

DANIEL LUCAS MAGALHÃES MACHADO

FENOTIPAGEM E GENOTIPAGEM DE POPULAÇÕES DE CEBOLA COM
DIFERENTES NÍVEIS DE ENDOGAMIA

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Doutorado, para obtenção do título de
“Doutor”.

Orientador:

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Coorientadores:

Dr. Joelson André de Freitas

Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M149f Machado, Daniel Lucas Magalhães, 1988
2018 Fenotipagem e genotipagem de populações de cebola com diferentes níveis de endogamia / Daniel Lucas Magalhães Machado. - 2018. 77 f. : il.

Orientador: José Magno Queiroz Luz.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.464>
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Cebola - Melhoramento genético - Teses. 3. Endogamia - Teses. 4. Sementes - Produção - Teses. I. Luz, José Magno Queiroz, . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

DANIEL LUCAS MAGALHÃES MACHADO

FENOTIPAGEM E GENOTIPAGEM DE POPULAÇÕES DE CEBOLA COM
DIFERENTES NÍVEIS DE ENDOGAMIA

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Doutorado, para obtenção do título de
“Doutor”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2018.

Melhorista, Dr. Joelson André de Freitas	BAYER
Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel	UFU
Profa. Dra. Ana Paula Oliveira Nogueira	UFU
Dra. Roberta Camargos de Oliveira	UFS

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Deus.
Criador de tudo que existe.
Sinônimo de toda forma de amor.

Aos meus pais Esio Euclides Machado e Liliam Fernandes de Lima Machado

E a meu avô Osvaldo Francisco da Abadia
in memoriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado tudo e o que foi necessário para o cumprimento desta fase da minha vida. A inteligência, a saúde, a persistência, e as pessoas que me ajudaram nesta caminhada.

À minha amada família, em especial meus pais Esio e Liliam e meus irmãos Rafael, Ana Cláudia, João Paulo e Júlia, por tudo que fizeram por mim e pelo amor incondicional. Pelo carinho, apoio e confiança de que eu iria chegar ao final de mais esta fase. Com uma família como vocês, com pais, irmãos, tios, primos e avós excepcionais, a jornada com certeza foi mais alegre e fácil.

À minha noiva Letícia, que sempre esteve próximo apoiando e incentivando, com conselhos e orações. Uma ótima companheira e amiga para toda a vida, te amo!

Ao meu orientador Maguinho, pelos ensinamentos, pelo tempo despendido em minha orientação e pelas conversas informais. Com certeza levarei deste tempo muito mais que apenas a tese.

Ao melhorista de cebola da Bayer Joelson André de Freitas por todos os ensinamentos, momentos de conversa e amizade, exemplo de profissional a ser seguido por mim, agradeço pela confiança, você foi essencial para realização deste trabalho.

À Bayer CropScience Vegetable Seeds, na figura do seu diretor de pesquisa Ailton Ribeiro, pela oportunidade de realização deste trabalho e vivência em uma empresa de excelência em pesquisa. Agradeço de coração a todos os demais melhoristas, funcionários de escritório e de campo.

Aos meus coorientadores e professores Ana Paula Oliveira Nogueira e Gabriel Maciel Mascarenhas, pela contribuição na melhoria deste trabalho.

A Roberta Camargos de Oliveira, por ter contribuído na melhoria deste trabalho e pelos ensinamentos durante a defesa da tese.

Agradezco mis tutoras de tesis en España, Cristina Mallor y Aurora Díaz, por la confianza de tenerme en su laboratorio en el Centro de Investigación Agroalimentaria de Aragón (CITA), realizando parte de esta investigación. Soy inmensamente agradecido y siempre recordaré a todos en Zaragoza.

À toda equipe do LAGEN (Laboratório de Análise de Sementes e Recursos Genéticos) pelo apoio nas análises moleculares RAPD, agradeço ao professor Gabriel Maciel Mascarenhas, professora Ana Carolina Silva Siquieroli e ao técnico Igor Forigo.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), cito aqui a técnica Mariana e a professora Ana Maria Bonetti.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de cursar o doutorado em Produção Vegetal.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, que a pesquisa não seja vista como um gasto e sim como um investimento.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

À todos os professores que tive em minha vida ofereço esta tese, minhas conquistas e caráter passa por vocês. Agradeço pela luta diária e pela motivação não monetária.

Aos companheiros de estação experimental Roberto, Letícia, Antônio Campos, Eduardo, Keila, Repeza, Júlio, Vagner, Cida, Paulo, Ana Paula, Cláudia, Ivan, Jean, Sr. Rubens, Marco Aurélio, Matheus.

Aos amigos, que aqui não cito nomes, porque graças a Deus são muitos, pelas experiências divididas e pelos bons momentos juntos. Foi um prazer ter suas companhias durante esse tempo. Que a vida nos reserve mais momentos assim.

Obrigado à todos!!

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”

Eduardo Galeano

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO 1- HIPÓTESES E REFERENCIAL TEÓRICO	7
3. CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE CEBOLA OBTIDAS DE DIFERENTES FORMAS DE CONDUÇÃO DAS GERAÇÕES	15
3.1 Abstract	16
3.2 Introdução	16
3.3 Material e métodos	18
3.4 Resultados e discussão	24
3.5 Conclusões	35
3.6 Referências	36
4. CAPÍTULO 3 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE CEBOLA (<i>Allium cepa</i> L.) OBTIDAS SOB DIFERENTES FORMAS DE CONDUÇÃO DAS GERAÇÕES	37
4.1 Abstract	38
4.2 Introdução	39
4.3 Material e métodos	40
4.4 Resultados e discussão	42
4.5 Conclusões	49
4.6 Referências	49
5. CAPÍTULO 4 - PHENOTYPIC, GENOTYPIC AND ENVIRONMENTAL CORRELATIONS BETWEEN CHARACTERS IN ONION SEGREGANT POPULATIONS OBTAINED UNDER DIFFERENT GENERATIONS	51
5.1 Abstract	52
5.2 Introduction	52
5.3 Materials and Methods.....	54
5.4 Results and Discussion	56
5.5 Conclusion.....	62
5.6 References.....	62
6. CAPÍTULO 5 - USO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO EFEITO ENDOGÂMICO EM CEBOLA	54
6.1 Abstract	55
6.2 Introdução	55
6.3 Material e métodos	57
6.4 Resultados e discussão	60
6.5 Conclusões	65
6.6 Referências	65
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

RESUMO GERAL

MACHADO, DANIEL LUCAS MAGALHÃES. **Fenotipagem e genotipagem de populações de cebola com diferentes níveis de endogamia**. 2018. 77f. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia). Universidade Federal de Uberlândia².

Resumo: A produção de híbridos de cebola depende do desenvolvimento de linhagens geneticamente puras. Tradicionalmente, o método de ‘pedigree’ (onde se aplica sucessivas autofecundações em nível de indivíduos), é o que garante uma rápida obtenção de linhas endogâmicas. No entanto como muitas espécies de polinização cruzada, a cebola sofre um forte processo de depressão por endogamia quando autofecundadas por várias gerações. A depressão por endogamia reduz o vigor da planta, o tamanho do bulbo e sua produção de sementes, o que acaba onerando o custo de produção da semente híbrida. Sabe-se que o inter cruzamento entre poucas plantas promove a diminuição da depressão por endogamia em populações naturais. Baseado no mesmo princípio, ainda que, se tratando de populações submetidos à seleção de indivíduos superiores, este trabalho tem o objetivo de elucidar se existe algum efeito de depressão por endogamia em linhas segregantes de cebola, obtidas pela autofecundação e pelo inter cruzamento de duas e três plantas. Para isso, utilizou-se para o estudo 33 populações de cebola, os tratamentos constituíram-se das diferentes formas de obtenção das populações (autofecundação de uma planta [A₁], inter cruzamento de duas [B₂] e três plantas [C₃]) em 11 diferentes *backgrounds* genéticos agrupados de acordo com o nível baixo ou médio de endogamia. Foram avaliadas em dois anos consecutivos (2014 e 2015), características agronômicas na fase vegetativa e reprodutiva da cultura, além de análises com marcadores RAPD’s e SSR’s. Os experimentos foram realizados na estação experimental da Bayer Vegetable Seeds em Uberlândia/MG. O vigor de plantas sofreu efeito de depressão por endogamia em gerações iniciais com maior heterosigosidade; assim como o contraste entre indivíduos autofecundados comparativamente aos advindos do inter cruzamento de duas ou três plantas foi mais pronunciado nas populações com menor nível endogâmico. O inter cruzamento de três plantas refletiu em maior produção de sementes/parcela nas populações com baixo nível endogâmico. A alteração no método de condução das gerações, através do *sib* de plantas, proporcionou maior divergência entre os genótipos. Características importantes, como produção de bulbos por parcela, pegamento de sementes, resistência à Alternária e produção de sementes por umbela, que podem ser usadas nas estimativas da divergência na seleção de linhas segregantes de cebola. Observou-se ainda, correlação genotípica positiva e significativa de 0,92 e 0,82, da porcentagem de pegamento de sementes e resistência a alternária, respectivamente com produção de sementes por umbela, indicando que o peso de sementes por umbela pode ser aumentado através da seleção para resistência a alternária e porcentagem de pegamento de sementes. Por fim, conclui-se que a depressão por endogamia não pode ser prontamente interpretada como devida a efeitos de homozigoticidade para mutações deletérias e que os microssatélites usados podem ser úteis para detectar variabilidade no germoplasma brasileiro de cebola. Os resultados sugerem que os *sibs* de duas e três plantas podem ser utilizados visando reduzir o efeito endogâmico em cebola, devendo iniciar em populações com nível baixo de endogamia para maior proveito do método.

Palavras-chave: inter cruzamento de plantas, linhas endogâmicas, autofecundação, marcador SSR em cebola.

¹Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz - UFU (Orientador) e Joelson André de Freitas – BAYER, Gabriel Maciel Mascarenhas – UFU (Co-orientadores).

GENERAL ABSTRACT

MACHADO, DANIEL LUCAS MAGALHÃES. **Phenotyping and genotyping of onion populations with different levels of inbreeding**. 2018. 77f. Thesis (PhD degree in Agronomy / Crop Protection) – Federal University of Uberlândia¹.

Abstract: The production of onion hybrids depends on the development of genetically pure lineages. Traditionally, the pedigree method (applying successive self-fertilization in individuals) guarantees obtaining quickly the endogenous lines. However, the onion undergoes a strong process of inbreeding depression when self-fertilized for several generations, such as many other species of cross-pollination. Depression by inbreeding reduces plant vigor, bulb size and seed production, increasing the cost to produce the hybrid seed. Researchers have shown that cross-linking between a few plants promotes the reduction of depression by inbreeding in natural populations. Based on the same principle and taking in consideration the populations submitted to the selection of superior individuals, the objective of this paper is to elucidate if there is any effect of depression by inbreeding segregating lines of onion obtained by self-fertilization and by cross-linking of two and three plants. Therefore, we used 33 populations of onion and designed treatments in different ways of obtaining the populations (self-fertilization of one plant [A₁], intercrossing of two [B₂] and three plants [C₃]), to study 11 different genetic *backgrounds*, grouped according to low or medium inbreeding. We evaluate throughout two consecutive years (2014 and 2015) the agronomic characteristics in the vegetative and reproductive phases of the crop, and conducted analysis with RAPDs and SSRs. The experiments were conducted at the experimental station of Bayer Vegetable Seeds in Uberlândia/MG. Plant vigor suffered the depressed by inbreeding in the early generations with greater heterozygosity. Similarly, the contrast between the self-fertilized compared to the two-or three-plant crossbred was more pronounced in the populations with lower endogamic level. The intercrossing of three plants reflected in larger production of seeds per plot in populations with low endogamic level. Changing the method of conducting the generations through the sib of plants provided greater divergence between the genotypes. Important characteristics such as bulb production per plot, seed survival, resistance to purple blotch (fungus *Alternaria porri*), and seed production by umbel, that can be used in the estimation of divergence in the selection of segregating onion lines. We observed a positive and significant genotypic correlation of 0.92 for the percentage of seed survival, and 0.82 for the resistance to purple blotch, with seed production per umbel. These results indicates that the weight of seeds per umbel can be increased through selection for resistance to purple blotch and percentage of seed survival. Furthermore, we concluded the depression by inbreeding could not be interpreted as due to homozygous effects for deleterious mutations, and that microsatellites markers may be useful for detecting variability within the Brazilian onion germplasm. These results suggest that sibs of two and three plants can be used to reduce the inbreeding effect in onion, and should start in low endogamous populations, for the best use of the method.

Keywords: interbreeding of plants, inbred lines, self-fertilization, SSR marker in onion.

² Supervising Committee: José Magno Queiroz Luz - UFU (Major Professor), Joelson André de Freitas – BAYER, Gabriel Maciel Mascarenhas – UFU .

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma espécie diploide ($2n=2x=16$) com número básico de cromossomos igual a oito (KALKMAN, 1984). Pertencente à família Alliacea, a cebola é originária de regiões de clima temperado, que compreendem o Afeganistão, Irã e a antiga União Soviética, sendo cultivada a mais de 5000 anos e, possivelmente não existe mais na forma silvestre (GOLDMAN, et al. 2000).

Tipicamente bienal, com o ciclo biológico completo, comendo-se de duas etapas: a vegetativa e a reprodutiva. No Brasil é uma das raras culturas oleráceas nas quais o fotoperíodo pode tornar-se o fator limitante. Isso ocorre caso as exigências fotoperiódicas não sejam satisfeitas (FILGUEIRA, 2008).

A parte utilizável é um bulbo tunicado, compacto originado pela superposição de bainhas foliares carnosas, denominadas catáfilos. A camada mais externa constitui uma película seca com coloração típica da cultivar (FILGUEIRA, 2008).

A cebola apresenta flores férteis, com escapo floral composto por uma inflorescência esférica tipo umbela. A flor é andrógena e compreende três carpelos fundidos em seu pistilo, seis estames e um estilete. As anteras emitem quase todo o pólen entre 9 horas e 17 horas, 26-36 horas antes que o estigma torne-se receptivo, caracterizando a dicogamia protândrica. A polinização é entomófila, sendo 75% a 90% das sementes resultantes de polinização cruzada em campos de produção de sementes de cebola (BREWSTER, 1994; MALUF, 1999).

A grande variação de características morfológicas e fisiológicas nesta espécie está associada à sua alta taxa de polinização cruzada, bem como ao intenso processo de seleção a que foi submetida ao longo de sua domesticação, estendendo-se até os dias atuais. As seleções visam, de modo geral, modificar características como: o formato, a coloração, a retenção de escamas e o tamanho de bulbos, assim como aumentar a produtividade, melhorar a conservação pós-colheita e o nível de resistência à pragas e doenças, e a adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (QUARTIERO, 2014). Como resultado marcante, pode-se ressaltar a adaptação da cebola a diferentes latitudes em relação ao seu centro de origem, considerando-se que o fotoperíodo é fator limitante no processo de bulbificação (REZENDE, 2003).

Mais da metade da produção nacional concentra-se em propriedades familiares com menos de 20 hectares (VILELA et al., 2005), representando grande importância socioeconômica na cadeia produtiva brasileira. Ademais, a produção em larga escala nas tradicionais regiões produtoras como São José do Rio Pardo, Altinópolis e Monte Alto (SP);

Santa Juliana, Ibiá e São Gotardo (MG); ou ainda, em novas fronteiras agrícolas como Cristalina (GO), Irecê (BA), Petrolina (PE) e Mossoró (RN), contribuem sobremaneira na geração de emprego e renda no campo.

A cebola é a terceira hortaliça em importância econômica no mundo e a terceira mais produzida no Brasil. Em 2016 a safra brasileira de cebola foi de 1,6 milhões de toneladas, em 56,2 mil hectares plantados, resultando em uma produtividade média de 28,5 t ha⁻¹ (AGRIANUAL, 2017). Essa produtividade, embora crescente nos últimos anos, ainda é baixa e ocorre devido ao cultivo em grande parte de cultivares de polinização aberta, ou OP's (*'open pollination'*), que proporcionam baixo rendimento, baixa qualidade e ausência de resistência às principais doenças e pragas.

O ganho de produtividade por heterose tem sido o princípio usado em melhoramento e produção de híbridos de muitas hortaliças de interesse agrônomico (MALUF, 2001). O aumento da produtividade em cebola, seja pelo efeito heterótico de um híbrido, ou pelo aumento do 'stand' de plantio é uma busca constante nos programas de melhoramento.

O mercado de sementes de cebola no Brasil movimentou em torno de 158 milhões de dólares em 2015, em uma área de 55,3 mil hectares; desta, estima-se que 11 mil foram campos de produção utilizando-se sementes híbridas (NASCIMENTO & MELO, 2015). A utilização de híbridos no mercado nacional ainda é recente e ocupa cerca de 20% da área plantada, valores bem inferiores a países como Estados Unidos e Japão, onde estes valores chegam a 81% e 73%, respectivamente (ALMEIDA, 2015).

As explicações estão relacionadas, principalmente a aspectos culturais e tecnológicos de cultivo e ao fato que, são recentes os poucos programas específicos para a produção de híbridos de cebola no Brasil. Dentre as razões para esse menor interesse estão o fato da seleção genética para se alcançar um novo híbrido de cebola comercial ser demorada, pode chegar em até 20 anos entre as fases do primeiro cruzamento entre plantas, criação e estabilização da nova variedade, testes e desenvolvimento para o mercado. Outro ponto é o maior custo para produção de sementes híbridas, somente certos cruzamentos resultarão em híbridos F₁ desejáveis. Desta forma um número grande de pares de linhagens macho-estéreis e mantenedoras precisa ser desenvolvido para um programa de melhoramento ter uma boa chance de sucesso, o que acaba onerando o processo. No entanto algumas poucas empresas privadas, visualizando um potencial mercado em expansão, mantêm programas nesse sentido no país.

Embora a utilização de híbridos no mercado nacional ainda seja pequena comparativamente a outros países, sua procura tem aumentado nos últimos anos (ALMEIDA,

2015). Esta procura se dá, principalmente em função da superioridade agrônômica desses em relação às cultivares de polinização livre (MAY et al., 2007). Destacam-se a maior produtividade, destaca-se também a uniformidade em relação a formato e tamanho dos bulbos, coloração e uniformidade de maturação dos bulbos, além da resistência a doenças, que são características economicamente desejáveis em cebola.

A produção de híbridos de cebola depende do desenvolvimento de linhagens geneticamente puras. Esta pureza genética é obtida aumentando o nível de homozigose das linhas por meio de sucessivas autofecundações. No entanto como muitas espécies de polinização cruzada, a cebola sofre um forte processo de depressão por endogamia quando autofecundadas por várias gerações (BOHANEK, 2002). A depressão por endogamia reduz o vigor da planta, o tamanho do bulbo e sua produção de sementes. Pois à medida que a homozigose aumenta existe uma maior probabilidade para as características recessivas, muitas das quais são deletérias começarem a se manifestar, resultando em perda de vigor (AYROLES et al. 2009). Por consequência prática, tenta-se reduzir ao máximo o número de ciclos de autofecundações durante o processo de obtenção das linhagens, visando com isso manter as linhas com relativo vigor para possibilitar a produção de sementes híbridas de cebola em escala comercial.

Outra causa da endogamia é o desvio da panmixia devido à dinâmica de acasalamento dentro de subpopulações (CHARLESWORTH e CHARLESWORTH 1999). Estes desvios podem surgir devido a certo grau de auto cruzamento ou acasalamento não aleatório entre plantas aparentadas.

Pesquisas comparativas envolvendo linhas endogâmicas de cebola, obtidas por sucessivas autofecundações e populações sem autofecundação evidenciaram que as linhas endogâmicas apresentaram redução de até 36% na produção de bulbos, atraso em 12 dias na maturidade, e aumento de 2% a 12% de bulbos perfilhados. Após três gerações de autofecundação, a sobrevivência das plantas caiu para 50% e o baixo vigor resultou em queda de 30% na produção de sementes das plantas sobreviventes (BREWSTER, 1994).

A obtenção de linhas puras com satisfatório nível endogâmico para obtenção de híbridos comercialmente uniformes, não é tarefa fácil em espécies alógamas como a cebola. Alan et al. (2004), relatam que a quantidade de autopolinizações torna-se fator limitante à obtenção de linhas com adequado grau de uniformidade combinado com heterozigosidade suficiente para manter seu potencial heterótico.

Tradicionalmente, o método de 'pedigree' (onde aplica-se sucessivas autofecundações em nível de indivíduos), é o que garante uma rápida obtenção de linhas endogâmicas

(GOODWILLIE et al., 2005). Ainda assim devido à natureza bienal da cebola, a prática de seleção para desenvolver linhagens endogâmicas utilizando tal método leva de 10 a 12 anos (BOHANEC, 2002).

Por outro lado cruzamentos endogâmicos ou do acasalamento entre poucas plantas (*'sibs'*) são prováveis de ocorrer frequentemente em populações, devido ao pequeno tamanho da população local e/ou dispersão limitada dos polinizadores (WRIGHT, 1969). Tal fato abre perspectivas para formas alternativas de obtenção de linhagens uniformes sem demasiada depressão endogâmica.

