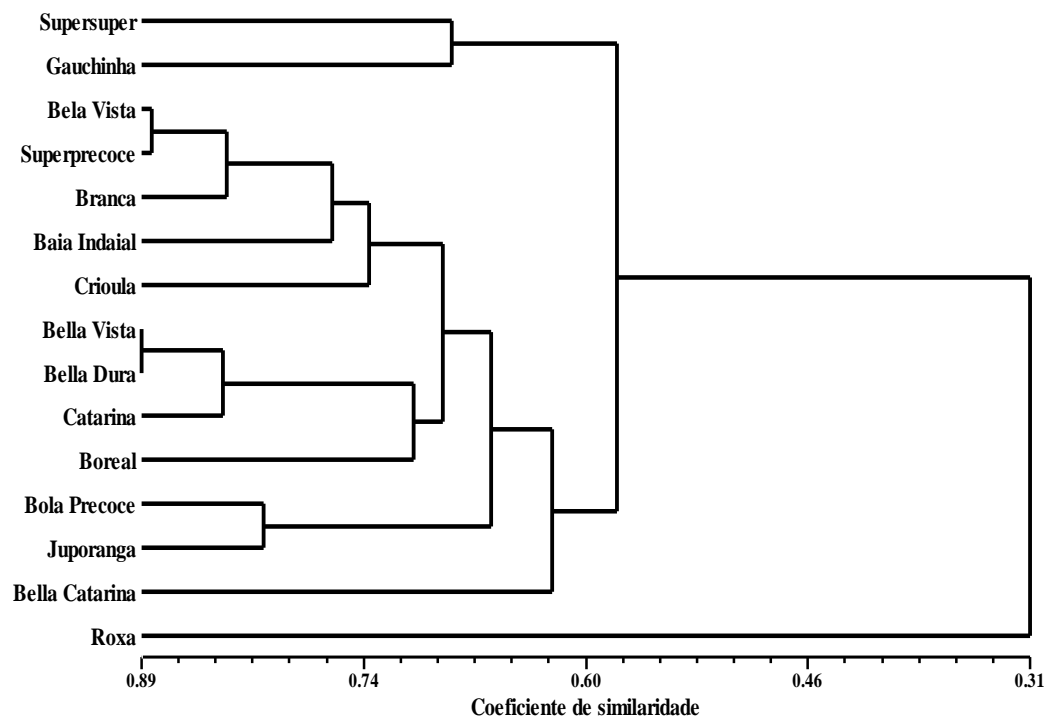


Figura 2 - Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard .

Finalmente, o genótipo Crioula Roxa, foi o que apresentou o menor índice de similaridade com relação aos demais apresentando o valor de 0,31. De modo semelhante, os autores Barbieri et al. (2005) utilizando marcadores morfológicos também agruparam o genótipo Crioula Roxa em um grupo separado dos demais, sendo que a cor da casca foi a característica que mais contribuiu para a divergência entre os genótipos. Em trabalho com a utilização de marcadores RAPD, os genótipos Crioula Roxa, Bola Precoce e Crioula foram agrupados com uma similaridade superior a 70% (LEITE e ANTHONISEN, 2009). Outros autores estudando a caracterização de genótipos de cebola quanto ao flavonóide quercetina, verificaram que o genótipo Crioula Roxa apresentou teores mais elevados deste flavonóide, em relação aos demais genótipos (LEITE et al., 2007).

Alguns genótipos apresentam menor similaridade, como é o caso do genótipo Crioula Roxa (0,31) e Super Superprecoce (0,54) e que podem ser utilizados em cruzamentos com os demais genótipos, buscando obter populações com maior variabilidade, permitindo a seleção de “tipos” com interesse agrônômico. Deve-se observar que bulbos de cor rósea, resultantes da redução da ‘anthocyanidin synthase’ (ANS), são indesejados em cultivares de cebola, derivadas de cruzamentos entre cebola de bulbos vermelhos x bulbos amarelos, principalmente (DINIZ et al., 2010). Sugere-se então o cruzamento entre os genótipos dos grupos um e dois, por exemplo, Juporanga x Super Superprecoce, Crioula x Gauchinha e Bela Vista x Gauchinha.