Pesquisas como as de Porcher et al. (2016); Devaux et. al. (2014) e Porcher & Lande (2013) em trabalhos de evolução com diferentes espécies de plantas alógamas, mostraram que o inter cruzamento entre plantas promovem a diminuição da depressão por endogamia em populações naturais, mas que é improvável que isso por si só, mantenha estáveis taxas de autofecundação intermediárias. Os autores sugerem que fatores relacionados à ecologia da polinização, comportamento dos polinizadores e mecanismos genéticos da evolução da depressão por endogamia nas espécies, como explicações para a diminuição de acasalamentos endogâmicos e manutenção de relativa taxa de autofecundação nas populações naturais.

Trabalhos de pesquisa que avaliem a possível influência do inter cruzamento de poucas plantas de cebola na perda de vigor por endogamia inexistem. Assim o presente estudo tem o objetivo de elucidar se existe algum efeito de depressão por endogamia em linhas segregantes de cebola, obtidas pela autofecundação e pelo inter cruzamento de duas e três plantas. Para isto uma ampla abordagem genética foi realizada.

Referências

ALAN, A. R. et al. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant Science**, Toronto, v. 167, p. 1055–1066, 2004.

ALMEIDA, D. O. Tendências da Cebolicultura Mundial para o Próximo Milênio. Informativo da Associação Nacional dos Produtores de cebola – ANACE, n 2. setembro de 2015.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP 2017. 127p.

AYROLES, J. F. et al. A genome wide assessment of inbreeding depression: gene number, function and mode of action. **Conservation Biology**, Washington, v.23, p.920–930, 2009.

BOHANEC, B. Doubled-haploid onions. In: (Eds) H. D. RABINOWITCH & L. CURRAH. **Allium Crop Science: Recent Advances**. Wallingford, CABI Publishing, 2002. p.145-156.

- BREWSTER, J. L. **Onions and other vegetables alliums**. CAB International, Wallingford. p. 236, 1994.
- CHARLESWORTH, D., WILLIS, J. H. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**, London, v.10, n. 11, p. 783-96, 2009.
- DEVAUX, C., LANDE, R., PORCHER, E. Pollination ecology and inbreeding depression control individual flowering phenologies and mixed mating. **Evolution**, Durham, v. 68, p.3051–65, 2014.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ed. Viçosa: UFV, 2008. 421p.
- GOLDMAN, I. L.; HAVEY, M. J.; SCHROECK, G. History of public onion breeding programs and pedigree of public onion germplasm releases in the United States. **Plant Breeding Reviews**, Berlin, v. 20, p. 67-103, 2000.
- JONES, H. A.; CLARKE, A. E. Inheritance of male-sterility in the onion and the production of hybrid seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.43, p.189-194, 1943.
- MALUF, W. R. Heterose e emprego de híbridos F1 em hortaliças. In: NASS LL; VALOIS ACC; MELO IS; VALADARES MC (eds). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. p.327-356, 2001.
- MALUF, W. R. 1999. **Melhoramento de cebola (*Allium cepa* L.)**. Lavras: UFLA. 17p. (Apostila).
- MAY, A.; CECÍLIO FILHO, A. B.; PORTO, D. R. Q.; VARGAS, P. F.; BARBOSA, J. C. Produtividade de híbridos de cebola em função da população de plantas e da fertilização nitrogenada e potássica. **Horticultura Brasileira** Brasília, v. 25, p. 53-59, 2007.
- NASCIMENTO, W. M.; MELO, P. C. T. **Desafios e oportunidades na produção de sementes de hortaliças no Brasil**. Embrapa hortaliças, 2015. 312p.
- KALKMAN, E. R. Analysis of the C-banded karyotype of *Allium cepa* L. Standard system of nomenclature and polymorphism. **Genetica**, Netherlands, v. 65, p. 141-148, 1984.
- POLLAK, E. On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. **Genetics**, [S.I.], v. 117, n. 2, p. 353–360, 1987.
- PORCHER, E.; LANDE, R. Inbreeding depression under mixed outcrossing, self-fertilization and sib-mating. **Evolutionary Biology**, New York, v. 16, n. 105, 2016.
- PORCHER, E.; LANDE R. Evaluating a simple approximation to modeling the joint evolution of self-fertilization and inbreeding depression. **Evolution**, Durham, v. 67, n. 12, 3628–3635, 2013.
- QUARTIERO, A. et al. Desempenho agrônômico, heterose e estabilidade fenotípica de genótipos de cebola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 259-266, 2014.

GOODWILLIE, C.; KALISZ S.; ECKERT C. G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p. 47–79, 2005.

RESENDE, G. M.; CHAGAS, S. J. R.; PEREIRA, L. V. Características produtivas de cultivares de cebola no sul de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 722-725, 2003.

VILELA, N. J. et al. Desafios e oportunidades para o agronegócio de cebola no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 1029-1033, 2005.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. vol. 2. **Theory of gene frequencies**. Chicago, USA: University of Chicago Press; 1969.

CAPÍTULO 1

HIPÓTESES E REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos genéticos envolvidos no estudo

Os estudos dos parâmetros hereditários, como o efeito endogâmico são de fundamental importância em um programa de melhoramento de cebola, pois proporcionam os conhecimentos básicos relacionados à genética quantitativa, os quais permitem a disponibilização de materiais para serem utilizados pelo melhorista.

Em programas de melhoramento de plantas alógamas, como a cebola, é essencial gerar populações base que possam ser usadas como fonte de linhagens endogâmicas para obtenção de híbridos superiores (HALLAUER et al., 2010). Estas linhagens são obtidas após cinco a seis autofertilizações, sendo que, o fenótipo da linha endogâmica (S_{∞}) será o resultado dos efeitos médios (F_1) e aditivos, uma vez que os desvios de dominância serão extintos durante as autofertilizações sucessivas. Logo a seleção das melhores populações deve basear-se em parâmetros genéticos relacionados ao comportamento das linhagens endogâmicas quando atingem a homozigose completa, principalmente com relação à efeitos aditivos estimados ($\mu + \alpha$), contribuição de locos heterozigóticos (δ) e efeito endogâmico observado (KUKI et al., 2017).

O cruzamento de genótipos relacionados e aumento da homozigose durante o processo de obtenção de linhagens promove o efeito endogâmico, uma redução na média fenotípica de caracteres quantitativos ou queda de vigor decorrente do aumento da frequência de alelos recessivos deletérios (HEDRICK & GARCIA-DORADO, 2016). Tal efeito pode limitar o número de linhagens promissoras a serem extraídas de determinada população, sendo um indicativo do potencial destas para uso no programa de melhoramento.

É importante compreender a base genética desses efeitos. Existem duas formas geneticamente distintas nas quais o aumento da homozigose pode levar a queda de vigor nas linhagens de cebola: devido a uma maior expressão de genes deletérios em muitos locos e, o favorecimento do fenômeno de sobre dominância em alguns locos promovendo uma vantagem genética do heterozigoto, pois o fenótipo do heterozigoto se apresenta fora do intervalo fenotípico de ambos os pais homozigóticos, podendo levar a um fenótipo superior aos pais (CHARLESWORTH & WILLIS, 2009). Ainda segundo pesquisa de Fu e Donner (2002) a depressão por endogamia pode ser explicada pelas inúmeras deleções/inserções de genes e de retrotransposons identificados em regiões que, teoricamente deveriam ser colineares no genoma da espécie.

Resultando de uma série de fatores, é difícil quantificar tais contribuições genéticas no efeito endogâmico, uma vez que as mutações podem ocorrer em diversas regiões do genoma,

ou em um único loco. O que algumas pesquisas propuseram foi testar se as mutações deletérias observadas na prole de cruzamentos endogâmicos controlados também ocorreriam em populações naturais, com isso, entender-se-ia se as mutações explicariam a extensão observada da depressão endogâmica. Trabalhando com plantas de *Mimulus guttatus* coletadas da natureza e examinando um grande número de progênies, Willis (1992) encontrou que 6,5% das plantas de populações naturais eram heterozigotas portadoras de mutação deletéria recessiva que conferia deficiência de clorofila. Resultados semelhantes foram encontrados em populações de trigo por Ohnishi (1982). E quando realizou-se o estudo dos alelos, através do cruzamento controlado dos heterozigotos, todos os alelos letais foram detectados novamente em baixa frequência, no entanto, com maior expressão de fenótipos que apresentavam deficiência de clorofila. Segundo Li (2001) os genes deletérios existem nas populações naturais, na verdade o efeito endogâmico decorre do aumento do efeito epistático entre esses genes, um efeito multiplicativo.

No caso da cebola, em observações a campos experimentais em programa de melhoramento, também foram constatados a expressão de alelos deletérios recessivos para produção de clorofila. Tais observações predominaram em estágios mais iniciais do desenvolvimento de linhagens e tornaram-se menos frequentes à medida que os genótipos iam sendo avançados (FREITAS, 2017, informação pessoal).

Em populações finitas o número, o modo de ação e o tamanho do efeito destas novas mutações deletérias são determinantes para evolução adaptativa, que será por sua vez influenciada pela magnitude da deriva genética (FRANKHAM et al., 2011). Alguns estudos tem se dedicado a compreender a base genética do efeito endogâmico em cruzamentos que ocorrem em populações naturais, como Oakley et al., (2015) em populações de *Arabidopsis thaliana* e Frankham et al., (2016) avaliando os efeitos endogâmicas em cruzamentos de populações em diferentes gerações.

Há relatos na literatura que o intercruzamento entre poucas plantas ocorrem de forma natural, devido principalmente a pouca dispersão dos grãos de pólen, e promovem a diminuição da depressão por endogamia em nível de população (PORCHER & LANDE, 2013; DEVAUX et al., 2014; PORCHER et al. 2016). Baseado no mesmo princípio, ainda se tratando de populações submetidos à seleção de indivíduos superiores, este estudo propôs avaliar possíveis efeitos de depressão endogâmica, a nível fenotípico e molecular em populações de cebola (*Allium cepa* L.) em diferentes estágios de segregação genética, oriundas da autofecundação e do intercruzamento entre duas e três plantas.

Praticamente não há estudos desta natureza envolvendo a cultura da cebola; este artigo objetiva, portanto discutir a base genética do efeito endogâmico levantar possíveis hipóteses baseadas na literatura disponível bem como nos resultados obtidos com o uso de SSR's sobre os efeitos que os inter cruzamentos (sib's) propostos neste estudo, podem afetar a depressão endogâmica.

2.2 Análise de escala e forma de realização dos cruzamentos

A análise de escala ou número de plantas envolvidas no inter cruzamento (“sib”) que a princípio proporcionaria uma redução no efeito endogâmico comparativamente às autofertilizações e que, concomitantemente, melhoraria o nível de homogeneidade fenotípica das linhas, é a primeira discussão a ser feita. Neste trabalho foi proposto o inter cruzamento entre duas e três plantas, por questões operacionais e visto que nesta escala o estudo daria subsídios e informações para pesquisas futuras no tema.

A premissa é que as autofertilizações aceleram o processo de obtenção das linhagens, devido a maior fixação inicial causada pelo aumento da homozigose e devido à diminuição do fluxo de genes entre plantas. Então convém discutir quais as implicações dos inter cruzamentos entre duas e três plantas, nas propriedades genéticas das linhagens obtidas a partir das diferentes populações segregantes de cebola.

Sendo um sistema de acasalamento capaz de alterar a constituição genética das progênes, a primeira implicação seria uma alteração no coeficiente de endogamia (F), dado como a probabilidade de em qualquer loco haver pares de alelos idênticos por descendência (HARTL & CLARK, 1997). O F do indivíduo é dado pela metade do parentesco de seus pais, que é média de genes comuns entre eles, mais a metade do coeficiente de endogamia de cada um dos pais caso estes sejam endogâmicos.

Neste estudo os inter cruzamentos não foram controlados, uma vez que as plantas foram isoladas no interior de gaiolas na ocasião do seu florescimento, sendo utilizadas moscas domésticas para polinização. Essa é a prática comum dos programas de melhoramento de cebola, visto que realizar cruzamentos manuais controlados seria inviável comercialmente, dado à produção limitada de sementes por ovário polinizado.

Logo em uma gaiola onde havia duas ou três plantas pode também ter ocorrido, em menor escala, autofertilização o que nos leva a não saber o tipo de acasalamento de fato, podendo as sementes colhidas serem descendentes de meios-irmãos (MI), irmãos germanos

(IG) ou de autofertilização (S). Não podendo com isso predizer as estimativas da variância genética aditiva (sa^2) e por fim a herdabilidade no sentido restrito, que refere-se à fração das diferenças fenotípicas entre os pais que se espera recuperar através dos descendentes.

A abordagem do número de plantas envolvidas para obtenção das linhas endogâmicas, também dá margem para discussão neste estudo, se a utilização de um número maior de plantas (mais de duas ou três plantas), durante o processo de obtenção das linhagens, não obrigaria mais uma geração de cruzamentos para que ocorra a homeostase dos genes. Ainda pode ser estudado, a partir de que geração devem-se iniciar os intercruzamentos para promover diminuição no efeito endogâmico, se em gerações iniciais ou em gerações mais avançadas. Tal hipótese é formulada visto que foi constatado neste estudo (dados apresentados no capítulo 1) notória depressão por endogamia para peso e produção de bulbos, independente de as populações contarem ou não com algum nível inicial de endogamia; enquanto que atributos associados ao vigor de haste, somente sofreram efeito da depressão quando já existia um moderado nível de endogamia nas populações estudadas.

A análise de intercruzamentos entre plantas em programas de melhoramento e seus efeitos na depressão endogâmica das linhagens não foram relatadas na literatura.

2.3 Fatores associados à depressão por endogamia

A dimensão do efeito endogâmico varia de acordo com a espécie entre populações e até mesmo entre indivíduos, sendo difícil de mensurá-la, principalmente na natureza. A genômica está revolucionando muitos aspectos da biologia evolutiva sendo de grande importância para compreensão da depressão por endogamia em espécies de interesse econômico como a cebola.

A extensão do efeito endogâmico também depende da história evolutiva da espécie, da aptidão do genótipo ao ambiente, capacidade de sobrevivência e sistema reprodutivo. Segundo Yun & Agrawal (2014), avaliando efeitos do estresse abiótico e competição na depressão por endogamia, concluíram que seus níveis podem aumentar em condições desfavoráveis do ambiente. No caso da espécie *Allium cepa* L. o mecanismo da alogamia, bem como o intenso processo de seleção a que foi submetida ao longo de sua domesticação, explica sua alta heterosigiosidade nos diferentes locos gênicos, o que leva a uma acentuada depressão por endogamia, quando submetidos ao acasalamento de indivíduos mais aparentados e/ou autofecundações.

Dada a alta heterozigosidade da cebola e a presença de muitos alelos deletérios recessivos (BREWSTER, 1994) o vigor da planta decresce acentuadamente a cada geração de autofecundação (SILVA et al., 2015). Características como sobrevivência destas, também são acentuadamente afetadas pela depressão por endogamia após três gerações de autofecundação (JONES & EMSWELLER, 1936). Outras características de interesse agrônomo para produção de sementes também sofrem os efeitos da depressão por endogamia e decrescem seus valores médios (SILVA et al., 2015), como é o caso da altura de planta, espessura e número de hastes florais, bem como do tamanho de umbela e do número de flores por umbela.

No caso de programas de melhoramento, uma das principais formas de minimizar os efeitos da endogamia é conhecer a genealogia dos cruzamentos, mensurando em nível de indivíduo a perda de vigor e selecionando as melhores linhas endogâmicas para gerarem a próxima geração. Além disso a literatura recente aponta duas outras formas de redução da depressão endogâmica em plantas: purga de mutações deletérias recessivas e resgate genético.

A purificação da depressão por endogamia, ou seja, redução da frequência de alelos deletérios que levam a perda de vigor podem ocorrer naturalmente, ou ser induzida através de planejamento dos cruzamentos pelo melhorista (CARA, et al. 2013). Naturalmente, ocorre quando a endogamia aumenta a frequência de homozigotos, sendo os efeitos recessivos expostos à seleção de forma induzida através da redução no tamanho efetivo da população, e cruzamentos direcionados, uma vez que a carga de endogamia vai cair mais rapidamente (e a taxa de fixação para os alelos deletérios será menor) do que o esperado apenas pela deriva genética (HEDRICK, et al. 2016). O intercruzamento de poucas plantas, como foi proposto neste estudo pode ser considerado uma forma de *purging*; assim, realizar cruzamentos direcionados como proposto de forma a garantir que não ocorra autofecundação, que é a forma mais drástica de endogamia, demonstra-se como uma técnica interessante nos programas de melhoramento de cebola.

A eficácia da purga genética é de difícil mensuração e depende do nível endogâmico entre os indivíduos na população. Basicamente todos os estudos envolvem aspectos genéticos evolutivos da purga (GARCÍA-DORADO, et. al. 2012), logo se deve avaliar a aplicabilidade deste conceito em programas de melhoramento.

Outra forma de diminuir o efeito endogâmico seria através do resgate genético, que se dá aumentando a variabilidade genética através da introdução de genótipos divergentes, o que vem sendo estudado até o momento somente em animais. No caso da cebola, um estudo da divergência genética dos acessos em uso corrente no programa vem sendo preparado para

depois disto, também adotar a estratégia da inclusão de genótipos divergentes para que haja tal resgate genético e consequente redução no impacto da depressão por endogamia.

Algumas pesquisas como a de Souto et. al., (2002) demonstraram a relação da distancia entre plantas e formato de pólen com a intensidade da depressão endogâmica na população, enquanto Frankham et. al., (2016) utilizando meta análise avaliaram a perda de vigor entre diferentes gerações F₁, F₂ e F₃ em várias espécies, concluindo que os efeitos são proporcionais a cada geração e que os benefícios da heterose persistem em cruzamentos além da geração F₁.

2.4 Referências

- BREWSTER, J. L. **Onion and other vegetable alliuns**. Cambridge: University Press, 1994. 236p.
- CARA, M. Á. R. et al. Purging deleterious mutations in conservation programmes: combining optimal contributions with inbred matings. **Heredity**, London, v. 110, p. 530-537, 2013.
- CHARLESWORTH, D., WILLIS, J. H. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 11, p. 783-96, 2009.
- DEVAUX, C.; LANDE, R.; PORCHER, E. Pollination ecology and inbreeding depression control individual flowering phenologies and mixed mating. **Evolution**, Durham, v. 68, n. 11, p. 3051–3065, 2014.
- FRANKHAM, R. et al. Predicting the probability of outbreeding depression. **Conservation biology**, Boston, v. 25, p. 465–475, 2011.
- FRANKHAM, R. Genetic rescue benefits persist to at least the F₃ generation, based on a meta-analysis. **Biological Conservation**, Barking, v. 195, p. 33-36, 2016.
- FU, H. H.; DOONER, H. K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.I.], v. 99, p. 9573-9578, 2002.
- GARCÍA-DORADO, A. Understanding and predicting the fitness decline of shrunk populations: inbreeding, purging, mutation, and standard selection. **Genetics**, [S.I.], v. 190, p. 1461–1476, 2012.
- HALLAUER, A. R.; CARENA, J. M.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. New York: Springer, 2010.

- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 3^a ed. 542p. 1997.
- HEDRICK, P. W.; GARCIA-DORADO, A. Understanding Inbreeding Depression, Purging, and Genetic Rescue. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 31, n. 12, 2016.
- JONES, H.; EMSWELLER, S. A male sterility onion. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, [S.I.], v. 34, p. 582-585, 1936.
- LI, Z. K. et al. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. **Genetics**, [S.I.], v. 158, p. 1737–1753, 2001.
- KUKI, M. et al. Inbreeding depression and average genetic components in green corn genotypes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 5, 2017.
- OAKLEY, C. G.; ÅGREN, J.; SCHEMSKE, D. W. Heterosis and outbreeding depression in crosses between natural populations of *Arabidopsis thaliana*. **Heredity**, London, v. 115, p. 73–82, 2015.
- OHNISHI, O. Population genetics of cultivated buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. I. Frequency of chlorophyll-deficient mutants in Japanese populations. **Japanese Journal of Genetics**, Tōkyō-shi, v. 57, p. 623–639, 1982.
- PORCHER, E.; LANDE, R. Evaluating a simple approximation to modeling the joint evolution of self-fertilization and inbreeding depression. **Evolution**. Durham, v. 67, n. 12, p. 3628–3635, 2013.
- PORCHER, E.; Lande, R. Inbreeding depression under mixed outcrossing, self-fertilization and sib-mating. **Evolutionary Biology**, New York, v. 16, p. 105, 2016.
- SILVA, H. C.; GOMES, L. A. A.; FREITAS, J. A. Produção de sementes de cebola. In: SOUZA, R. J.; ASSIS, R. P.,; ARAÚJO, J. C. **Cultura da cebola- Tecnologias de produção e comercialização**, p. 205-231, 2015.
- WILLIS, J. H. Genetic analysis of inbreeding depression caused by chlorophyll-deficient lethals in *Mimulus guttatus*. **Heredity**, London, v. 69, p. 562–572, 1992.
- YUN, L.; AGRAWAL, A. F. Variation in the strength of inbreeding depression across environments: effects of stress and density dependence. **Evolution**, Durham, v. 68, p. 3599–3606, 2014.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE CEBOLA OBTIDAS DE DIFERENTES FORMAS DE CONDUÇÃO DAS GERAÇÕES

3 PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ONION'S SEGREGATING POPULATIONS OBTAINED FROM DIFFERENT FORMS OF CONDUCT OF GENERATIONS

3.1. Abstract

It is known that intercrossing between plants promotes the reduction of depression by inbreeding in natural populations. Based on the same principle, although the populations selected for superior selection, this work has the objective of evaluating, at the phenotypic and molecular level, populations of onion at different stages of genetic segregation. It is proposed to study possible depressive effects in populations from self-fertilization, compared to those originating from the intercrossing between two and three plants. For this, eleven different populations and three ways of conducting these populations were used (intercrossing of three plants, intercrossing of two plants and self-fertilization of one plant). Agronomic and seed production characteristics were evaluated in two consecutive years (2014 and 2015), and at the end, orthogonal contrasts of interest were used to verify possible differences between the methods of conduction. For the identification of possible heterotrophic groups in the DNA of these populations, RAPD molecular markers were used. Plant vigor underwent inbreeding depression in early generations with greater heterozygosity; as well as the contrast between self-fertilized individuals compared to those resulting from the cross-breeding of two or three plants was more pronounced in the populations with lower endogamic level. Genetic similarity was observed between individual self-fertilization modalities and two- and three-plant intercrossing.

Keywords: intercrossing, genetic segregation, cross-breeding, endogamic level.

3.2. Introdução

A cebola é a terceira hortaliça em importância econômica no mundo e a terceira mais produzida no Brasil. Em 2016 a safra brasileira de cebola foi de 1,6 milhões de toneladas em 56,2 mil hectares plantados, resultando em uma produtividade média de 28,5 t ha⁻¹ (AGRIANUAL, 2017). Deste volume, estima-se que cerca de 40% seja de cebolas híbridas, com expectativa de crescimento nos próximos anos, uma vez que em países como o Brasil, a utilização de híbridos ainda é recente e ocupa cerca de 20% da área plantada, valores bem inferiores a países como EUA e Japão, onde estes valores chegam a 81% e 73%, respectivamente (ALMEIDA, 2015). Diante desse potencial mercado em expansão, se

iniciaram diversos programas de melhoramento de cebola no Brasil com objetivo de produzir híbridos.

Programas de melhoramento de cebola visando à obtenção de híbridos são de longo prazo. Tradicionalmente se necessita cerca de 20 anos para obter um híbrido desejável. Durante o desenvolvimento das linhagens parentais o método de ‘pedigree’ é o mais empregado, pois dele obtém-se o mais alto grau de homozigosidade a cada autofecundação do indivíduo superior selecionado. Não obstante os efeitos da depressão por endogamia também são acentuados (BREWSTER, 1994; AYROLES et al. 2009).

A depressão propriamente dita, é uma diminuição no valor da expressão de caracteres quantitativos em decorrência do aumento da homozigose causada pela endogamia, (MIRANDA, 2001), o que acarreta na obtenção de linhagens endogâmicas, que apresentam menor vigor de plantas, menor tamanho de bulbo e menor produção de sementes.

Devido ao longo período de tempo para o desenvolvimento de linhagens parentais, é comum o uso predominante de sucessivas autofecundações, na tentativa de não retardar o longo prazo para obtenção dos parentais dos híbridos.

Como a maioria dos caracteres de interesse agrônômico em cebola são poligênicos o tradicional método de pedigree, realizado por sucessivas autofecundações de uma planta, contribui sobremaneira para queda de vigor das linhagens por favorecer a maior expressão de genes deletérios ao caráter.

Comparativamente à obtenção de cultivares de polinização aberta onde resguarda-se satisfatória heterozigosidade das populações, a obtenção de linhagens de cebola com satisfatória uniformidade restringe acentuadamente a heterozigosidade. Desta forma o emprego de métodos alternativos que garanta uma boa uniformidade genética, sem elevado efeito da depressão por endogamia, pode por exemplo, minimizar a dificuldade na manutenção e produção de sementes dos parentais e seus respectivos híbridos e, sobretudo dar viabilidade econômica ao híbrido desenvolvido.

É sabido que o inter cruzamento entre plantas promovem a diminuição da depressão por endogamia em populações naturais (PORCHER & LANDE, 2013; DEVAUX et al., 2014; PORCHER et al. 2016). Baseado no mesmo princípio, ainda se tratando de populações submetidos à seleção de indivíduos superiores, este trabalho tem o objetivo de avaliar a nível fenotípico e molecular, populações de cebola em diferentes estágios de segregação genética. Propõe-se estudar possíveis efeitos depressivos em populações oriundas da autofecundação, comparativamente às oriundas do inter cruzamento entre duas e três plantas.

3.3. Material e métodos

Local do estudo

Os experimentos foram realizados na estação experimental da Bayer Vegetable Seeds, em Uberlândia-MG, onde foram avaliados em dois anos consecutivos (2014 e 2015), várias características agronômicas e de produção de sementes de cebola. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes e Recursos Genéticos (LAGEN) da Universidade Federal de Uberlândia, campus de Monte Carmelo-MG.

Origem e obtenção das populações de cebola deste estudo

As populações de cebola do presente estudo pertencem ao programa de melhoramento de cebola da Bayer Vegetable Seeds no Brasil e estão apresentadas no Quadro 1.

As populações de 1 a 12 foram obtidas a partir de gerações que já possuíam um moderado nível de endogamia. As populações de 1 a 3 originaram-se da autofecundação de uma planta F_2S_2 de *background* “GR x GR” (pop. 1), bem como do intercruzamento de duas e três plantas F_2S_2 deste mesmo *background* (pop. 2 e 3 respectivamente).

As populações de 4 a 6 foram obtidas da autofecundação de uma planta S_3 de *background* “IP” (pop. 4), bem como do intercruzamento de duas e três plantas S_3 , deste mesmo *background* (pop. 5 e 6, respectivamente).

Já as populações de 7 a 12 foram provenientes da autofecundação de uma planta F_2S_1 de *backgrounds* “IP-2 x IP-3” e “IP-3 x IP-2” (pop. 7 e 10, respectivamente), assim como do intercruzamento de duas e três plantas dos mesmos *backgrounds* “IP-2 x IP-3” (pop. 8 e 9, respectivamente) e “IP-3 x IP-2” (pop. 11 e 12, respectivamente). Todas estas populações (1 a 12) foram obtidas entre indivíduos aparentados o que as caracteriza com moderado nível endogâmico.

De modo semelhante as populações de 13 a 33 (Quadro 1), colocadas como baixo nível de endogamia, foram obtidas em outros sete diferentes *backgrounds*, como se segue: plantas individuais de populações F_2 foram submetidas à uma autofecundação (pop. 13, 16, 19, 22, 25, 28 e 31), bem como pelo intercruzamento de duas (pop. 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32) e três plantas (pop. 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33) destes referidos *backgrounds*.

Na prática, seis bulbos foram amostrados em cada grupo de *backgrounds*. Um bulbo foi autofecundado recebendo a codificação A_1 , dois e três outros bulbos foram intercruzados

entre si, recebendo as codificações B₂ e C₃, respectivamente. Após o plantio dos bulbos e posterior brotamento as plantas foram isoladas no interior de gaiolas no momento do seu florescimento, sendo utilizadas moscas domésticas (*Musca domestica*) para polinização e produção das sementes nas gerações aqui estudadas. Esta etapa ocorreu nos anos de 2012 e 2013.

Após esta etapa, em 2014, as sementes foram semeadas e posteriormente transplantadas se estabelecendo o primeiro campo de produção de onde foram realizadas as avaliações agronômicas descritas abaixo. Realizada a colheita, os bulbos foram armazenados em câmara fria para serem vernalizados e foram plantados em 2015 para estabelecerem o segundo campo de produção de onde foram coletadas as amostras para realização das análises moleculares e avaliações de produção de sementes.

Instalação dos experimentos e avaliações agronômicas

O semeio para implantação do primeiro campo (fase semente ao bulbo) ocorreu no dia 19 de março de 2014 e o transplante no dia 27 de abril do mesmo ano. Os canteiros foram preparados e adubados de acordo com as recomendações para a cultura da cebola na estação da Bayer em Uberlândia/MG. Os tratamentos constituíram-se das diferentes formas de obtenção das populações (autofecundação de uma planta [A₁], inter cruzamento de duas [B₂] e três plantas [C₃]) em 11 diferentes *backgrounds* genéticos agrupados de acordo com o nível médio de endogamia (moderado e baixo) (Quadro1).

Quadro 1: Populações de cebola em diferentes gerações genéticas, suas respectivas codificações, “backgrounds” e indicativo do nível médio de endogamia, Uberlândia, 2016.

Populações*	Codificação	Background	Nível médio de endogamia
1	F ₂ S ₃	A ₁	GRxGR
2	F ₂ S ₂ SIB2plantas	B ₂	GRxGR
3	F ₂ S ₂ SIB3plantas	C ₃	GRxGR
4	S ₄	A ₁	IP-1
5	S ₃ SIB2plantas	B ₂	IP-1
6	S ₃ SIB3plantas	C ₃	IP-1
7	F ₂ S ₂	A ₁	IP-2xIP-3
8	F ₂ S ₁ SIB2plantas	B ₂	IP-2xIP-3
9	F ₂ S ₁ SIB3plantas	C ₃	IP-2xIP-3
10	F ₂ S ₂	A ₁	IP-3xIP-2
11	F ₂ S ₁ SIB2plantas	B ₂	IP-3xIP-2
12	F ₂ S ₁ SIB3plantas	C ₃	IP-3xIP-2
13	F ₂ S ₁	A ₁	BUC
14	F ₂ SIB2plantas	B ₂	BUC
15	F ₂ SIB3plantas	C ₃	BUC
16	F ₂ S ₁	A ₁	GRxIP-1
17	F ₂ SIB2plantas	B ₂	GRxIP-1
18	F ₂ SIB3plantas	C ₃	GRxIP-1
19	F ₂ S ₁	A ₁	GRxBOT-1
20	F ₂ SIB2plantas	B ₂	GRxBOT-1
21	F ₂ SIB3plantas	C ₃	GRxBOT-1
22	F ₂ S ₁	A ₁	GRxBOT-2
23	F ₂ SIB2plantas	B ₂	GRxBOT-2
24	F ₂ SIB3plantas	C ₃	GRxBOT-2
25	F ₂ S ₁	A ₁	GRxBOT-3
26	F ₂ SIB2plantas	B ₂	GRxBOT-3
27	F ₂ SIB3plantas	C ₃	GRxBOT-3
28	F ₂ S ₁	A ₁	GRxBOT-4
29	F ₂ SIB2plantas	B ₂	GRxBOT-4
30	F ₂ SIB3plantas	C ₃	GRxBOT-4
31	F ₂ S ₁	A ₁	CRxBOT-1
32	F ₂ SIB2plantas	B ₂	CRxBOT-1
33	F ₂ SIB3plantas	C ₃	CRxBOT-1

* S/ indica o número de autofecundações realizadas

O delineamento foi em blocos casualizados com três repetições. Cada parcela foi constituída de um canteiro de um metro de comprimento por 0,9 metros de largura com cinco linhas espaçadas 0,20 metros e plantas espaçadas em 5 cm, totalizando 100 plantas por parcela. As avaliações foram feitas em nível de parcela e para as características não mensuradas adotou-se a escala de notas de 1 a 9 onde 1 representa pior valor do caráter e 9 melhor valor do caráter.

Vigor das plantas: foram atribuídas notas (1-9) para vigor de planta aos 90 e 120 DAS (dias após a semeadura), observando-se o diâmetro da folha, altura de planta e número de folhas;

Altura de planta: Aos 150 DAS foi realizada uma avaliação métrica, utilizando régua graduada, amostrando-se a medida de três plantas no centro da parcela, dando a média em centímetros;

Diâmetro de 'pescoço': foi atribuída nota (1-9) para diâmetro do 'pescoço', sendo 1: grosso, 9: fino; *Arquitetura de planta*: foi atribuída nota (1-9), sendo 1: prostada, 9: ereta; *Ciclo*: Em dias, do semeio ao ponto de 'top-down' (mais de 50% das plantas tombadas ou em ponto de estalo); Severidade de *Botrytis squamosa*: foi atribuída nota de acordo com a severidade do patógeno na parcela, sendo 1: menor severidade, 9: maior severidade.

Após a colheita dos bulbos foram realizadas as seguintes avaliações de bulbo:

Cor de pele: Nota (1-9), sendo maior a nota para bulbos com a pele de cor marrom escuro;

Firmeza: Nota (1-9), obtida pela pressão do dedo polegar no bulbo, sendo as maiores notas para bulbos com maior firmeza;

Peso médio de bulbos: após contagem e pesagem de todos os bulbos colhidos na parcela, obteve-se o peso médio por bulbo pela fração $\text{Peso Total}/N^{\circ}$ de bulbos na parcela, dado em gramas;

Bulbos globulares: Os bulbos colhidos em cada parcela foram classificados em dois grupos de formato de acordo com classificação da CEAGESP (2001), sendo o grupo 1: bulbos globulares e o grupo 2: bulbos achatados, obteve-se assim a porcentagem de bulbos globulares em cada parcela;

Bulbos comerciais: Os bulbos colhidos em cada parcela foram classificados de acordo com seu calibre em cinco classes (Classe I, Classe II, Classe III, Classe IV e Classe V). A classificação dos bulbos foi realizada segundo as normas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1995) baseada no diâmetro transversal em: Classe I (bulbos com diâmetro de 15 a 35 mm); Classe II (bulbos com diâmetro entre 35 e 50 mm); Classe III (bulbos com diâmetro entre 50 e 75 mm); Classe IV (bulbos com diâmetro entre 75 e 90 mm); Classe V (bulbos com diâmetro maior que 90 mm). Posteriormente foi calculado a porcentagem de bulbos comercializáveis, pertencentes às classes II, III e IV;

Produção total: A partir da pesagem dos bulbos em cada parcela, a mesma foi corrigida para o estande final e expressa em kg parcela^{-1} .

Após as avaliações dos bulbos, estes foram armazenados e vernalizados por cerca de três meses até o plantio do campo para avaliação dos caracteres relacionados à produção de sementes. O transplante dos bulbos para formação deste segundo campo (fase bulbo à semente) se deu no dia 30/04/2015.

Foram avaliadas as seguintes características relacionadas à produção de sementes:

Aspecto geral da planta: foram atribuídas notas (1-9) para aspecto geral aos 30, 60 e 90 DAT (dias após o transplante), observando-se o número, o diâmetro e a altura da haste, bem como tamanho da umbela, de forma geral na parcela, sendo que, quanto maior o valor destes atributos maior a nota;

Vigor da haste: nota (1-9), sendo 1: baixo vigor e 9: alto vigor; *Vigor da umbela:* nota (1-9), sendo 1: baixo vigor e 9: alto vigor;

Número de umbelas: número total de umbelas por parcela momentos antes da colheita das sementes;

Uniformidade de florescimento: foi considerado semanalmente o número de umbelas com flores abertas em cada parcela e atribuído notas de 1 a 9, sendo 1: menor uniformidade e 9: maior uniformidade;

Pegamento de frutos: nota (1-9), sendo 1: baixo pegamento e 9: alto pegamento;

Resistência à Alternária: foi atribuída nota de acordo com a severidade do patógeno *Alternaria porri* na parcela, sendo 1: menor severidade, 9: maior severidade;

Massa de sementes por umbela: massa média (em gramas) de sementes por umbela na parcela.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e contrastes ortogonais de interesse foram realizados pelo teste de Scheffé, para verificar possíveis diferenças entre os métodos de obtenção das populações em três diferentes estados de segregação: envolvendo todos os *backgrounds*, envolvendo somente aqueles com baixo nível de endogamia e outro grupo envolvendo aqueles com moderado nível endogâmico. Os dados foram analisados com auxílio do aplicativo estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000), com $\alpha = 0,05$ como valor de significância.

Extração de DNA e avaliações moleculares

Para as análises moleculares foram utilizados doze linhagens endogâmicas (Populações 1 a 12 do Quadro 1), sendo utilizadas três plantas por tratamento, totalizando 36 amostras. Estes 12 tratamentos para as avaliações moleculares foram derivados dos

backgrounds (GRxGR, IP-1, IP-2xIP-3 e seu recíproco), em diferentes estados de segregação genética da população (A_1 , B_2 e C_3), considerando com isso que seriam representativos dos demais tratamentos e possibilitariam atingir os objetivos de comparar as diferentes gerações genéticas em baixo e moderado grau endogâmico, além de observar a ocorrência ou não de divergência genética entre as amostras utilizando marcadores RAPD.

O transplântio dos bulbos foi realizado no dia 30/04/2015 e após cerca de 20 dias realizado um 'bulk' de folhas das três amostras coletadas em cada uma das três plantas (folhas jovens obtidas de brotações iniciais dos bulbos) de cada um dos doze tratamentos/populações. Posteriormente as três amostras de DNA pertencentes às mesmas populações/gerações foram reunidas, o que resultou em 12 amostras de trabalho. O tecido colhido foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1996), com modificações.

De cada 'bulk' de cada um dos 12 tratamentos/populações foi obtido 300 mg de tecido macerado os quais foram transferidos para tubos de 2,0 mL e adicionados 700 μ L de tampão CTAB (NaCl 1,4M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; CTAB 2%; β -Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q) pré-aquecido a aproximadamente 65 °C. O material foi incubado em banho-maria a essa temperatura, por uma hora, agitando-se a cada 10 minutos. Ao homogeneizado foram adicionados 600 μ L de clorofórmio:álcoolisoamílico (24:1) sob agitação manual por cinco minutos; em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por dez minutos a 5.220 x. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para novos tubos de 2,0 mL previamente identificados. Nesta solução foram adicionados 400 μ L de isopropanol previamente resfriado à -20 °C, misturando-se suavemente por inversão dos tubos por cerca de 5 minutos. As amostras foram então submetidas à temperatura de -20 °C por 30 minutos para formação do sedimentado.

Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 11.750 x g e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 1,0 mL de etanol 70%, por cinco minutos e uma vez com etanol P.A. por três minutos. Para secagem, os tubos contendo o precipitado foram mantidos em câmara de fluxo laminar. O DNA extraído foi ressuspensionado em 150 μ L de água.

A qualidade das amostras de DNA foram visualizadas em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X (Tris base 1M, Ácido Bórico e EDTA 500 mM), corado com corante fluorescente para DNA Blue Green LoadingDye I (LGC Biotecnologia) na concentração 1:10 submetido à luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia) para visualização e as imagens capturadas para posterior análise.

A quantidade de DNA extraído foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro UV – VIS 5100 a 260 nm e posteriormente padronizado sua concentração para 10ng/ul.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 µL e contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 25 Mmol/L de MgCl₂; 10 µM dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 10 µM de primer; 20 ng de DNA genômico; 1 unidade de Taq DNA polimerase e tampão de PCR 10x. As amostras foram testadas contra 13 diferentes *primers* (OPA14, OPA15, OPA16, OPA17, OPB11, OPB20, OPC08, OPC09, OPC11, OPC13, ODP03, OPE10, OPF19), pertencentes aos Kits da Operon Technologies, descritos na Tabela 7.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (TION96GL) nas seguintes condições: 95 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C e 2 minutos a 72 °C, e uma etapa final para extensão de 7 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 1X (Tris base 1M, Ácido Bórico e EDTA 500mM), corado com corante fluorescente para DNA Blue Green LoadingDye I (LGC Biotecnologia) na concentração 1:10. Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado marcador de 100 pares de base DNA Ladder. Os géis foram submetidos à luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia) para visualização e as imagens capturadas para posterior análise.

3.4. Resultados e discussão

Para facilitar a redação e o entendimento dos resultados apresentados, as três populações efetivamente testadas foram codificadas como segue: A₁- populações de autofecundação individual (F₂S₃, S₄, F₂S₂ e F₂S₁); B₂- populações do intercruzamento de duas plantas “SIB2” (F₂S₂SIB2 pl., S₃SIB2pl., F₂S₁SIB2pl. e F₂SIB2pl.); C₃- populações do intercruzamento de três plantas “SIB3” (F₂S₂SIB3 pl., S₃SIB3pl., F₂S₁SIB3pl. e F₂SIB3pl.) (Quadro1).

De posse dos dados métricos ou de notas das avaliações procedeu-se os contrastes de três maneiras: 1- incluindo os dados apenas das populações com moderado nível de endogamia (populações de 1 a 12, Quadro 1); 2- das populações com baixo nível de endogamia (13 a 33) e 3- das populações com níveis moderado e baixo de endogamia (1 a 33). Assim sendo os contrastes propostos foram: |A₁ x B₂|, |A₁ x C₃|, |B₂ x C₃| e |A₁ x B₂+ C₃|.

Contrastes envolvendo populações com moderado nível de endogamia

As características vigor de planta, aos 90 e aos 120 dias após o semeio, não sofreram nenhuma influência quando a população veio de autofecundação individual, comparada com o inter cruzamento de duas e/ou três plantas (Tabela 1). Igualmente a altura de planta de cebola, também não foi alterada significativamente quando plantas individuais foram autofecundadas, comparativamente aos inter cruzamentos de duas e/ou três plantas.

Quando realizado o contraste $|B_2 \times C_3|$, onde duas e três plantas foram inter cruzadas separadamente, constatou-se um efeito de maior diâmetro de “pescoço” na população advinda do inter cruzamento de três plantas, relativamente à de duas plantas. Este resultado pode ser explicado pelo maior nível de heterozigosidade da população de três plantas em relação à de duas plantas (Tabela 1).

Para as características arquitetura de planta, ciclo, severidade de Botrytis, cor de pele, firmeza de bulbos e porcentagem de bulbos comerciais não foram constatados qualquer efeito significativo de endogamia entre as populações oriundas da autofecundação individual, comparado com as populações de duas e/ou três plantas inter cruzadas (Tabela 1).