3.6 CONCLUSÕES

A utilização de marcadores RAPD foi suficientemente informativa para avaliar diversidade genética entre os genótipos de cebola utilizados em Santa Catarina demonstrando que existe variabilidade entre os genótipos estudados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos genótipos de cebola utilizados no estado de Santa Catarina terem sua origem nos acessos trazidos pelos colonizadores no fim do século XVIII, verifica-se o grande potencial genético dos mesmos. Com todo o avanço das técnicas de melhoramento vegetal, ainda hoje os cultivares mais utilizados são oriundos da seleção e de cruzamentos muitas vezes naturais entre estes acessos. Daí a grande adaptação destes genótipos às condições edafoclimáticas adversas encontradas em Santa Catarina, principalmente na Região do Alto Vale do Itajaí, onde se concentra a maior parte da produção no estado.

Portanto, é muito importante a caracterização e a conservação destes genótipos para verificar a variabilidade genética disponível e assim orientar futuras ações para o desenvolvimento de novas cultivares.

Os métodos utilizados para estimar esta variabilidade apresentaram diferenças nos resultados obtidos. A caracterização morfológica realizada nos ambientes Ituporanga e Lages produziu diferentes valores de dissimilaridade entre os genótipos, ou seja, o comportamento fenotípico foi diferenciado e a análise da variância multivariada indicou que a interação genótipo x ambiente foi significativa. Pode-se então sugerir que trabalhos de seleção em cebola sejam conduzidos na região para onde se deseja desenvolver uma nova cultivar, principalmente quando se tratar de ambientes muito contrastantes, pois como se viu, a cultura da cebola apresenta uma ampla capacidade de adaptação.

Com relação a caracterização molecular utilizando-se a técnica RAPD com os mesmos genótipos, esta apresentou novamente um resultado diferente do encontrado na caracterização morfológica nos dois ambientes. Apesar de ser uma técnica que investiga apenas a porção genotípica, apresenta também algumas limitações que foram citadas neste trabalho.

Mesmo com as dificuldades encontradas com as técnicas, pode-se observar que as cultivares utilizadas no estado de Santa Catarina, apresentam variabilidade e assim permitem o desenvolvimento de genótipos cada vez mais adaptados e que atendam às necessidades de produtores e consumidores.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C.V.T.; CHAVES, D.V.; ERNANI, P.R. Análise multivariada de atributos nutricionais associados ao “bitter pit” em maçãs “Gala”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.841-846, mai. 2006.
- AREIAS, R. G. B. M.; PAIVA, D.M.;SOUZA, S.R.; FERNANDES,M.S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteínas nos grãos. *Bragantia*, v. 65, n. 1, p. 19-28, 2006.
- BARBIERI,R.L.; LEITE, D.L.; CHOER, EVA; SINIGAGLIA, CLEIDIMARA; Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.303-308, mar-abr, 2005.
- BINNECK, E. NEDEL, J.L. ; DELLAGOSTIN,O. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 183-196, 2002.
- BOFF, P; GONÇALVES, P.A.; DEBARBA, J.F. Efeito de preparos caseiros no controle da queima-acinzentada, na cultura da cebola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.17, n. 2, p. 81-85,1999
- BOITEUX, L.S.; MELO, P.C.T. Taxonomia e origem. In: EMBRAPA HORTALIÇAS. Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.). Brasília: Embrapa-CNPQ. Sistemas de Produção, 5, ISSN 1678-____ Versão Eletrônica, 2004.
- BORÉM, A.,CAIXETA, E.T., editores. 2006. **Marcadores moleculares**.Viçosa, MG, 374p.
- BUZAR, A.G.R; OLIVEIRA, V.R.; BOITEUX, L.S. Estimativa da diversidade genética de germoplasma de cebola via descritores morfológicos, agronômicos e bioquímicos. **Horticultura Brasileira**, v.25, n. 4: p.527-532, out-dez, 2007.
- CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae).**Neotropical Entomology**, Londrina, v.4, n.30, p.593-600, 2001
- CARVALHO, M.F.; CRESTANI, M.;FARIAS,F.L.;COIMBRA, J.L.M.; BOGO,A.; GUIDOLIN,A.F.Characterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p. 1522-1528, set. 2008.