Por outro lado, as características peso médio de bulbo, porcentagem de bulbos globulares e produção de bulbos totais por parcela, apresentaram de um modo geral, diferenças significativas para os contrastes entre plantas individuais e plantas inter cruzadas (Tabela 1). Os valores negativos para estes contrastes indicam maior vigor (ou menor depressão) para as populações que utilizaram 2 e/ou 3 plantas, comparativamente à autofecundada.

Tabela 1: Valores de contrastes envolvendo 12 populações com moderado nível endogâmico, para características de plantas e bulbos de cebola. Uberlândia, 2018.

Características	Populações contrastadas			
	A ₁ x B ₂	A ₁ x C ₃	B ₂ x C ₃	A ₁ x B ₂₊ C ₃
Estimativas e significâncias dos contrastes				
1. Vigor aos 90dias ¹	0,50	0,50	0,02	0,50
2. Vigor aos 120dias ¹	0,50	0,17	-0,33	0,33
3. Altura de planta (cm)	-1,33	-2,17	-0,83	-1,75
4. Diâmetro Pescoço ¹	0,17	-0,33	-0,50*	-0,08
5. Arquitetura de planta ¹	0,50	0,50	0,04	0,50
6. Ciclo (dias)	-6,00	1,50	7,50	-2,25
7. Severidade <i>Botrytis</i> ¹	0,33	0,01	-0,33	0,17
8. Cor de pele ¹	-0,67	-1,00	-0,33	-0,83
9. Firmeza ¹	0,02	0,01	0,03	0,02
10. Peso médio de bulbo (g)	-7,33	-17,83*	-10,50*	-12,58*
11. Bulbos globulares (%)	-17,70*	-31,26*	-13,56*	-24,48*
12. Bulbos comerciais (%)	-9,81	-10,41	-0,60	-10,11
13. Produção (kg/parcela)	-0,52	-1,29*	-0,78	-0,90*

¹Valores médios provenientes de avaliação com escala de nota de 1 a 9, respectivamente, 1 menores e/ou piores valores; 9 maiores e/ou melhores valores *Estimativa do contraste significativo pelo teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Tratando-se do grupo das populações que foram obtidas em gerações com um moderado nível de endogamia, contrastes significativos quando utilizado uma planta autofecundada comparativamente a duas e/ou três plantas inter cruzadas, evidenciam que efeitos endogâmico depressivos para estas características em cebola, não ocorrem somente em gerações iniciais como se poderia esperar. Pelo que se observa, à medida que aumentamos o número de plantas no inter cruzamento, tende a haver um aumento no valor do caráter, que pode ser explicado pela maior heterozigidade na população.

As características aspecto geral das hastes aos 30, 60 e 90 dias, em alguns casos sofreram efeitos significativos quando mais plantas foram inter cruzadas em comparação à de autofecundação (Tabela 2). Foram significativos às diferenças a mais nos valores das notas quando os contrastes envolvidos foram |B₂ x C₃| (aspecto geral das hastes aos 60 dias) e |A₁ x B₂₊ C₃| (aos 30, 60 e 90 dias, além do vigor de haste). O sentido, no entanto (contrastos positivos), foi em favor das populações advindas de autofecundação. O fato de tratarem-se de contrastes realizados com populações que já possuíam um moderado grau de endogamia

podem ter favorecido esta situação. Exceto um contraste ($|B_2 \times C_3| = -0,58$), demonstrou que utilizar mais plantas no inter cruzamento, o aspecto geral da haste seria melhor. Ao que parece, a depressão por endogamia para estas três características não fica fortemente evidenciada tratando-se de populações que já possuem certo (moderado) nível de endogamia.

A característica vigor de haste também parece não sofrer tanto com efeito adicional de endogamia (mais uma geração de autofecundação) quando já está presente moderada endogamia (contrastes: $|A_1 \times B_2| = 0,75$ e $|A_1 \times B_2 + C_3| = 0,54$ (Tabela 4).

Para a característica uniformidade de florescimento, constatou-se menor uniformidade quando inter cruzaram-se três plantas em comparação a duas ($|B_2 \times C_3| = -0,58$). Para as demais características relacionadas à produção de sementes não foram constatadas diferenças significativas entre os contrastes (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de contrastes envolvendo 12 populações com moderado nível endogâmico, para características relacionadas à produção de sementes. Uberlândia, 2018.

Características	Populações contrastadas			
	$ A_1 \times B_2 $	$ A_1 \times C_3 $	$ B_2 \times C_3 $	$ A_1 \times B_2 + C_3 $
Estimativas e significâncias dos contrastes				
1. Asp. Geral hastes aos 30dias ¹	0,67*	0,33	-0,33	0,50*
2. Asp. Geral hastes aos 60dias ¹	0,83*	0,25	-0,58*	0,54*
3. Asp. Geral hastes aos 90dias ¹	0,58*	0,25	-0,33	0,42
4. Vigor de Haste ¹	0,75*	0,33	-0,42	0,54*
5. Vigor de Umbela ¹	0,17	0,08	-0,08	0,13
6. N° de Umbelas	0,67	-1,83	-2,50	-0,58
7. Uniformidade Florescimento ¹	0,25	-0,33	-0,58*	-0,04
8. Pegamento de sementes ¹	-0,17	0,08	0,25	-0,04
9. Resistência à Alternária ¹	-0,03	0,02	0,05	-0,01
10. Prod. sementes (g parcela ⁻¹)	-0,04	-1,12	-1,16	-0,62

¹Valores médios provenientes de avaliação com escala de nota de 1 a 9, respectivamente, 1 menores e/ou piores valores; 9 maiores e/ou melhores valores *Estimativa do contraste significativo pelo teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Contrastes envolvendo populações com baixo nível de endogamia

Quando os contrastes foram efetuados considerando as populações com menor nível de endogamia (Tabela 3), constatou-se um efeito significativo para vigor de plantas aos 90 dias após semeio. Tal efeito (devido ao sinal ser negativo) é no sentido de maior vigor quando

duas plantas foram inter cruzadas em comparação à proveniente de uma autofecundação. Diferentemente ao verificado nos contrastes quando as populações já possuíam um moderado nível de endogamia, neste caso, o menor nível de endogamia das populações pode ter contribuído para realçar tal diferença entre indivíduos autofecundados comparativamente aos advindos do inter cruzamento de duas plantas. Ou seja, populações em gerações iniciais estão mais sujeitas à perda de vigor pela depressão por endogamia do que aquelas que sofreram mais autofecundações.

Quando se observa os contrastes envolvendo somente genótipos com baixo grau endogâmico, a tendência relatada nas características de plantas e bulbos se repete com claro aumento das diferenças entre as diferentes gerações em relação aos contrastes envolvendo todos os materiais em diferentes estados de segregação. O inter cruzamento de duas plantas promoveu incrementos significativos em várias características relacionadas ao vigor de planta e umbela após o transplântio, como aspecto geral aos 30, 60 e 90 DAT, vigor de haste e de umbela o mesmo não ocorreu quando se utilizaram três plantas (Tabela 3).

Outra característica que aqui mostrou diferença significativa pelo contraste ($|A_1 \times C_3| = 8,67$) foi o ciclo de cultivo. Neste caso, o efeito da endogamia foi no sentido de retardar o ciclo em 8,67 dias das plantas oriundas de autofecundação individual $|A_1|$ em relação às do inter cruzamento de três plantas $|C_3|$ (Tabela 3). De fato, isto é comumente observado em várias outras situações onde se produz bulbos para realizar retro cruzamentos em que na primeira geração (F_1), com alta heterosigiosidade, constata-se maior precocidade para produção de bulbos em comparação ao parental recorrente (linha com menor heterosigiosidade).

Semelhantemente ao que ocorreu nos contrastes entre populações com moderado nível de endogamia, verificou-se significativa diferença nos contrastes para peso médio de bulbo, bulbos globulares e produção de bulbos por parcela entre as populações com baixo nível de endogamia (Tabelas 1 e 3). Na tabela 3 de um modo geral, constata-se que à medida que aumentamos o número de plantas inter cruzadas, pronuncia-se um efeito de maior peso médio de bulbo, porcentagem de bulbos globulares e produção por parcela, podendo ser explicado tal resultado, novamente pelo maior nível de heterozigiosidade quando utiliza-se mais plantas. As demais características mencionadas na tabela 3 não apresentaram contrastes significativos.

Tabela 3: Valores de contrastes envolvendo 21 populações com baixo nível endogâmico para características de plantas e bulbos de cebola. Uberlândia, 2018.

Características	Populações contrastadas			
	$ A_1 \times B_2 $	$ A_1 \times C_3 $	$ B_2 \times C_3 $	$ A_1 \times B_{2+} C_3 $
Estimativas e significâncias dos contrastes				
1. Vigor aos 90dias ¹	-0,38*	-0,05	0,33	-0,21
2. Vigor aos 120dias ¹	-0,33	-0,10	0,24	-0,21
3. Altura de planta (cm)	0,62	0,95	0,33	0,79
4. Diâmetro Pescoço ¹	-0,29	-0,14	0,14	-0,21
5. Arquitetura de planta ¹	-0,38	0,05	0,43	-0,17
6. Ciclo (dias)	1,00	8,67*	7,67	4,83
7. Severidade <i>Botrytis</i> ¹	-0,33	-0,43	-0,10	-0,38
8. Cor de pele ¹	0,14	-0,10	-0,24	0,02
9. Firmeza ¹	0,01	0,14	0,14	0,07
10. Peso médio de bulbo (g)	-15,52*	-4,33	-11,19*	-9,93*
11. Bulbos globulares (%)	0,25	-13,41*	-13,66*	-6,58
12. Bulbos comerciais (%)	1,83	-0,66	-2,50	0,58
13. Produção (kg/parcela)	-1,38*	-1,15*	0,24	-1,27*

¹Valores médios provenientes de avaliação com escala de nota de 1 a 9, respectivamente, 1 menores e/ou piores valores; 9 maiores e/ou melhores valores *Estimativa do contraste significativo pelo teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos contrastes envolvendo populações com baixo nível de endogamia para as características relacionadas à produção de sementes (Tabela 4), apenas dois fatores foram significativos. O pegamento de sementes foi menor quando autofecundou-se uma planta comparativamente ao inter cruzamento de duas ou três plantas simultaneamente ($|A_1 \times B_{2+} C_3| = -0,36^*$). E observou-se uma produção de sementes de 5,15 g/parcela superior nos tratamentos descendentes do inter cruzamento de três plantas contrastadas a uma planta autofecundada, $|A_1 \times C_3| = -5,15^*$ (Tabela 4). Nestes dois casos registrou-se efeito endogâmico no sentido de reduzir o pegamento de sementes e produção de sementes quando é realizado autofecundação. Para as demais características apresentadas nesta tabela não foram constatados efeitos de depressão por endogamia quando as plantas são autofecundadas em gerações iniciais com baixo nível de endogamia.

Tabela 4: Valores de contrastes envolvendo 21 populações com baixo nível endogâmico para características relacionadas à produção de sementes. Uberlândia, 2018.

Características	Populações contrastadas			
	A ₁ x B ₂	A ₁ x C ₃	B ₂ x C ₃	A ₁ x B ₂ + C ₃
Estimativas e significâncias dos contrastes				
1. Asp. Geral hastes aos 30dias ¹	0,27	0,15	-0,12	0,21
2. Asp. Geral hastes aos 60dias ¹	0,15	-0,03	-0,18	0,06
3. Asp. Geral hastes aos 90dias ¹	0,17	-0,06	-0,23	0,05
4. Vigor de Haste ¹	0,09	0,08	-0,02	0,08
5. Vigor de Umbela ¹	-0,03	-0,05	-0,02	-0,04
6. N° de Umbelas	-0,05	-2,80	-2,76	-1,42
7. Uniformidade Florescimento ¹	-0,08	-0,38	-0,30	-0,23
8. Pegamento de sementes ¹	-0,41	-0,32	0,09	-0,36*
9. Resistência à Alternária ¹	0,09	-0,05	-0,14	0,02
10. Prod. sementes (g parcela ⁻¹)	-2,97	-5,15*	-2,18	-4,06

¹Valores médios provenientes de avaliação com escala de nota de 1 a 9, respectivamente, 1 menores e/ou piores valores; 9 maiores e/ou melhores valores *Estimativa do contraste significativo pelo teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Contrastes envolvendo populações com moderado e baixo níveis de endogamia

Na tabela 5 são mostrados os contrastes realizados com os dados das 33 populações avaliadas, combinando aquelas com moderado e baixo níveis de endogamia. O contraste para a característica ciclo para produção de bulbos indicou que quando utiliza-se três plantas intercruzadas, devido à maior heterosigiosidade, em relação à duas plantas, promoveu uma redução no ciclo (maior precocidade) ($|B_2 \times C_3| = 8,85$ dias) (Tabela 5).

Observa-se que para as características de plantas e bulbos, o intercruzamento de duas e/ou três plantas promoveram, de um modo geral, acréscimos significativos no valor dos caracteres ($p < 0,05$) em relação às progênies oriundas de autofecundação ou envolvendo menos plantas (Tabela 5).

Analisando conjuntamente os dados das tabelas 3 e 5, fica evidente o efeito pronunciado e significativo de maior precocidade para produção de bulbos em favor das populações obtidas com maior número de plantas. Resultados como este poderiam ser explicados pela possível fixação de alguns dos seis genes que promovem a bulbificação, (LEE, 2013) e também devido a menor representatividade de indivíduos amostrados na

população. Os resultados do efeito endogâmico para retardar a precocidade de linhas obtidas por sucessivas autofecundações, também foram relatados por (BREWSTER, 1994).

Considerando-se também em conjunto os resultados para as características peso médio de bulbo, bulbos globulares e produção de bulbos por parcela (Tabelas 1, 3 e 5) fica evidente que há uma menor depressão por endogamia quando utilizou-se maior número de plantas nas populações.

Tabela 5: Valores de contrastes envolvendo 33 populações com moderado e baixo níveis de endogamia para características de plantas e bulbos de cebola. Uberlândia, 2018.

Características	Populações contrastadas			
	A ₁ x B ₂	A ₁ x C ₃	B ₂ x C ₃	A ₁ x B ₂ + C ₃
Estimativas e significâncias dos contrastes				
1. Vigor aos 90dias ¹	-0,21	0,09	0,30	-0,06
2. Vigor aos 120dias ¹	-0,18	-0,03	0,15	-0,11
3. Altura de planta (cm)	-0,79	-0,39	0,39	-0,59
4. Diâmetro Pescoço ¹	-0,24	-0,12	0,12	-0,18
5. Arquitetura de planta ¹	-0,06	0,15	0,21	0,05
6. Ciclo (dias)	-2,06	6,79	8,85*	2,36
7. Severidade <i>Botrytis</i> ¹	-0,15	-0,36	-0,21	-0,26
8. Cor de pele ¹	-0,03	-0,33	-0,30	-0,18
9. Firmeza ¹	0,00	0,06	0,06	0,03
10. Peso médio de bulbo (g)	-8,09*	-5,52	2,58	-6,80*
11. Bulbos globulares (%)	-0,15	-11,58*	-11,43*	-5,86*
12. Bulbos comerciais (%)	-0,15	-1,84	-1,69	-0,99
13. Produção (kg/parcela)	-0,86*	-0,98*	-0,11	-0,91*

¹Valores médios provenientes de avaliação com escala de nota de 1 a 9, respectivamente, 1 menores e/ou piores valores; 9 maiores e/ou melhores valores *Estimativa do contraste significativo pelo teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Quando os contrastes relacionados à produção de sementes foram realizados envolvendo as populações com moderado e baixo níveis de endogamia (Tabela 6), as características aspecto geral da haste aos 30, 60 e 90 dias demonstraram não sofrer efeitos endogâmico da autofecundação quando comparado com inter cruzamento de duas plantas (|A₁ x B₂|). A inclusão de uma terceira planta no inter cruzamento só favoreceu a significância do contraste no sentido de maior efeito endogâmico quando comparado com o inter cruzamento de duas plantas (|B₂ x C₃|). Interpretando conjuntamente os resultados dos contrastes entre

planta autofecundada e duas e três plantas inter cruzadas ($|A_1 \times B_2 + C_3|$), constata-se à significância para aspecto geral de haste aos 30 e 90 dias. Estes resultados, conjuntamente demonstram que não parece existir pronunciado efeito endogâmico para aspecto geral de haste.

As características vigor de haste e de umbela não sofreram efeito endogâmico quando uma planta foi autofecundada, comparativamente à duas plantas inter cruzadas. A adição de mais uma planta no inter cruzamento ($|B_2 \times C_3|$), favoreceu à maior heterosigiosidade para estas duas características e o efeito de depressão ficou notável.

Dois contrastes significativos para número de umbelas ($|A_1 \times C_3| = 8,50^*$ e $|A_1 \times B_2 + C_3| = 8,25^*$), indicam que não houve efeito endogâmico para esta característica nas populações estudadas.

Os contrastes para uniformidade de florescimento $|A_1 \times B_2| = 1,00^*$ e $|B_2 \times C_3| = -1,33^*$, indicam respectivamente, que não houve efeito endogâmico pronunciado quando faz-se a autofecundação e que adicionando-se uma terceira planta no inter cruzamento há uma contribuição para o maior nível de heterosigiosidade deste caráter, favorecendo seu maior valor.

Para a característica resistência à *Alternaria*, constatou-se maior nível de resistência quando três plantas foram inter cruzadas, comparativamente à uma planta autofecundada ($|A_1 \times C_3| = -2,33^*$) e às duas plantas inter cruzadas ($|B_2 \times C_3| = -2,67^*$). Este resultado pode ser explicado, em parte, pelo fato de esta resistência ser governada por alelo dominante em que uma planta autofecundada ou mesmo duas inter cruzadas favoreciam à expressão dos alelos recessivos para a doença. Pode-se explicar este resultado também pelo fato de um maior número de plantas inter cruzadas (3) terem aumentado as chances da presença de alelos dominantes para a resistência. Não foram verificadas influências do número de plantas inter cruzadas versus à autofecundada, no sentido de maior ou menor nível de resistência, quando os contrastes foram realizados em separado (populações com moderado e baixo nível de endogamia). Presume-se que estes resultados da influência pontual estejam mais relacionadas à uma amostragem não satisfatória, quando o caráter é qualitativo.

Tabela 6: Valores de contrastes envolvendo 33 populações com moderado e baixo níveis de endogamia para características relacionadas à produção de sementes. Uberlândia, 2018.

Características	Populações contrastadas			
	A ₁ x B ₂	A ₁ x C ₃	B ₂ x C ₃	A ₁ x B ₂ + C ₃
Estimativas e significâncias dos contrastes				
1. Asp. Geral hastes aos 30dias ¹	1,67*	0,17	-1,50*	0,92*
2. Asp. Geral hastes aos 60dias ¹	1,33*	0,12	-1,22*	0,67
3. Asp. Geral hastes aos 90dias ¹	0,24*	-0,10	-0,34*	0,07*
4. Vigor de Haste ¹	1,17*	-0,17	-1,33*	0,50*
5. Vigor de Umbela ¹	0,67*	-0,50	-1,17*	0,08
6. Nº de Umbelas	8,00	8,50*	0,50	8,25*
7. Uniformidade Florescimento ¹	1,00*	-0,33	-1,33*	0,33
8. Pegamento de sementes ¹	0,00	-1,00	-1,00	-0,50
9. Resistência à Alternária ¹	0,33	-2,33*	-2,67*	-1,00
10. Prod. sementes (g parcela ⁻¹)	4,41	0,50	-3,91	2,46

¹Valores médios provenientes de avaliação com escala de nota de 1 a 9, respectivamente, 1 menores e/ou piores valores; 9 maiores e/ou melhores valores *Estimativa do contraste significativo pelo teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

A literatura não dispõe de informações que permitam comparações diretas com as informações geradas no presente estudo. Dado ao longo período de tempo necessário para os estudos de genética e melhoramento de cebola, existem poucos trabalhos neste sentido, quando comparado com outras hortaliças.

As populações alvo deste estudo foram obtidas nos anos de 2012 a 2013. Todavia todas elas foram elaboradas entre 2008 e 2011 (quatro anos antes de serem produzidas), para depois de 8 anos, serem efetivamente avaliadas sob a hipótese inicial. A hipótese lançada foi de que seria possível minimizar os efeitos de depressão por endogamia na obtenção de linhagens parentais de híbridos com vistas à viabilizá-los economicamente. As pressuposições basearam-se no conceito de depressão por endogamia que afeta essencialmente as espécies alógamas (MIRANDA, 2001), e que sucessivas autofecundações pelo método de pedigree promoveria acentuada perda de vigor para algumas características importantes em cebola, reduzindo as chances da viabilidade econômica dos mesmos.

Das hipóteses iniciais, quando considerados os contrastes feitos separadamente nas populações com moderado e baixo níveis de endogamia, constatou-se que para peso médio de bulbos, bulbos globulares e produção de bulbos foi indiferente o fato das populações terem níveis endogâmico distintos. Em ambos os casos a autofecundação promoveu maior depressão

favorecendo a um menor valor desses três caracteres, quando comparados com o intercruzamento de duas e/ou três plantas.

Já no caso do aspecto geral e vigor de hastes o efeito de depressão por endogamia só foi notado quando avaliadas as populações que já possuíam algum (moderado) grau de endogamia. O fato de ter ocorrido menor depressão endogâmica nas populações com baixo nível de endogamia, pode ser explicado pela alta heterosigozidade das plantas autofecundadas (F_2S_1) após apenas uma geração de autofecundação.

Análises de polimorfismo utilizando marcadores moleculares RAPD

A reprodutibilidade dos resultados foi verificada utilizando os marcadores RAPD, em um total de 27 fragmentos amplificados, sendo apenas um deles polimórfico (25%). Os primers geraram bandas de intensidades variáveis, facilmente detectadas, e bandas inespecíficas que foram descartadas. Dos treze primers utilizados sete não se anelaram nas fitas de DNA não permitindo sua amplificação. Os outros seis primers permitiram amplificar as amostras de DNA, gerando em sua maioria bandas monomórficas. O primer OPA14 se destacou entre os demais apresentando banda polimórfica (Tabela 7).

Tabela 7. Lista de primers da Operon utilizados na caracterização molecular das amostras e o produto de suas amplificações. Monte Carmelo, 2018.

Nº	Primer	Sequência (5'-3')	Nº total bandas	Bandas monomórficas	% polimorfismo
1	OPA14	TCTGTGCTGG	4	3	25,0
2	OPA16	AGCCAGCGAA	4	4	0,0
3	OPA17	GACCGCTTGT	6	6	0,0
4	ODP03	GTCGCCGTCA	4	4	0,0
5	OPE10	CACCAGGTGA	6	6	0,0
5	OPF19	CCTCTAGACC	3	3	0,0
6	OPB11	GTAGACCCGT	-	-	0,0
7	OPB20	GGACCCTTAC	-	-	-
8	OPC08	TGGACCGGTG	-	-	-
9	OPC09	CTCACCGTCC	-	-	-
10	OPC11	AAAGCTGCGG	-	-	-
11	OPC13	AAGCCTCGTC	-	-	-
12	OPA15	TTCCGAACCC	-	-	-
13	OPB11	GTAGACCCGT	-	-	-

Estes resultados indicam que existe baixa diversidade genética entre os diferentes tratamentos deste estudo, independente da população e nível de endogamia e que os mesmos

se encontram em alto grau de homozigose. Outros autores também relataram baixa variabilidade entre acessos de cebola como Maniruzzanman et al. (2010) que estudaram a genética do cruzamento entre linhagens e variabilidade entre os dez cultivares resultantes de cebola com base em marcadores RAPD e relataram que todas as cultivares analisadas foram relacionadas. Shivnanajappa (2013) investigando a relação genética entre linhagens macho-estéril utilizadas no desenvolvimento de híbridos, utilizando 20 primers, relataram que a distância genética das cultivares utilizadas foi próxima.

Observou-se similaridade genética entre as modalidades de autofecundação individual e intercruzamentos de duas e três plantas, diferentemente das avaliações agronômicas no qual os intercruzamentos de plantas induziram incrementos significativos em alguns caracteres agronômicos avaliados.

Estes resultados dão respaldo aos resultados das avaliações agronômicas realizadas com estas mesmas populações, reforçando os resultados e eficiência da proposta de obtenção de linhagens endogâmicas, ao associar efeitos nos caracteres agronômicos das linhagens devido ao intercruzamento de duas e/ou três plantas sem que ocorra variabilidade genética na população resultante (considerando seis marcadores RAPD que amplificaram), o que sugere uma interessante proposta metodológica para obtenção de linhagens de cebola sem que ocorra divergência genética entre os indivíduos da próxima geração mantendo a distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE).

3.5. Conclusões

O vigor de plantas sofreu efeito de depressão por endogamia em gerações iniciais com maior heterosigozidade; assim como o contraste entre indivíduos autofecundados comparativamente aos advindos do intercruzamento de duas ou três plantas foi mais pronunciado nas populações com menor nível endogâmico;

O intercruzamento de três plantas refletiu em maior produção de sementes/parcela nas populações com baixo nível endogâmico;

Observou-se similaridade genética entre as modalidades de autofecundação individual e intercruzamentos de duas e três plantas, reforçando os resultados e eficiência da proposta de obtenção de linhagens endogâmicas sem que ocorra divergência genética entre os indivíduos da próxima geração (mantendo o DHE).

3.6. Referências

ALMEIDA, D. O. Tendências da Cebolicultura Mundial para o Próximo Milênio. Informativo da Associação Nacional dos Produtores de cebola – ANACE, n. 2. setembro de 2015.

AYROLES, J. F. et al. A genome wide assessment of inbreeding depression: gene number, function and mode of action. **Biological Conservation**, Barking, v. 23, p. 920–930, 2009.

BREWSTER, J. L. **Onions and other vegetables alliums**. Wallingford, CAB International, 1994, p. 236.

CAMARGO FILHO, W. P.; CAMARGO, F. P. A quick review of the production and commercialization of the main vegetables in Brazil and the world from 1970 to 2015. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 160-166, 2017.

DEVAUX C, LANDE, R.; PORCHER, E. Pollination ecology and inbreeding depression control individual flowering phenologies and mixed mating. **Evolution**, New York, v. 68, n. 11, p. 3051–3065, 2014.

FERREIRA, M. G.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola de 2015**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201605_4.shtm. Acessado em: 24 jun. 2016.

LEE, R. et al. Flowering locus T genes control onion bulb formation and flowering. **Nature Communications**, London, v. 4, n. 2884, 2013.

MANIRUZZAMAN, M. E., HAQUE, M. M., HAQUE, M. A. Molecular characterization of onion (*A. cepa* L) using RAPD markers. **Bangladesh J. Agric. Res.** v. 35, p. 313—322, 2010:

MIRANDA, J. B. F. Endogamia e consanguinidade. In: NASS, L.L. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 629-647.

NASCIMENTO, W. M.; MELO, P. C. T. **Desafios e oportunidades na produção de sementes de hortaliças no Brasil**. Embrapa hortaliças, 2015. 312p.

PORCHER, E.; LANDE, R. Evaluating a simple approximation to modeling the joint evolution of self-fertilization and inbreeding depression. **Evolution**, New York, v. 67, n. 12, p. 3628–3635, 2013.

PORCHER, E.; LANDE, R. Inbreeding depression under mixed outcrossing, self-fertilization and sib-mating. **Evolutionary Biology**, New York, v. 16, n. 105, 2016.

SHIVNANAJAPPA, D. et al. The genetic relatedness analysis of male sterile and their maintainer lines of onion (*Allium cepa* L.) by using RAPD primers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, [S.I], v. 14, p. 85–95, 2011.

CAPÍTULO 3

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE CEBOLA (*Allium cepa* L.) OBTIDAS SOB-DIFERENTES FORMAS DE CONDUÇÃO DAS GERAÇÕES

4 GENETIC DIVERGENCE IN SEGREGATING POPULATIONS OF ONION (*Allium cepa* L.) OBTAINED DIFFERENT FORMS OF CONDUCT OF GENERATIONS

4.1. Abstract

In addition to high individual performance, obtaining an estimate of the genetic distance between genotypes is taken as a way of predicting whether genetic variability is being maintained. The use of multivariate statistics has been promising for the possibility of synthesizing several variables in only one cluster. The use of phenotypic characteristics in genetic distance studies is one of the procedures most used by plant breeders because this information is continuously obtained for selection of superior genotypes and evaluation of adaptability and stability. We used 11 onion populations in different genetic segregation states (F_2S_1 , F_2S_2 , S_4 and S_3) obtained from generations that already had a low or moderate level of inbreeding. Two consecutive years (2014 and 2015), agronomic characteristics in the vegetative and reproductive phases of the crop were evaluated. In order to analyze the contribution of the various agronomic descriptors in the determination of the genetic divergence in each one of the forms of conduction (A_1 , B_2 and C_3) of the populations, the multivariate techniques of canonical variables, main components and Euclidean distances were used to obtain the dendrogram UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) was used as hierarchical grouping method between groups of genotypes. There were differences in measures of dissimilarity between driving methods. In general, the values were higher when the plants crossed. For the same combination of genotypes, there was a tendency to increase in genetic distance with the interbreeding of plants in most cases. The traits of bulb/plot (28.32%), seed setting (13.12%) and seed weight/umbel (13.41%) had a significant contribution to the divergence of onion genotypes, contributing 54.85%. The resistance to *Alternaria* also had an important contribution in the dissimilarity of the genotypes. The clustering of genotypes followed two trends, first, according to the pedigree, greater similarity among individuals with the same *backgrounds* was to be expected. It was also observed a tendency of grouping according to the way of conduction of the generations. Through these results it can be said that the change in the method of conduction of the generations, through sib of plants, provided greater divergence among the genotypes. And there are important characteristics such as bulb production per plot, seed glue, *Alternaria* resistance and seed weight per umbel, which can be used in the estimation of divergence in the selection of onion segregant lines.

Keywords: multivariate techniques, clustering of genotypes, canonical variables.

4.2. Introdução

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das plantas cultivadas de maior difusão no globo, sendo consumida em praticamente todos os países, crua em saladas ou como condimento (KHOSA et al., 2016). É a terceira hortaliça em importância econômica no mundo, a produção mundial de cebola em 2016 foi de 92,1 milhões de toneladas. Deste volume, estima-se que cerca de 40% seja de cebolas híbridas com expectativa de crescimento nos próximos anos, uma vez que em países como o Brasil, a utilização de híbridos ainda é recente e ocupa cerca de 20% da área plantada, valores bem inferiores a países como EUA e Japão, onde estes valores chegam a 81% e 73%, respectivamente (ALMEIDA, 2015).

Visualizando esse potencial mercado em expansão, se iniciaram diversos programas de melhoramento de cebola em vários países com objetivo de produzir híbridos. Uma das etapas que mais oneram o custo da semente híbrida nesses programas é a obtenção das linhagens parentais, visto que, por se tratar de uma espécie alógama com ciclo bienal e diplóide ($2n=2x=16$), as mesmas são altamente susceptíveis a depressão por endogamia quando autofecundadas (BREWSTER, 2008). Não obstante durante o desenvolvimento das linhagens, o método de ‘pedigree’ é o mais empregado, pois dele obtém-se o mais alto grau de homoziguidade a cada autofecundação do indivíduo superior selecionado, pronunciando os efeitos da depressão por endogamia, o que leva a um menor vigor e conseqüentemente baixo rendimento de sementes (AYROLES et al. 2009).

Por outro lado, pesquisas mostram que o inter cruzamento entre poucas plantas (‘sibs’) são prováveis de ocorrer frequentemente em populações naturais devido seja ao pequeno tamanho da população local e/ou dispersão limitada dos polinizadores. Ou mesmo promover a diminuição da depressão por endogamia como demonstram as pesquisas de Porcher et al. (2016) e Devaux et. al. (2014). Baseado no mesmo princípio ainda que se tratando de populações submetidas à seleção de indivíduos superiores, poderia avaliar possíveis efeitos na distância genética, com base em caracteres fenotípicos, em populações segregantes oriundas da autofecundação de uma planta, comparativamente às oriundas do inter cruzamento entre duas e três plantas.

Aliado ao elevado desempenho individual, obter uma estimativa de distância genética entre os genótipos é tida como uma forma de prever se a variabilidade genética está sendo mantida, aumentando as possibilidades de seleção de genótipos transgressivos destinados a hibridações (HOSAN et al., 2010). A utilização de estatísticas multivariadas tem se revelado promissora pela possibilidade de sintetizar diversas variáveis em apenas um agrupamento. O

emprego de características fenotípicas em estudos de diversidade genética é um dos procedimentos mais utilizados pelos melhoristas de plantas, pois estas informações são continuamente obtidas para seleção de genótipos superiores e avaliação da adaptabilidade e estabilidade.

Considerando-se a necessidade de diminuir a depressão por endogamia aliada ao incremento de variabilidade genética, o objetivo deste trabalho foi avaliar a divergência genética existente entre genótipos segregantes de cebola obtidos pela autofecundação e pelo intercruzamento de duas e três plantas.

4.3. Material e métodos

Utilizou-se para o estudo 33 populações de cebola em diferentes estados de segregação genética (F_2S_1 , F_2S_2 , S_4 e S_3) obtidas a partir de gerações que já possuíam um baixo ou moderado nível de endogamia. Foram avaliadas em dois anos consecutivos (2014 e 2015), características agrônomicas na fase vegetativa e reprodutiva da cultura. Os experimentos foram realizados na estação experimental da Bayer Vegetable Seeds (Latitude: 18° 55' Sul e Longitude: 48° 16' Oeste, altitude de 873m) e as populações utilizadas pertencem ao programa de melhoramento de cebola da empresa no Brasil, em Uberlândia, estado de Minas Gerais.

Desenho experimental e características avaliadas

O delineamento foi em blocos casualizados com três repetições. Cada parcela foi constituída de um canteiro de um metro de comprimento por 0,9 metros de largura, com cinco linhas espaçadas 0,20 metros, e plantas espaçadas em 5 cm, totalizando 100 plantas por parcela. Os tratamentos constituíram-se das diferentes formas de condução das populações (autofecundação de uma planta [A_1], intercruzamento de duas [B_2] e três plantas [C_3]) em 11 diferentes *backgrounds* genéticos.

As avaliações foram feitas em nível de parcela e para as características não mensuráveis adotou-se a escala de notas de 1 a 9, onde 1 representa pior valor do caráter e 9 melhor valor do caráter.

O semeio para montagem do primeiro campo (fase vegetativa) ocorreu no dia 19 de março de 2014 e o transplante no dia 27 de abril do mesmo ano. Os canteiros foram

preparados e adubados de acordo com as recomendações para a cultura da cebola. As características avaliadas na fase vegetativa foram: vigor das plantas aos 90 e 120 DAS (dias após a sementeira): observando-se o diâmetro da folha, altura de planta e número de folhas; altura de planta aos 150 DAS, em centímetros; diâmetro de ‘pescoço’: nota (1-9) para diâmetro do ‘pescoço’, sendo 1: grosso, 9: fino; arquitetura de planta: sendo 1: prostada, 9: ereta; ciclo, em dias do semeio ao ponto de ‘top-down’ (mais de 50% das plantas tombadas ou em ponto de estalo); severidade de *Botrytis spp.*, onde foi atribuída nota de acordo com a severidade do patógeno *Botrytis cinerea* na parcela.

Após a colheita dos bulbos foram realizadas as seguintes avaliações de bulbo: cor de pele, sendo maior a nota para bulbos com a pele de cor marrom escuro; firmeza do bulbo, total de bulbos na parcela; bulbos comerciais: porcentagem de bulbos comercializáveis, pertencentes às classes II, III e IV de diâmetro de bulbo e produção total, em kg/parcela.

Finalizadas as avaliações dos bulbos, estes foram armazenados e vernalizados por cerca de três meses até o plantio do campo para avaliação dos caracteres relacionados à produção de sementes. O transplante dos bulbos para formação deste segundo campo (fase reprodutiva) se deu no dia 30/04/2015.

Foram avaliadas as seguintes características relacionadas à produção de sementes:

Aspecto geral da planta aos 30, 60 e 90 DAT (dias após o transplante), observando-se o número, o diâmetro e a altura da haste, bem como tamanho da umbela de forma geral na parcela, sendo que, quanto maior o valor destes atributos maior a nota; vigor da haste: nota (1-9), sendo 1: baixo vigor e 9: alto vigor; vigor da umbela: nota (1-9), sendo 1: baixo vigor e 9: alto vigor; número de umbelas: número de umbelas por parcela momentos antes da colheita das sementes; uniformidade de florescimento: foi considerado semanalmente o número de umbelas com flores abertas em cada parcela e atribuído notas de 1 a 9, sendo 1: menor uniformidade e 9: maior uniformidade; pegamento de sementes: nota (1-9), sendo 1: baixo pegamento e 9: alto pegamento; resistência à Alternária: foi atribuída nota de acordo com a severidade do patógeno *Alternaria porri* na parcela, sendo 1: menor severidade, 9: maior severidade; produção de sementes por umbela: peso médio (em gramas) de sementes por umbela na parcela.

Análises univariadas

Antes do início das análises multivariadas foram realizadas análises univariadas para quantificação da variabilidade existente em cada característica avaliada por meio do coeficiente de variação fenotípico. Nas variáveis utilizadas aplicou-se o teste de normalidade

segundo o critério de Shapiro Wilks, procurando-se identificar possíveis desvios de normalidade, para em seguida, realizar as análises multivariadas.

Análises multivariadas

Para analisar a contribuição dos diversos descritores agronômicos na determinação da divergência genética em cada uma das formas de condução (A_1 , B_2 e C_3) das populações foi utilizada 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 utilizadas foram de variáveis canônicas dos componentes principais e das distâncias euclidiana (CRUZ & CARNEIRO, 2012), para obtenção do dendograma utilizou-se UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) como método de agrupamento hierárquico entre grupos de genótipos. A validação do agrupamento pelo método UPGMA foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (CCC) calculado pelo teste de Mantel (1967); e na análise de Variáveis Canônicas, a diversidade genética foi visualizada por meio de gráfico cartesiano (Cruz et al., 2012). A contribuição relativa dos caracteres quantitativos foi calculada segundo critério de Singh (1981). Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o *software* Genes v. 2015.5.0 (CRUZ, 2013).

4.4. Resultados e discussão

A partir da análise de variância multivariada (dados não apresentados), observou-se que o efeito da interação genótipo x método de condução da geração foi significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade de erro, evidenciando um comportamento diferenciado dos genótipos frente ao inter cruzamento de plantas.

No sentido de verificar a divergência entre os genótipos, foi utilizada a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade (Tabela 1). Trata-se de uma medida de distância disponível para a análise de dados quantitativos, sendo utilizada em vários trabalhos como distância genética, quando aplicada em dados experimentais. Houve diferenças nas medidas de dissimilaridade entre os métodos de condução. Em geral os valores foram maiores quando houve o inter cruzamento de plantas, chegando a 9,60 entre os genótipos “BUC” e “GRxBOT-1” e 9,72 entre “BUC” e “GRxBOT-3”. Para uma mesma combinação de genótipos observou-

se tendência de aumento na distância genética com o inter cruzamento de plantas na maior parte dos casos (Tabela 1). Wanser et al., (2012) estimando a variabilidade genética de genótipos de cebola em Santa Catarina também observaram diferenças na divergência entre os genótipos com relação ao local de plantio, Singh et al., (2013) constatou divergência significativa entre os mesmos genótipos de cebola submetidos à condições de dia curto e longo.

Tabela 1: Divergência genética entre 11 genótipos de cebola avaliados pela distância Euclidiana (D) considerando três formas de obtenção das gerações segregantes (Genetic divergence among 11 onion genotypes evaluated by Euclidian distance (D) considering three ways of obtaining segregating generations). Uberlândia, 2018.

Genótipo ¹	Formas de condução			Genótipo ¹	Formas de condução			Genótipo ¹	Formas de condução		
	A ₁	B ₂	C ₃		A ₁	B ₂	C ₃		A ₁	B ₂	C ₃
1-2	6,47	3,57	4,74	2-11	7,23	8,57	7,98	5-8	7,74	7,79	5,24
1-3	7,37	9,09	9,01	3-4	7,30	7,89	8,87	5-9	4,27	7,66	9,72
1-4	4,53	6,55	5,57	3-5	8,59	9,15	6,75	5-10	7,08	7,51	5,34
1-5	6,75	4,26	5,90	3-6	7,61	8,66	8,36	5-11	5,67	8,12	7,08
1-6	5,55	5,13	4,94	3-7	6,84	6,75	6,52	6-7	6,22	4,89	5,50
1-7	5,58	6,19	5,48	3-8	5,79	5,27	7,48	6-8	5,16	7,80	7,48
1-8	5,58	7,02	8,38	3-9	5,45	5,05	5,50	6-9	6,54	7,30	5,07
1-9	8,20	8,52	6,31	3-10	2,58	4,76	3,72	6-10	6,24	5,91	7,96
1-10	6,45	7,55	8,88	3-11	5,34	4,37	5,58	6-11	7,70	7,88	7,13
1-11	5,94	8,34	9,31	4-5	6,19	7,75	6,40	7-8	6,10	7,01	7,21
2-3	8,31	8,39	8,87	4-6	6,09	8,50	6,37	7-9	8,08	6,41	3,87
2-4	6,58	6,33	6,41	4-7	7,28	7,12	7,35	7-10	6,15	4,78	7,02
2-5	5,90	5,03	5,80	4-8	4,90	6,32	8,33	7-11	7,46	6,57	6,83
2-6	7,61	4,82	5,66	4-9	8,36	7,43	7,02	8-9	7,66	5,62	7,06
2-7	8,25	5,64	5,80	4-10	6,10	7,48	8,20	8-10	5,00	5,72	7,15
2-8	7,83	7,36	8,03	4-11	4,59	7,56	9,17	8-11	5,09	5,96	7,84
2-9	7,56	8,10	6,05	5-6	8,84	3,63	5,15	9-10	5,20	5,09	4,78
2-10	6,67	6,02	7,88	5-7	6,18	9,60	9,32	9-11	8,05	5,73	5,39
								10-11	4,60	6,58	5,21

*significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F (significant at 5% of probability of error by the F test). A₁: autofecundação de uma planta; B₂: inter cruzamento de duas plantas e C₃: inter cruzamento de três plantas. ¹1= GRxGR; 2= IP-1; 3= IP-2xIP-3; 4= IP-3xIP-2; 5= BUC; 6= GRxIP-1; 7= GRxBOT-1; 8= GRxBOT-2; 9= GRxBOT-3; 10= GRxBOT-4; 11= CRxBOT-1.