COIMBRA, J.L.M.; SANTOS, J.C.P.; ALVES, M.V.; BARZOTTO, I. Técnicas multivariadas aplicadas ao estudo da fauna do solo: contrastes multivariados e análise canônica discriminante. **Ceres**, v.54, n.313, p.270-276, 2007.

COIMBRA, J.L.M.; BERTOLDO, J.G.; ELIAS, H.T.; HEMP, S.; VALE, N.M.; TOALDO, D.; ROCHA, F.; BARILI, L.D.; GARCIA, S.H.; GUIDOLIN, A.F.; KOPP, M.M. Mineração da interação genótipo x ambiente em *Phaseolus vulgaris* L. para o Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.355-363x, mar-abr, 2009.

COSTA, N.D; LEITE, D.L; SANTOS, C.A.F; CANDEIA, J.A; VIDIGAL, S.M. Cultivares de cebola. **Informe Agropecuário**, v.23: p.20- 27. 2002.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, UFV, 2003. 579 p.

CUI, Z.; CARTER, T.E.; BURTON, J.W.; WELLS, R. Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. **Crop Science**, Saint Paul, v.41, p.1954-1967, 2001.

DIAS, L.A. dos S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006, cap. 9, p 405-475.

DINIZ, L.S.; SANTOS, C.A.F.; COSTA, S.R.; MEDEIROS, A.G. Identificação molecular de alelos para cor rósea em cultivares de cebola no vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira**, v.28, n.2 (Suplemento – CD Rom), jul. 2010 S2593-S2597.

ELIAS, H. T.; VIDIGAL, M. C. G.; GONELA, A.; VOGT, G. A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1443 – 1449, out. 2007.

EPAGRI. **Sistema de produção para cebola**: Santa Catarina. 3. rev. Florianópolis, 2000. 91p

EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2009-2010**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural/Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola – Epagri/Cepa, Florianópolis, SC, p.77-81

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 279 p.

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

GANDIN, C.L.; TOMAZELLI, L.F.; FILHO, A.A.Z.; NETO, J.S.; OLIVEIRA, S.O.; ROSSET, V.; BIASI, J.; GARCIA, A.; NETO, J.A.Z.; DEBARBA, J.F. Novas cultivares de cebola para Santa Catarina. *Revista Agropecuária Catarinense*. v.11, n.1, mar.1998, p 5-7

IPGRI, ECP/GR, AVRDC. **Descriptors for Allium (*Allium spp.*)**. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, European Cooperative for Crop Genetic Resources Networks (ECP/GR); Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, 2001. 43 p.

LEITE, D.L. Melhoramento genético de cebola. In: BARBIERI, R.L. (Ed.). **Cebola: ciência, arte e história**. 2. Ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p.77-113.

LEITE, D.L.; ANTHONISEN, D. Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores RAPD. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 4 p. 420-424, out-dez.2009.

MANIRUZZAMAN, M. et al. Molecular characterization of onion (*Allium cepa*) using RAPD markers. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 35, n. 2, p. 313-322, Junho 2010.

MARIOT, M.P. BARBIERI, R.L.; SINIGAGLIA, C.; RIBEIRO, M.V. Variabilidade em acessos de matrizes de Espinheira-santa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p. 351-357, mar-abr,2008.

OLIVEIRA, A.C.B.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, M.; SAKIYAMA, N.S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Documentos IAC, Campinas, n.81, 17 p. 2007.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 463p.

SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; RODRIGUES, M.A.; RIBEIRO, H.L.C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.1, p. 49-55, jan. 2010.

SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; RODRIGUES, M.A.; RIBEIRO, H.L.C.; SILVA, G.O. Similaridade genética entre cultivares de cebola de diferentes tipos e origens, baseada em marcadores AFLP. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 32-37, janeiro-março 2011.

VIEIRA, E.A. CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; BENIN, G.; ZIMMER, P.D.; SILVA, J.A.G.; MARTINS, A.F.; BERTANI, I.; SILVA, G.O.; SCHMIDT, D.A.M. Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia** v.64, n.1, p. 51-60, Campinas 2005.

VIEIRA, R.L.; NODARI, R.O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 51-57, jan-fev. 2007.

VIEIRA, E.S.N.; VON PINHO, E.V.R.; CARVALHO, M.G.G.; SILVA, P.A.. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, Londrina, p. 86-94, 2009.