O menor valor D foi atribuído aos genótipos IP-2xIP-3 e GRxBOT-3 (D=2,58), com uma menor diversidade genética entre dois genitores espera-se maior homozigose de modo que na suas gerações segregantes haja menor possibilidade de recuperação de genótipos superiores (PASSOS et al., 2007). Verificou-se tendência de menores valores, com

autofecundação para obtenção da próxima geração, isso se repetiu na maioria dos cruzamentos, indicando que a autofecundação favoreceu ligeiramente uma maior similaridade entre os genótipos para os caracteres estudados, no entanto o principal fator que contribuiu para essa similaridade foi a base genética estreita que ocorre entre os genótipos disponíveis de cebola no Brasil.

É pertinente destacar a divergência encontrada entre IP-1 e IP-2xIP-3 e GRxBOT-1 e GRxBOT-2, embora os materiais sejam derivados da seleção em populações de *backgrounds* semelhantes, ambas exibiram divergência genética acentuada. Isso indica que pode não haver uma correspondência direta entre o relacionamento genético entre acessos e o relacionamento esperado de forma que outros fatores devem ser considerados e não exclusivamente os aspectos fenotípicos. Fenotipicamente ambas as linhas são distintas para um atributo específico, mas geneticamente eles são muito homogêneos. Esta observação sugeriu que as características morfológicas, devido à sua dependência em condições ambientais, são independentes de sua relação genética. Essas observações estão de acordo com Susana. et al. (2015) que relataram o mesmo em variedades de cebola cultivadas no noroeste da Espanha.

Na Tabela 2 é possível verificar a contribuição relativa de cada caráter para divergência entre os genótipos de acordo com a estatística S_j proposta por Singh (1981). Observa-se que os caracteres produção de bulbos/parcela (28,32%), pegamento de sementes (13,12%) e produção de sementes/umbela (13,41%) tiveram significativa contribuição para a divergência dos genótipos de cebola, contribuindo com 54,85%. O caráter resistência à Alternária teve uma contribuição importante na dissimilaridade dos genótipos 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, que desfavoreceu o patógeno. A contribuição relativa de caracteres e a separação de genótipos em grupos distintos auxiliam melhoristas na seleção de genitores em programas de melhoramento. No entanto o potencial *per se* dos genótipos também deve ser considerado como critério de seleção (MATTEDI et al., 2015).

Tabela 2- Contribuição relativa de caracteres para a dissimilaridade genética de 11 genótipos de cebola considerando três formas de obtenção das gerações segregantes (A₁: autofecundação de uma planta; B₂: inter cruzamento de duas plantas e C₃: inter cruzamento de três plantas), estimados pelo método proposto por Singh (1981), com base em 23 caracteres fenotípicos. Uberlândia, 2018.

Caráter	Contribuição relativa (%)
Vigor de planta aos 90 dias	1,34
Vigor de planta aos 120 dias	1,68
Altura de Planta	0,56
Diâmetro de Pescoço	1,30
Arquitetura de Planta	0,89
Ciclo	3,45
Severidade à Botrytis	3,12
Peso Médio de Bulbo	3,45
Porcentagem de bulbos globulares	1,34
Porcentagem de bulbos comerciais	1,76
Produção de bulbos/parcela	28,32
Aspecto geral de hastes aos 30 dias	2,23
Aspecto geral de hastes aos 60 dias	2,02
Aspecto geral de hastes aos 90 dias	0,98
Vigor de Haste	0,98
Vigor de Umbela	2,01
Número de Umbelas/parcela	2,24
Número de Plantas/parcela	2,03
Uniformidade de Florescimento	2,03
Pegamento de sementes	13,12
Resistência à Alternária	9,18
Produção de sementes/parcela	2,56
Produção de sementes/umbela	13,41

A formação de grupos representada por meio de dendrograma, utilizando o método UPGMA (Figura 1), possuiu coeficiente de correlação cofenético de 0,72 ($p < 0,01$). Dessa maneira pode-se afirmar que o dendrograma reproduziu de modo satisfatório a informação contida na matriz e conseqüentemente na formação dos grupos. A separação dos grupos foi realizada pela delimitação de uma linha de corte de 70%, estabelecida no local de ocorrência da mudança abrupta nas ramificações presentes no dendrograma (CRUZ et al., 2012).

Pelo método UPGMA os genótipos de cebola constituíram sete grupos distintos. O grupo I e IV foi formado por 23 dos 33 genótipos; o grupo II pelo pedigree GRxBOT-4 e CRxBOT-1, o grupo III pelos genótipos descendentes dos parentais CRxBOT-1, IP-1 e BUC, o grupo VI pelo genótipo GRxBOT-2 e o grupo VII por IP-1, estes dois últimos grupos individuais, sendo portanto completamente distintos (Figura 1).

González-Pérez et al. (2015) também observaram a formação de grupos divergentes entre genótipos de cebola pela obtenção de um dendrograma representado pelo método de

UPGMA. Pelo método Tocher, outros autores relataram de forma satisfatória a separação de grupos entre genótipos de cebola (RASHID ET AL., 2009; AKTER ET AL., 2015; KHOSA & DHATT, 2015; RIVERA et al., 2016).

O agrupamento dos genótipos seguiu duas tendências, primeiro de acordo com o pedigree, maior similaridade entre indivíduos com os mesmos *backgrounds* era de se esperar. E observou-se também tendência de agrupamento de acordo com a forma de condução das gerações, há uma concentração nos grupos I e IV, de indivíduos descendentes do intercruzamento de plantas (B₂ e C₃). Não houve similaridade ou não foi possível detectar tendências de grupos, diferenciando intercruzamento de duas ou três plantas (Figura 1).

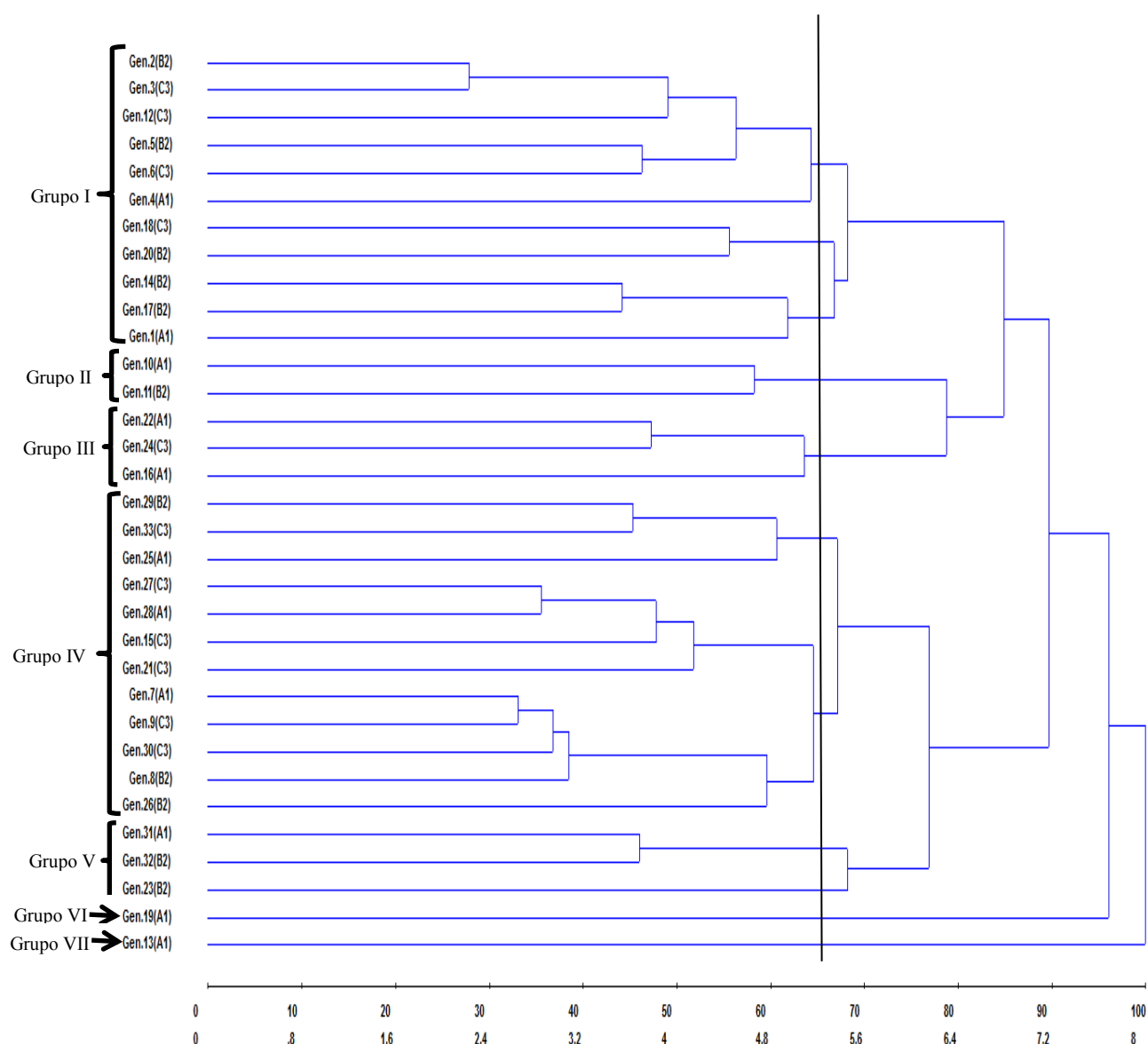


Figura 1- Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 11 genótipos de cebola considerando três formas de obtenção das gerações segregantes (A₁: autofecundação de uma planta; B₂: intercruzamento de duas plantas e C₃: intercruzamento de três plantas), obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando a Distância Euclidiana como medida

de dissimilaridade com base em 23 caracteres fenotípicos. Uberlândia, 2018. Coeficiente correlação cofenética: 0,72**.

Legenda: Genótipo 1, 2 e 3= GRxGR; Genótipo 4, 5 e 6= IP-1; Genótipo 7, 8 e 9= IP-2xIP-3; Genótipo 10, 11 e 12= IP-3xIP-2; Genótipo 13, 14 e 15= BUC; Genótipo 16, 17 e 18= GRxIP-1; Genótipo 19, 20 e 21= GRxBOT-1; Genótipo 22, 23 e 24= GRxBOT-2; Genótipo 25, 26 e 27= GRxBOT-3; Genótipo 28, 29 e 30= GRxBOT-4; Genótipo 31, 32 e 33= CRxBOT-1.

Pela dispersão gráfica dos componentes principais, foi possível identificar seis grupos distintos (Figura 2). As estimativas dos autovalores correspondentes aos dois primeiros componentes principais explicaram 88,36% da variação total, sendo que o componente principal 1 por si só compreendeu 52,13% da variabilidade existente entre os genótipos. De acordo com Cruz et al. (2004), para uma interpretação satisfatória da variabilidade manifestada, é necessário que os primeiros componentes principais permitam estimativas mínimas de 80 % da variação total contidas no conjunto de caracteres, o que foi obtido, com os dois primeiros componentes principais. Dessa maneira pode-se afirmar que houve uma descrição satisfatória da divergência genética representada graficamente. A análise de componentes principais permite condensar a maior quantidade da informação original contida em n variáveis (n =23, neste estudo) em duas variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais criadas com os dois maiores autovalores da matriz de covariância dos dados (HAIR, 2005). Desta forma o conjunto inicial de 23 variáveis passou a ser caracterizado por duas novas variáveis latentes, sendo os genótipos distribuídos de acordo com a dissimilaridade entre si pelo método de Toucher.

Assim como observado pelo método UPGMA, pelo método de Toucher houve uma tendência de agrupamento de acordo com o pedigree, em contrapartida, as diferenças entre os métodos consistiram em uma maior separação dos genótipos de acordo com a forma de condução (A₁, B₂ e C₃). Pela figura 2 verifica-se clara pulverização dos genótipos conduzidos de uma mesma forma. A distribuição dos genótipos no gráfico de dispersão (Figura 2) permitiu identificar como mais divergentes, mais distantes entre si no plano cartesiano, “BUC” e “GRxBOT-3” e como os menos divergentes, GRxBOT-2 e GRxBOT-4. Estes resultados estão de acordo com os obtidos pelo agrupamento de UPGMA, o que indica como confiáveis tais agrupamentos na identificação de genitores divergentes em cebola.

Analisando um mesmo pedigree, constatou-se menor distância entre os indivíduos oriundos do intercruzamento de plantas em relação às plantas que foram autofecundadas, reforçando a ideia de que isso possa ter aumentado a divergência entre os genótipos. Isso pode ter ocorrido, especialmente se os mesmos locos genéticos estão contribuindo para a evolução de muitos desses traços, devido ao maior fluxo de alelos proporcionado pelo intercruzamento

de plantas. Desta maneira os resultados indicam que para a situação proposta de *sib* entre poucas plantas, os cruzamentos entre os diferentes genótipos podem proporcionar linhas segregantes com constituições genéticas de interesse, que aliem menor perda de vigor por endogamia com maior divergência genética.

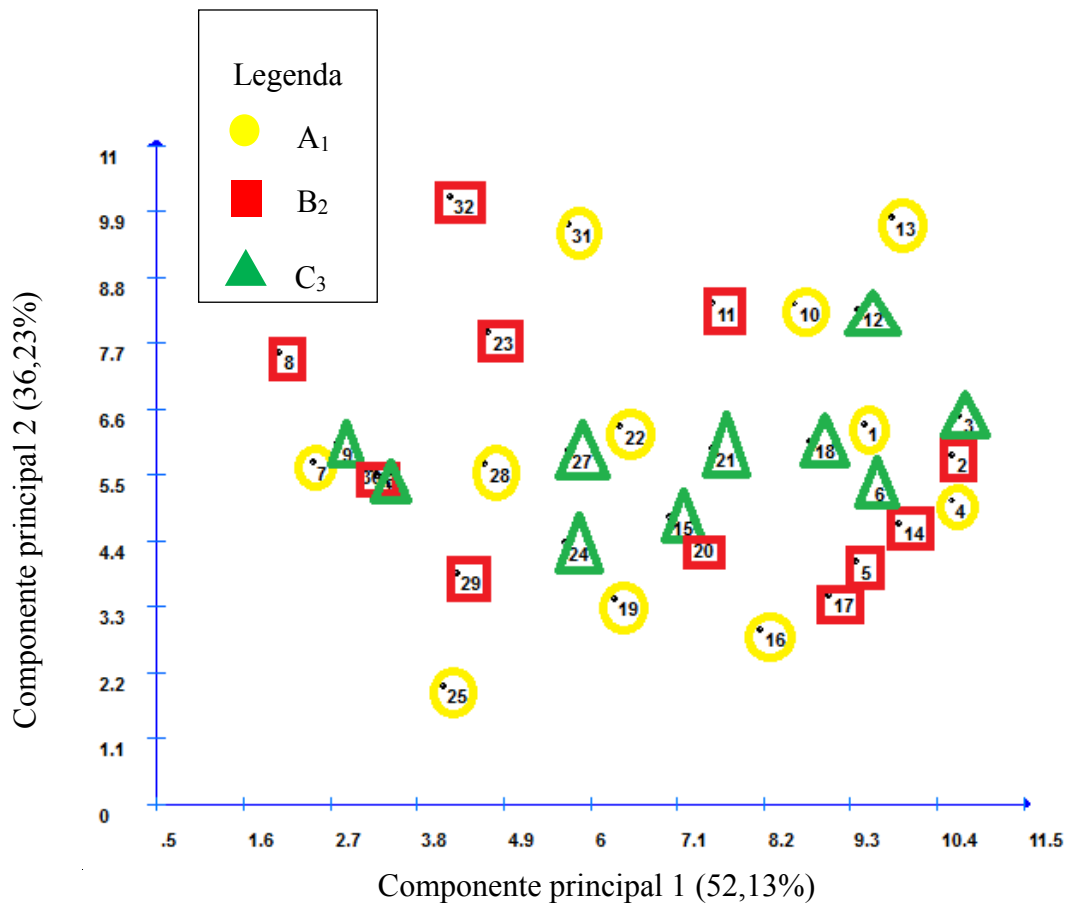


Figura 2- Distribuição dos pontos correspondentes a 11 genótipos de cebola, considerando três formas de obtenção das gerações segregantes (A₁: autofecundação de uma planta; B₂: intercruzamento de duas plantas e C₃: intercruzamento de três plantas) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais com base em 23 caracteres fenotípicos, Uberlândia, 2018. *Número de acessos presentes em cada agrupamento revelados pelo algoritmo de otimização de Tocher, tal como sugerido por Tocher em RAO (1952).

4.5. Conclusões

O método de condução das gerações, através do *sib* de plantas, proporcionou maior divergência entre os genótipos;

Características importantes, como produção de bulbos por parcela, pegamento de sementes, resistência à *Alternária* e produção de sementes por umbela, podem ser usadas nas estimativas da divergência na seleção de linhas segregantes de cebola.

4.6. Referências

- ALMEIDA, D. O. **Tendências da Cebolicultura Mundial para o Próximo Milênio**. Informativo da Associação Nacional dos Produtores de cebola – ANACE, n. 2, setembro de 2015.
- AKTER, M. S. et al. Estimation of Genetic Diversity in Onion (*Allium cepa* L.). **The Agriculturists**, [S.I], v. 13, n. 1, p. 26-34, 2015.
- AYROLES, J. F. et al. A genome wide assessment of inbreeding depression: gene number, function and mode of action. **Conservation biology**, Boston, v. 23, p. 920–930, 2009.
- BREWSTER, J. L. **Onions and other vegetables alliums**. Wallingford, CAB International, p. 236, 1994.
- 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**, Brasília, v. 25, p. 527-532, 2007.
- COIMBRA, J. L. M. et al. Técnicas multivariadas aplicadas ao estudo da fauna do solo: contrastes multivariados e análise canônica discriminante. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, p. 270-276, 2007.
- CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, p. 271-276, 2013.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4.ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. v. 1, 514p.
- DEVAUX C, LANDE, R.; PORCHER, E. Pollination ecology and inbreeding depression control individual flowering phenologies and mixed mating. **Evolution**, London, v. 68, n. 11, p. 3051–3065, 2014.
- GONZÁLEZ-PÉREZ S. et al. Exploring genetic diversity and quality traits in a collection of onion (*Allium cepa* L.) landraces from north-west Spain. **Genetika**, Beograd, v. 47, n. 3, p. 885-900, 2015.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre, Bookman, 2005.

- HOSAN S. M. et al. Genetic divergence in landraces of Bangladesh rice (*Oryza sativa* L.). **The Agriculturists: A Scientific Journal of Krishi Foundation**, [S.I], v. 8, n.1, p. 28-34, 2010.
- KHOSA, J. S. et al. Enhancing onion breeding using molecular tools. **Plant Breeding**, Berlin, v. 135, p.9-20, 2016.
- KHOSA, J. S.; DHATT, A. S Genetic diversity for morphological and biochemical traits in bulb onion. **Indian Journal of Horticulture**, Madras, v. 72, n. 1, p. 143-146, 2015.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Korgarah, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.
- MATTEDI, A. P. et al. Selection of okra parents based on performance and genetic divergence. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 14, p. 3044-3050, 2015.
- PASSOS, A. R. et al. Divergência genética em feijão-caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 579-586, 2007.
- PORCHER, E.; LANDE, R. Inbreeding depression under mixed outcrossing, self-fertilization and sib-mating. **Evolutionary Biology**, New York, v. 16, p. 105, 2016.
- RIVERA, A. et al. Assessing the genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) landraces from northwest Spain and comparison with the European variability. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, [S.I], v. 44, p. 103-120, 2016.
- SINGH, S. R. et al. Determination of genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) by multivariate analysis under long day conditions. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 8, p. 5599-5606, 2013.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, [S.I], v. 41, p. 237-245, 1981.
- SUSANA, G. P. et al. Exploring genetic diversity and quality traits in a collection of onion (*Allium cepa* L.) landraces from north-west Spain. **Genetika**, Beograd, v. 47, n. 3, p. 885-900, 2015.
- WAMSER, G. H. et al. Caracterização e estimativa da variabilidade genética de genótipos de cebola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 327-332, 2012.

CAPÍTULO 4

PHENOTYPIC, GENOTYPIC AND ENVIRONMENTAL CORRELATIONS BETWEEN CHARACTERS IN ONION SEGREGANT POPULATIONS OBTAINED UNDER DIFFERENT GENERATIONS³

³ Artigo publicado na revista Genetics and Molecular Research

5 PHENOTYPIC, GENOTYPIC AND ENVIRONMENTAL CORRELATIONS BETWEEN CHARACTERS IN ONION SEGREGANT POPULATIONS OBTAINED UNDER DIFFERENT GENERATIONS

5.1. Abstract

Onion (*Allium cepa* L.) is the third most valuable vegetable crop worldwide and the third most produced in Brazil. The knowledge of the nature and the value of the relationship between the traits of interest is very important, since it is possible to select a main trait, with low heritability or difficult measurement, obtaining higher genetic gain faster than with direct selection. The aim of this work was to estimate the genotypic, phenotypic and environmental correlations between the characteristics of the plant, the bulb and seed production in onion segregating populations obtained from different breeding methods. Most of the estimations of the genetic correlations (r_g) were higher than the phenotypic (r_p) and the environmental (r_e) ones. The genotypic, phenotypic and environmental correlation coefficients for plant and bulb characteristics were low, except for plant vigour and its components (plant height, neck diameter and plant architecture). The phenotypic and genotypic correlations revealed an association between the traits related to the plant vigour in onion, nevertheless, it was not reflected in the bulb and seed production, in the two years evaluated. The traits “Seed Setting” and “Resistance in Alternaria” can be useful in the indirect selection for “Seed yielding per umbel”.

Keywords: onion segregating populations; genetic correlations; intercross between plants; breeding methods.

5. 2. Introduction

Onion (*Allium cepa* L.) was originated in Central Asia and it has been cultivated since ancient times (3000 BC) because of its unique flavour and medicinal properties (GALMARINI et al., 2001; SHIGYO and KIK, 2008). The onion bulb is not only edible, but it is also well-known for its medicinal and functional properties, since ancient time; Pliny the Elder, for example, in his *Naturalis Historia*, describes 30 ailments that can be alleviated by onions and pointed out that any onion containing dishes are, to a certain extent, curative as well as more nourishing and tasty (LISANTI et al, 2015). Consumption of onions and related Alliums, including garlic (*Allium sativum* L.) and leek (*A. ampeloprasum* L.), is associated with reductions in blood lipids, cholesterol, and platelet activity, contributing to decreased

risk of cardiovascular disease (SAINANI et al., 1976; KENDLER, 1987; AUGUSTI, 1990). Vegetables are the most important source of phenolic compounds in the Mediterranean diet, among which flavonoids in particular are thought to be essential bioactive species that provide health benefits (NINFALI et al., 2005; PANICO et al., 2005). Bulb onion has been recognized as an important reservoir of valuable phytonutrients such as flavonoids, fructo-oligosaccharides, thiosulfates, and other sulfur containing compounds (SLIMESTAD et al., 2007).

Onion is the third most valuable vegetable crop worldwide and the third most produced in Brazil. In 2015, the total production of onion was about 1,42 million tons in 56,4 thousand hectares harvested (IBGE, 2016), with an average productivity of 25,2 ton.ha⁻¹. It is estimated that about 40% of this volume is hybrid onion, it is expected to continue growing in the next years. In countries such as Brazil, the use of hybrids is recent, and takes up about 20% of the planted area, being this percentage lower than in countries like US and Japan, where the planted area with hybrid onion reaches 81% and 83% respectively (ALMEIDA, 2015). Although huge genetic diversity is available in bulb onion, crop improvement progress is not at the pace of other monocot taxa, such as grasses (MCCALLUM 2007, VARSHNEY et al. 2012).

Systematic breeding started with mass selection in various countries during the 19th century, and the discovery of cytoplasmic male sterility paved the way for development of F1 hybrids in the middle of 20th century (BREWSTER 2008, MCCALLUM et al. 2008). Nowadays, F1 hybrids predominate in regions where long-day onions are grown and open-pollinated varieties (OP) predominate in the short-day growing regions of Asia and Africa (CURRAH and PROCTOR 1990, BREWSTER 2008). Due to this Brazilian's potential market several onion's breeding programs are being developed to produce hybrids. In these programs, the selection of the populations is done in first place via mass selection (before flowering), where several traits of the plant and the bulb are evaluated. Then, the inbred lines are obtained from the selected populations. Because these programs begins with a large number of genetic materials, the process is arduous, and the seed's production cost is high. Bulb onion is an outcrossing, biennial diploid ($2n=2x=16$), which is highly susceptible to inbreeding (BREWSTER, 2008). Production of onion inbreds is a time consuming task because of the biennial and open-pollinated nature of the plant. Up to five generations of selfing (~10 years) are required to stabilize agronomically important traits (ALAN et al, 2004). The knowledge of the nature and the value of the relationship between the traits of interest is very important, since it is possible to select a main trait, with low heritability or

difficult measurement, obtaining higher genetic gain faster than with direct selection (CRUZ et al., 2004). In addition, it is possible to identify the inheritable proportion of the phenotypic correlation, that is due to genetic causes (genotypic correlation), and to evaluate the interaction between them and the environment.

There are a few investigations about correlations between traits evaluated in onion. Loges et al. (2004) evaluated 62 progenies of half-sibs of the Vale Ouro IPA-11 onion cultivar, and founded that the marketable bulb production can be increased through the selection for high weight and percentage of marketable bulbs. Mallor et al. (2009) evaluated 15 grower's open-pollinated lines of the cultivar "Fuentes de Ebro" for the traits bulb weight, size, soluble solids content and pungency. They found higher levels of genetic variation for bulb size and pungency than for soluble solids content, and significant phenotypic correlations indicated that milder onion tends to show larger size and lower soluble solids content. Porta et al. (2014) worked with S1 creole lines obtained from one cycle of self-pollination. The authors found positive correlations between plant's vigour, measured 80 days after sowing, and bulb weight, number of leafs and neck diameter. There were no researches in the literature where plant, bulb and production traits were correlated in segregating onion lines, obtained from populations of two or three plants.

The aim of this work was to estimate the genotypic, phenotypic and environmental correlations between the characteristics of the plant, the bulb and seed production in onion segregating populations obtained from different breeding methods.

5. 3. Materials and Methods

The experiment consisted in 33 populations of onion (*Allium cepa* L.), in different generations of genetic segregation (F_2S_1 , F_2S_2 , S_4 and S_3), obtained from generations which had low or moderate inbreeding level. Agronomic traits were evaluated for two years (2014 and 2015), in the vegetative and reproductive stage of the crop. The experiments were carried out at the Bayer Vegetable Seeds' experimental field (Latitude: 18° 55' South and Longitude: 48° 16' West, Altitude of 873m) and the populations used belong to the breeding program of the company in Brazil, in Uberlândia, Minas Gerais state.

5.3.1. Experimental design, field layout and crop management

The experiment was laid out in a randomized block design with three replications. Each plot consisted in five rows of one-meter length x 0, 9 meters width. The distance between plants was 5 cm and the distance between rows was 20 cm, with 100 plants per plot. The observations were recorded per plot and for the non-measurable traits were used an scale from 1 to 9, where 1 represents the worst value for the trait and 9 represent the best value of the trait.

The plants were sown on 19th March 2014 and were transplanted on 27th April 2014. The field was fertilized according to the recommendations for the onion crop. The traits evaluated in the vegetative phase were: Plant Vigor at 90 and 120 DAS (days after sowing): through the measure of the leaf diameter, plant height and number of leaves; Plant Height at 150 DAS, in centimeters; 'neck' Diameter: using a rating of 1 (thick) to 9 (thin); Plant architecture: being 1: prostrated, 9: erect; Cycle, in days from sowing to 'top down' (more than 50% of the plants fall or in tops down); Severity of *Botrytis spp.*, evaluated according with the severity of the pathogen *Botrytis cinerea* in the plot.

After the bulb's harvest, the following evaluations of the bulb were done: skin colour, where the higher rating was to the bulbs with dark brown colour; Bulb Firmness; Number of Bulbs per plot; Commercial Bulbs: percentage of marketable bulbs, belonging to the classes II, III and IV of bulb diameter and Total Production, in kg/plot.

When the evaluations were finalized, the bulbs were stored and vernalized for about three months until the sowing in the field for the evaluation of traits related to seed production. The bulb's transplant for the formation of these second field (reproductive phase) was on 30/04/2015.

The traits evaluated related to the seed production were: General characteristics of the plant at 30, 60 and 90 DAT (days after transplant), evaluating the number, the diameter and the stem's height, the umbel's size in average in the plot, where the higher value got the higher mark; Stem's vigour: using a rating of 1 (low) to 9 (high); Umbel's vigour: 1 (low) to 9 (high); Number of umbels: number of umbels per plot before the seed's harvest; Flowering uniformity, it was counted the number of umbels with open flowers per plot weekly using a rating of 1 (less uniform) to 9 (more uniform); Seed setting, using a rating of 1 (low setting of seeds) to 9 (high setting of seeds); Resistance in *Alternaria*: it was evaluated according to the severity of *Alternaria solani* in the plot, where 1: low severity and 9: high severity; Seed yielding per umbel: average mass (in grams) of seed per umbel in the plot.

5.3.2 Data analysis

The estimation of the correlation coefficients genotypic (r_g), phenotypic (r_p) and environmental (r_e) were obtained through analysis of covariance, combining the pairs, in the first place of the vegetative characteristics and then of the reproductive ones, in all of the possible combinations in each phase (CRUZ & REGAZZI, 2004). The t test was used to calculate the statistical significance of the estimates at 1% and 5% level. The program GENES (CRUZ, 2013) was used to do the statistical analysis.

5.4. Results and Discussion

Most of the estimations of the genetic correlations (r_g) were higher than the phenotypic (r_p) and the environmental (r_e) ones (Tables 1 and 2), showing a greater influence of the genetic component in relation with the others. According to these results, Mohanty (2001) observed in his study of genetic variability, interrelationship and path coefficient in 12 onion varieties that the genotypic correlations were of a higher magnitude than the corresponding phenotypic ones for all the character combinations. Gashua et al. (2013) obtained similar results in their inheritance studies for quantitative traits in onion. Haydar et. al. (2007) also reported that the genotypic correlation coefficients were higher than the phenotypic ones between traits of the bulb yield components in their experiment with 10 onion varieties. They suggested that there was an inherent association among the traits but the environment minimized the phenotypic association.

Table 1: Phenotypic (rp), genotypic (rg) and environmental (re) correlations between fourteen vegetative and bulb production traits, evaluated in different genetic generations, Uberlândia-MG.

		PV120	HP	ND	PA	CYCLE	SB	SC	BF	TB	PC	BP
PV90	rp	0,75**	-0,14	0,63**	0,63**	-0,12	0,06	-0,15	0,24	-0,01	0,07	0,17
	rg	0,98	-0,39	1,00	0,97	-0,14	0,08	-0,22	0,35	-0,14	0,10	0,19
	re	0,50	-0,05	0,05	-0,12	-0,14	0,01	0,05	0,03	0,21	0,16	-0,04
PV120	rp		-0,21	0,71**	0,60**	-0,15	0,16	-0,08	0,01	-0,15	0,32	0,14
	rg		-0,64	1,00**	0,88**	-0,18	0,25	-0,11	-0,08	-0,31	-0,40	0,10
	re		-0,04	0,18	-0,10	-0,12	-0,04	-0,03	0,30	0,12	0,21	0,24
HP	rp			0,10	-0,39*	-0,16	0,36*	0,35*	-0,03	-0,30	-0,03	0,05
	rg			-0,05	-0,92**	-0,41	0,93+	0,95**	-0,19	-0,95**	-0,34	0,13
	re			0,23	-0,05	-0,06	0,12	-0,08	0,09	0,03	0,15	0,03
ND	rp				0,28	-0,21	0,25	-0,09	-0,26	-0,46**	0,35*	0,05
	rg				0,37	-0,24	0,30	-0,11	-0,35+	-0,53+	0,36	0,08
	re				-0,09	-0,05	0,07	0,09	0,09	-0,27	0,32	-0,07
PA	rp					0,08	-0,23	-0,42*	0,21	0,11	0,18	0,13
	rg					0,07	-0,22	-0,44**	0,24	0,18	0,28	0,18
	re					0,21	-0,28	-0,13	-0,04	-0,23	-0,26	-0,22
CYCLE	rp						-0,81**	-0,39*	-0,30	-0,03	-0,05	-0,27
	rg						-0,86**	-0,41+	-0,34	-0,04	-0,05	-0,31
	re						-0,46**	0,05	0,07	-0,01	-0,02	0,09
SB	rp							0,40*	0,11	-0,05	0,16	0,22
	rg							0,43+	0,11	-0,04	0,18	0,26
	re							-0,10	0,11	-0,12	0,10	-0,04
SC	rp								0,17	0,13	-0,24	0,13
	rg								0,18	0,15	-0,30	0,15
	re								0,09	0,05	0,10	0,03
BF	rp									0,44**	-0,27	0,22
	rg									0,57**	-0,40+	0,23
	re									-0,02	0,18	0,12
TB	rp										-0,20	0,44**
	rg										-0,17	0,43+
	re										-0,27	0,51**
PC	rp											0,27
	rg											0,33
	re											0,11

PV60: Plant vigor at 60 days PV120: Plant vigor at 120 days PH: Plant height ND: Neck diameter PA: Plant architecture CYCLE: Duration of the cycle SB: Severity at Botrytis SC: Skin color BF: Bulb firmness TB: Total bulbs PC: Percentage of commercial bulbs BP: Bulb production

**,* : Significant at 1% and 5% probability respectively, by Student's t-test.

+,+ : Significant at 1% and 5% probability respectively, by Bootstrap method with 5000 simulations.

High genetic correlation was found between the traits plant vigour at 120 DAT and neck diameter (1,00), plant height and plant architecture (0,92), general appearance at 60 days

and umbel's vigour (0,89), seed setting and number of seeds per umbel (0,89). These results revealed a direct relationship between these traits, making possible the indirect selection from only one of them.

Negative genetic correlations were observed between plant height and total number of bulbs per plot (-0,95) and between neck diameter and total number of bulbs per plot (-0,53). A higher number of bulbs per plot is desirable in a breeding program, since it enables the multiplication, the bulb selection and the evaluation of a new genotype's cycle. The larger plant vigour, showed by the higher height and neck diameter, did not represent a higher number of bulbs per plot (Table 1).

The genotypic, phenotypic and environmental correlation coefficients for plant and bulb characteristics were low, under 0,50, for most of the traits (Table 1), except for plant vigour and its components (plant height, neck diameter and plant architecture). The greater r_p and r_g coefficients were observed between the traits plant vigour at 120 DAT and neck diameter (0,71 and 1 respectively), plant height and plant architecture (-0,39 and -0,92) and cycle and Botrytis severity (-0,81 and -0,86). The r_g had the same sign, and in most of the correlations, higher values than the r_g related (Table 1). Torres et al. (2016), found identical results in their experiments with *Urochloa brizantha*, revealing the reduction of the phenotypic expression in front of the environment influence.

Despite the high r_p founded between some traits, mainly those associated with the vegetative phase, it is important to clarify that the r_f can induce false interpretations. Galmarini et al. (2001) reported significant phenotypic correlations among soluble solids content, total dry matter, pungency, and onion-induced in vitro antiplatelet activity in their work with onion F₃M families derived from a cross between two inbred populations. The strong phenotypic and genetic correlations revealed by this study may be the result of linkage among genes that independently control these traits or to pleiotropic effects of the same gene(s).

The bulb's traits presented a low but significant r_g between total number of bulbs and bulb's production (0,43). Despite this, it is not possible to do indirect selection of the trait, because the genetic gain is low and there is not a time gain comparing with direct selection.

The r_e between traits with differences in magnitude and sign, related to the respective r_g correlations, showed that the environment benefited a trait putting other at a disadvantage. Also demonstrated that the causes of the genetic and environmental variations present different physiological mechanisms, what can make difficult indirect selection (Cruz et al., 2004).

The r_p estimations for the seed production traits were higher than the ones related to the plant and the bulb. The traits general characteristics of the plant at 30 DAT, general look at 60 DAT, stem vigour, number of umbels and flowering uniformity, presented high correlations between them (Table 2), what would allow the selection of one or two of these traits in a breeding program at a lower cost.

Positive and high r_p coefficients were observed between “flowering uniformity” and the traits general characteristics of the plant at 30, 60 and 90 DAT, demonstrating that a higher plant vigour causes lower flowering outbreaks, and therefore, higher uniformity. On the other hand, the r_p between flowering uniformity and number of umbels was negative (-0,46), similar results were obtained by Sunil et al., in their work with 23 inbred lines in India.

A considerable reduction in the correlations magnitudes was observed in the traits seed setting, *Alternaria* resistance and seed yielding per umbel. It elucidates that the higher umbels vigour did not reflect in a higher seed setting. The r_p and r_g between umbel vigour and seed setting were 0,25 and 0,27 respectively. These results suggest that it is not possible to select populations with high seed production potential through traits related to plant vigour, because other factors such as pollinator attraction, genetic compatibility, maturation and plant physiology at the end of the cycle are involved. Onion is an allogamous plant so pollinators are essential for seed production. According to Nascimento et al. (2012), a poor pollination is one of the causes of a low seed production. The absence of natural pollinators on onion seed plantations poses a serious problem for breeders all over the world. Widespread use of the honeybee as the pollinator does not always bring about the expected results because the onion nectar is not particularly attractive for it and the appearance of different sources of nourishment can easily pull away this bee from plantations of flowering onion (WILKANIEC et al. 2004).

Despite this, significant r_e was observed between general plant look at 90 days and seed yielding per umbel (0,53), supporting the hypothesis that these results could be influenced by the sowing date, considering that several populations were evaluated, so the different adaptation ability could influence the r_p and r_g founded. According to this, Mondal *et al.* (1986) in their experiment with spring- and autumn-sown onions planted in two dates observed that for each cultivar the maturity date increased linearly with decreases in the percentage radiation intercepted by the leaf canopy. the productivity of onion crops is strongly influenced by the time of the onset of bulbing and the duration of bulb growth. Bulb formation in onion is a process consisting of both growth and apical development (Brewster, 1990).

High and positive r_p and r_g were observed between the traits seed setting and seed yielding per umbel (0,87 and 0,92 respectively). The traits Resistance in *Alternaria* and seed yielding per plot were positive correlated, (r_p : 0,72 and r_g : 0,82). Similar results were obtained by others authors, like Mamgain *et al.* (2013) in their work with mustard (*Brassica juncea*) in India. They observed great damages in the plant tissues and in the seed production caused by the necrotic nature and the high potential of the specie toxins. The yield losses can reach up to 50%, if the climate conditions were propitious for the fungus infection.

Despite the low magnitude, it was observed positive phenotypic correlation between general aspect of the plant at 90 DAT and seed setting (0,37) and Resistance in *Alternaria* (0,47). The correlations between the traits related to seed production (stem vigour, number of umbels, umbel vigour) were not significant and presented low magnitude, supporting the fact that the physiological processes at the end of the plant cycle are decisive to define the seed yielding per umbel produced.

Correlation coefficients around zero were founded between traits associated with seed production (Table 2), revealing the absence of a linear relation between them (CRUZ *et al.*, 2004).

Table 2: Phenotypic (rp), genotypic (rg) and environmental (re) correlations between twelve characters of seed production, evaluated in different genetic generations, Uberlândia-MG.

Caráter		GA60	GA90	VS	VU	NU	NP	FU	FF	RA	SYU
GA30	rp	0,93**	0,86**	0,78**	0,81**	-0,56**	-0,33	0,90**	0,15	0,27	0,04
	rg	0,96	0,91	0,82	0,88	-0,60	-0,36	0,94	0,15	0,28	0,04
	re	0,65**	0,27	0,31	0,25	0,08	0,10	0,27	0,22	0,11	0,10
GA60	rp		0,92**	0,91**	0,89**	-0,51**	-0,26	0,85**	0,15	0,29	-0,01
	rg		0,96	0,95	0,96	-0,55	-0,29	0,89	0,12	0,30	-0,04
	re		0,52**	0,49**	0,34*	0,06	0,15	0,36*	0,30	0,07	0,19
GA90	rp			0,84**	0,88**	-0,37*	-0,10	0,80**	0,37*	0,47**	0,16
	rg			0,89	0,95	-0,41	-0,11	0,84	0,39	0,49	0,17
	re			0,37*	0,18	0,16	0,45**	0,29	0,21	0,20	0,53**
VS	rp				0,89**	-0,52**	-0,33	0,65**	0,09	0,21	-0,08
	rg				0,94	-0,57	-0,36	0,68	0,07	0,23	-0,11
	re				0,53**	0,16	0,10	0,31	0,22	0,07	0,13
VU	rp					-0,44**	-0,20	0,75**	0,25	0,32	0,09
	rg					-0,50	-0,23	0,81	0,27	0,36	0,09
	re					0,12	0,14	0,29	0,18	-0,04	0,12
NU	rp						0,85**	-0,46**	0,05	-0,10	-0,09
	rg						0,86	-0,51	0,07	-0,11	-0,08
	re						0,63**	0,21	-0,11	0,05	-0,21
NP	rp							-0,27	0,18	0,04	0,02
	rg							-0,29	0,21	0,04	0,03
	re							0,09	-0,04	0,07	-0,12
FU	rp								0,14	0,24	0,03
	rg								0,13	0,25	0,03
	re								0,18	0,02	0,01
SS	rp									0,84**	0,87**
	rg									0,95+	0,92+
	re									0,22	0,72**
RA	rp										0,72**
	rg										0,82+
	re										0,19

GA30: General appearance at 30 days GA60: General appearance at 60 days GA90: General appearance at 90 days VS: Vigor of stem VU: Vigor of umbel NU: Number of umbels NP: Number of plants FU: Flowering uniformity SS: Seed setting RA: Resistance to Alternária SYU: Seed yielding per umbel.

**,* : Significant at 1% and 5% probability respectively, by Student's t-test.

++,+ : Significant at 1% and 5% probability respectively, by Bootstrap method with 5000 simulations.

5.5. Conclusions

Genetic correlations were higher than phenotypic and environmental ones, for the most agronomic traits in onion;

Plant vigor at 120 DAS was genetically correlated with plant architecture ($r_g = 0,88^{++}$) and neck diameter ($r_g = 1,00^{++}$), as plant height and bulb skin color were genetically correlated ($r_g = 0,95^{++}$);

The trait seed setting was genetically correlated with *Alternaria* resistance ($r_g = 0,95^+$) and seed yielding in grams for umbel ($r_g = 0,92^+$). These both last traits could be used as an indirect selection criteria for high seed yielding in onion.

5.6. References

- ALAN, A. et al. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant Science**, [S.I.], v. 167, p. 1055–1066, 2004.
- BREWSTER, J. L. (1990). **Physiology of crop growth and bulbing**. In: Onions and allied crops. Volume I: Botany, physiology, and genetics (Rabinowich, H. D. and Brewster, J. L., Eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 53-81.
- BREWSTER J. L. (2008) **Onions and Other Vegetable Alliums**, 2nd edn. CAB International. Wallingford, United Kingdom.
- CRUZ, C. D. GENES: A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, Londrina, v. 35, p. 271-276, 2013.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 480p.
- CURRAH, L.; PROCTOR, J. F. 1990: Onions in tropical regions. Natural Resources Institute, Chatham, UK. Bulletin 35, 31-42.
- GALMARINI, C. R.; GOLDMAN, I. L.; HAVEY, M. J. Genetic analyses of correlated solids, flavour, and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, [S.I.], v. 265, p. 543-551, 2001.
- GASHUA, I. B. et al. Inheritance studies of some quantitative traits in onion (*Allium cepa* L.) **International Journal of Biosciences**, Dhaka, v. 3, n. 4, p. 135-141, 2013.
- HAYDAR, A. et al. Genetic Variability and Interrelationship in Onion (*Allium cepa* L.). **Middle-East Journal of Scientific Research**, Faisalabad, v. 2, p. 132-134, 2007.

- LISANTI, A. et al. Antioxidant activity of phenolic extracts from different cultivars of Italian onion (*Allium cepa* L.) and relative human immune cell proliferative induction. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 54, n. 5, p. 799-806, 2016.
- LOGES, V. et al. Correlações entre caracteres agronômicos associados à resistência a tripses em cebola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 624-627, 2004.
- MALLOR, C. et al. Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. **Plant Breeding**, Berlin, v. 130, p. 55-59, 2009.
- MCCALLUM, J. S. et al. Genetic diversity analysis and single nucleotide polymorphism marker development in cultivated bulb onion based on expressed sequence Tag-simple sequence repeats markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, p. 810-818, 2008.
- MOHANTY, B. K. Genetic variability, interrelationship and path analysis in onion. **Journal of Tropical Agriculture**, Kerala, v. 39, p. 17-20, 2001.
- MONDAL, M. F. et al. Development in onion (*Allium cepa* L.) I. effects of plant density and sowing date in field conditions. **Annals of Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 187-195, 1986.
- NASCIMENTO, W. M. et al. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 494-498, 2012.
- NINFALI, P. et al. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, p. 257-266, 2005.
- PANICO, A. M. et al. Protective effect of *Capparis spinosa* on chondrocytes. **Life Sciences**, Berkeley, v. 77, p. 2479-2488, 2005.
- PORTA, B. et al. Variability, heritability, and correlations of agronomic traits in an onion landrace and derived S1 lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.I.], v. 14, p. 29-35, 2014.
- SUNIL, N. et al. Phenotypic Diversity and Genetic Variation within a Collection of Onion (*Allium cepa* L.) Germplasm from Peninsular India. **Electronic Journal of Plant Breeding**, [S.I.], v. 5, n. 4, p. 743-751, 2014.
- TORRES, F. E. et al. Contribuição dos caracteres de qualidade da forragem ao teor de proteína bruta em *Urochloa brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 3, p. 284-287, 2016.
- SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VÅGEN, I. M. Onions: A source of unique dietary flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.I.], v. 55, p. 67-80, 2007.
- WILKANIEC, Z.; GIEJDASZ, K.; PRÓSZYŃSKI, G. Effect of pollination of onion seeds under isolation by the red mason bee (*Osmia rufa* L.) (Apoidea, Megachilidae) on the setting and quality of obtained seeds. **Journal of Apicultural Science**. v. 48 n. 2, p. 35-41, 2004.

CAPÍTULO 5

USO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO EFEITO ENDOGÂMICO EM CEBOLA

6 USE OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH INBREEDING EFFECT ON ONION

6.1. Abstract

There are reports in the literature that intercrossing among a few plants occurs naturally, mainly due to the low dispersion of pollen grains, and promote the reduction of depression due to endogamy at the population level. There are practically no studies of this nature involving onion culture; this study aims to discuss the genetic basis of the inbreeding effect, to raise possible hypotheses based on the available literature as well as on the results obtained with the use of SSRs on the effects that proposed sibs can affect endogamic depression. To this end, 12 onion populations belonging to the Bayer company's onion breeding program were used (derived from four different backgrounds), obtained through self-fertilization of a plant, two-plant intercrossing or three-plant intercrossing. Three individuals of each lineage were used in the analyzes. The amplifications were performed using a set of primers, selected for their higher polymorphism, according to previous studies of germplasm characterization carried out by CITA-Spanish researchers and representative of the onion genome. The results demonstrated that the SSRs used may be useful for detecting variability in Brazilian onion germplasm so that inbreeding depression cannot be readily interpreted as due to homozygous effects for deleterious mutations. The self-fertilization, in general, provided lower heterozygosity, which grows as more plants were added to the crosses. It is suggested that intercrossing should begin in populations with a low level of inbreeding, to the best advantage of the method.

Keywords: SSR in intercrossing; polymorphism in onion; genotyping; primers.

6.2 Introdução

Atualmente entre os marcadores moleculares utilizados, os microssatélites ou SSR's vêm sendo muito úteis em programas de melhoramento vegetal por apresentarem maior conteúdo informativo. Os SSR's se distinguem dos demais por serem abundantes, podendo estar ligados a locos representativos de todo o genoma, apresentam o caráter co-dominante, podendo diferenciar os homozigotos dos heterozigotos formando locos genéticos altamente polimórficos e serem de natureza multialélica (XANTHOPOULOU et al., 2014). Ainda se

caracterizam por necessitarem de pequenas quantidades de DNA e serem transferíveis entre espécies de um mesmo gênero.

Os microssatélites são pequenas sequências repetidas em tandem que variam de 1 a 6 pares de bases. Estes marcadores destacam-se pela grande variação no número de repetições, resultantes de eventos mutagênicos dinâmicos e complexos como: crossing over desigual, retrotransposição e, principalmente, deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) (BHARGAVA & SHARMA, 2013). São muito úteis quando o intuito é diferenciar genótipos de base genética muito estreita (como ocorre com *Allium cepa* L.), devido a sua alta frequência de heterozigidade e sua característica multialélica, propiciando discriminação mais precisa (KIRST et al., 2005). A grande limitação e dificuldade na utilização dessa classe de marcadores está na necessidade do isolamento e desenvolvimento de *primers* específicos para cada espécie, sendo esse processo demorado, trabalhoso e de alto custo.

Para *Allium cepa*, o conhecimento da diversidade e dos recursos genéticos ainda é limitado, o número de SSR disponíveis na literatura é bastante limitado, e alguns têm aplicação complexa (JAKSE et al., 2005). O desenvolvimento de marcadores moleculares em cebola é dificultado pelo enorme genoma, 36 vezes maior que o do arroz, e pelo alto nível de heterozigidade (frequência de heterozigotos), com baixo nível de diversidade alélica entre cultivares da espécie e devido seu ciclo bienal (MCCALLUM e HAVEY, 2006). Até o momento apenas 67 SSR foram publicados para cebola.

Fischer e Bachmann (2000) em estudo taxonômico foram os primeiros a desenvolver marcadores SSR's específicos para a cebola, os autores usaram 30 *primers* de microssatélites para tentar discriminar acessos interespecíficos do gênero *Allium*. No entanto as amplificações obtidas foram complexas e os autores concluíram que tais *primers* não seriam suficientes para permitir seu uso mais amplo em estudos de mapeamento e diversidade genética. Masuzaki et al. (2006), utilizando grande parte destes mesmos *primers*, relataram maior polimorfismo e poder discriminante em um subconjunto deles. Nos últimos anos marcadores SSR's tem sido desenvolvidos em estudos de mapeamento do genoma da cebola (BALDWIN et al., 2012), discriminação de cultivares (KISHA e CRAMER, 2011; KHAR et al., 2011) e acesso de diversidade genética em variedades locais de cebola na Espanha (MALLOR et al., 2014).

Apesar do avanço nas pesquisas com a obtenção de marcadores SSR's específicos para a cebola, não há estudos relacionando o uso destes marcadores com efeito endogâmico, por isso foi proposto este estudo inicial que visa caracterizar a nível molecular linhagens de cebola (*Allium cepa* L.) com diferentes '*backgrounds*' e níveis de endogamia, proporcionadas pela fecundação cruzada ('sib') de duas e três plantas, comparativamente à de uma planta

autofecundada. O estudo visa discutir e levantar hipóteses acerca das possíveis diferenças de polimorfismo e níveis de heterozigosidade, observadas nas linhagens advindas dos diferentes números de plantas inter cruzadas e autofecundada.

6.3 Material e métodos

As análises moleculares foram realizadas de março a julho de 2017, no laboratório de biotecnologia do Centro de investigação e tecnologia agroalimentar de Aragón (CITA), na Espanha (latitude 41°39' N). O qual nos últimos dois anos validaram cerca de 22 *primers* na caracterização do banco de germoplasma do gênero *Allium* na Espanha.

As populações de cebola do presente estudo pertencem ao programa de melhoramento de cebola da empresa Bayer, do qual foram utilizadas doze linhagens (derivadas de quatro diferentes ‘*backgrounds*’) obtidas através de autofecundação de uma planta, inter cruzamento de duas plantas ou inter cruzamento de três plantas. Utilizaram-se três indivíduos de cada linhagem nas análises. Os detalhes sobre as características de cada linhagem estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Descrição dos *backgrounds*, gerações e nível de endogamia em 12 populações segregantes de cebola.

Background	Gerações*	Codificação	Nível médio de endogamia
1. GRxGR	F ₂ S ₃	A ₁	Moderado
2. GRxGR	F ₂ S ₂ SIB2plantas	B ₂	
3. GRxGR	F ₂ S ₂ SIB3plantas	C ₃	
4. IP-1	S ₄	A ₁	
5. IP-1	S ₃ SIB2plantas	B ₂	
6. IP-1	S ₃ SIB3plantas	C ₃	
7. GRxIP-1	F ₂ S ₁	A ₁	Baixo
8. GRxIP-1	F ₂ SIB2plantas	B ₂	
9. GRxIP-1	F ₂ SIB3plantas	C ₃	
10. IP-2xIP-3	F ₂ S ₁	A ₁	
11. IP-2xIP-3	F ₂ SIB2plantas	B ₂	
12. IP-2xIP-3	F ₂ SIB3plantas	C ₃	

* S/ indica o número de autofecundações realizadas A₁= Autofecundação; B₂= inter cruzamento de duas plantas; C₃= inter cruzamento de três plantas

Para o estudo realizado com marcadores de microssatélites foi realizado, a partir de folhas, o protocolo de extração de DNA CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com modificações para *A. cepa*. A qualidade e a concentração do DNA extraído foi verificado em gel de agarose a 2%. As concentrações finais de DNA foram ajustadas para 10 ng. μL^{-1} com um tampão MTE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, 1 mM de EDTA).

As amplificações foram realizadas usando um conjunto de primers (Tabela 1), selecionados por seu maior polimorfismo de acordo com os estudos anteriores de caracterização de germoplasma realizado pelos pesquisadores do CITA e que fossem representativos do genoma da cebola (um para cada um dos oito cromossomos catalogados para *Allium cepa*).

A amplificação por PCR foi realizada numa solução final de 20 μL contendo 10 ng de DNA genômico, 1x tampão de PCR (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 + 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl_2 , 65 μM de dNTP (Invitrogen), 0,25 μL de DMSO ($\geq 99,9\%$ Sigma), 0,2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,0625 μM do *primer* e 0,25 μM de cada iniciador reverso e cauda M13 (5'- CACGACGTTGTAAAACGAC-3') marcado na extremidade 5' com um dos 2 corantes fluorescentes 6-FAM ou HEX (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (SCHUELKE, 2000). As reações de PCR foram realizadas num termociclador (modelo 9700, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, EUA) sob as seguintes condições cíclicas: 5 min de desnaturação a 94°C seguido de 4 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 55°C (sendo que, a cada ciclo a temperatura diminuía 1°C) e 45s a 72°C. Isso foi seguido por 36 ciclos a 94°C por 30s, 58°C por 45s e 72°C por 45s, com uma extensão final em 72°C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese capilar em um ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados brutos produzidos e a genotipagem foram obtidos usando o software GeneMarker[®] (Softgenetics, LLC, State College, PA, USA).

Os microssatélites foram comparados observando os seguintes fatores: o tamanho dos fragmentos amplificados identificado pela observação dos diferentes fluorocromos utilizados em cada microssatélite e localização cromossômica. A análise da possível relação de cada loco (identificado pelo primer) com a depressão endogâmica observada em cebola, foi realizada através do acesso aos bancos de informações GenBank da NCBI (National Center for Biotechnology) e ENA (European Nucleotide Archive) e literatura disponível.

Tabela 1: Primers microssatélites de *Allium cepa* utilizados nas análises. Nome do loco, sequência do primer Forward (F) e Reverse (R) e número de acesso no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Loco	Sequência do primer	Número de acesso GenBank
ACM101	F-CCTTTGCTAACCAAATCCGA R- CTTGTTGAGAAGGAGGACGC	CF443425
ACM138	F-ACGGTTTGATGCACAAGATG R-CCAACCAACAGTTGATACTGC	CF451850
ACM134	F- ACACACACAAGAGGGAAGGG R- CACACACCCACACACATCAA	CF449417
ACM146	F: ATGTCCCAATTCGACCAGAG R: CGTTACGGCTGAGAACTTCC	CF446333
ACM240	F-GTGCAACTCCAAGAGAAGGG R-AATATAAAGGCGTTGGCCTG	CF444554
ACM255	F-AAATTCCTCAAACGAAACCC R-GGGTTTCAGGAACAGTCAGC	CF449065
ACM322	F- TTCTTCTCCTATCCAGCTATCG R-GTGATTTGGGAGGGGATTTT	ES449660
ACM235	F-ACGCATTTTCAAATGAAGGC R-TGAGTCGGCACTCACCTATG	CF441946

Tabela 2: Primers microssatélites de *Allium cepa* utilizados nas análises. Temperatura de anelamento (Ta° C), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) médio relatado por Jakse et al. (2005), McCallum et al. (2008), Mallor et al. (2014), amplitude de tamanho dos produtos encontrados para cada loco e posição no cromossomo do SSR.

Loco	Ta°C	PIC (%)	Amplitude (pb)	Posição (cM)
ACM101	58	0,71	209-248	14,2 Cromossomo 1
ACM146	58	0,77	213-242	73,0 Cromossomo 2
ACM240	55	0,53	213	114,5 Cromossomo 3
ACM255	55	0,58	180	82,7 Cromossomo 4
ACM138	55	0,67	235-286	346,9 Cromossomo 5
ACM322	60	0,62	269	33,5 Cromossomo 6
ACM134	55	0,72	192-212	78,2 Cromossomo 7
ACM235	60	0,75	288-304	254,4 Cromossomo 8

*Foi utilizado o fluoróforo FAM em ACM101, ACM146, ACM138 e ACM322 e HEX nos demais.

Além da análise da região de amplificação do primer, foi obtido o número médio de alelos por loco (A_m) pela relação entre o número total de alelos e o número total de locos. A diversidade entre as linhagens segregantes foi calculada a partir da frequência alélica, (p_i) e da heterozigidade observada.

A heterozigidade foi calculada para os locos identificados de cada uma das 12 populações em estudo por meio da expressão: $H = 1 - \sum p_i^2$, em que p_i é a frequência do alelo i .

6.4 Resultados e discussão

Dos oito locos microssatélites testados, dois não amplificaram para o tamanho de banda buscado (20%) e seis apresentaram-se consistentes (80%) com certo padrão polimórfico. Esses valores encontrados confirmam o elevado conteúdo de informação genética esperado para marcadores microssatélites, assim como já observado por McCallum et al. (2008), Santos et al. (2010) e Hanci & Gökçe et al. (2016), todos caracterizando *Allium cepa*. No entanto as ampliações polimórficas foram de difícil interpretação, assim como a leitura dos picos *stutter* durante a genotipagem utilizando o programa GenMarker. Vários autores como Jakse et al. (2008) e Lee et al., (2013), relataram a complexidade das condições para as reações de PCR e o enorme genoma da cebola como fatores que tornam os SSR de difícil interpretação para genotipagem em cebola como observado neste trabalho.

Esses fatores contribuíram para que, até o momento, não ocorresse o sequenciamento completo do genoma da cebola, o que facilitaria estudos desta natureza. Todavia estudos recentes como o de Shukla et al. (2016) e o projeto Sequon - *Onion Genome Sequencing* colocam o sequenciamento completo do genoma da cebola como questão de tempo, os autores propõem uma compilação de todos os dados disponíveis no banco de marcadores funcionais EST-SSR e RNA sequenciados em *Allium cepa* juntamente com os marcadores já registrados no GenBank. Em uma segunda etapa, os trabalhos também visam uma predição do mRNA com os respectivos genes sequenciados, podendo com isso evidenciar o processo de transferência da codificação do DNA.

No caso do microssatélite ACM 235, apesar de não haver amplificado banda na região buscada (a literatura relata banda de 288 a 304 pb), apresentou grau de polimorfismo interessante entre as linhagens segregantes (Figura 1), apresentando-se promissor para futuros estudos com cebola. McCallum et al. (2006) realizando mapeamento genético para estudar o gene de maior efeito sobre os teores de açúcares no bulbo, identificou o marcador ACM235 como sendo o mais polimórfico e com significativa relação com os teores de frutano no bulbo.

As doze populações segregantes estudadas apresentaram diversidade genética para os oito locos analisados com total de 49 alelos nas progênies derivadas de autofecundação, 52 do intercruzamento entre duas plantas e 55 alelos quando três plantas foram intercruzadas (Tabela 3). Para a situação onde autofecundou-se uma planta, os indivíduos amostrados da população apresentaram um número menor de alelos (49 no total) do que o observado no ‘sib’ de duas plantas (52 no total), sugerindo a imigração de alelos, devido a maior segregação dos genes. Cabe ressaltar, todavia que estes resultados são apenas sugestivos a um menor efeito

endogâmico quando utilizaram-se duas e três plantas, comparativamente à uma planta autofecundada. Um estudo com maior número de plantas daquelas que foram utilizados neste trabalho deve ser considerado.

O número médio de alelos em cada locos (R) variou na média de 1,71 a 4,43. Santos et al. (2010) em estudo de caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites detectou 40 alelos nos 13 SSR polimórficos encontrados, sendo que o número médio de alelos por loco variou de dois a sete, com média de três alelos por SSR nas 44 cultivares de cebola genotipadas, resultados semelhantes aos reportados neste estudo.

Para os *primers* ACM146 e ACM134 foi observada variação alélica por loco maior, enquanto que dos *primers* que promoveram alguma amplificação, no ACM240 o número de alelos foi menor. Rivera et al. (2016) avaliando a diversidade genética em variedades locais de cebola (*Allium cepa* L.) no nordeste da Espanha, também colocaram o *primer* ACM146 dentre os que proporcionaram maior variação alélica, evidenciando o potencial deste SSR na caracterização da variação intrapopulacional. Segundo Brown & Weir, 1983 a variação alélica caracteriza um componente da diversidade em uma população, que é a riqueza alélica. Quando o polimorfismo é alto, espera-se que esta medida também seja alta. Praticamente não houve diferenças quanto ao número médio de alelos entre as diferentes formas de obtenção das linhagens (Tabela 3).

Tabela 3: Número total de alelos observados (k) e número médio de alelos por locos (R) para oito marcadores SSR para cebola, avaliados em três diferentes gerações genéticas.

Loco	Autofecundação		Sib 2 plantas		Sib 3 plantas	
	k*	R	k	R	k	R
ACM101	8	3,42	9	3,86	10	3,71
ACM146	11	4,42	13	4,29	14	4,29
ACM240	6	1,71	6	2,00	6	2,00
ACM255	0	0	0	0	0	0
ACM138	8	3,42	8	3,43	9	3,71
ACM322	7	3,52	7	3,43	7	3,57
ACM134	9	4,00	9	4,29	9	4,43
ACM235	0	0	0	0	0	0
Total de alelos	49		52		55	

*Considerando os três indivíduos amostrados por população

A média da heterozigosidade (H) dos seis locos SSR que amplificaram foi 0,21 e os locos ACM146 e ACM134 apresentaram as maiores frequências de heterozigotos (Tabela 4). A frequência de heterozigotos representa a existência de variabilidade, pois cada indivíduo

diploide, como é o caso da cebola, pode ter até dois alelos por loco (WEIR, 1996) em que a variabilidade é maior com a maior frequência de heterozigotos.

De um modo geral foi observada baixa frequência de heterozigotos nas progênies oriundas das diferentes formas de condução das gerações com amplitude de 0,06 a 0,43. Trifonova et al. (2017), trabalhando com microssatélites na análise da diversidade genética em espécies endêmicas de *Allium regelianum*, encontraram proporção de heterozigotos variando de 0,14 a 0,29, valores próximos aos deste estudo, enquanto Mallor et al. (2014), trabalhando com diferentes espécies do gênero *Allium*, relataram valores superiores com proporção de heterozigotos chegando a 0,92. Certamente, a alta proporção de homozigotos encontrados neste estudo, pode ser explicado por tratar-se de populações melhoradas com base genética estreita, que já vinham em um processo de seleção, o que acaba por pronunciar o efeito endogâmico nas linhagens segregantes.

Analisando-se os *backgrounds* ‘GR x GR’ e ‘IP-1’, nas três gerações estudadas (todos com moderado grau de endogamia) observaram-se os menores valores de heterozigosidade ($H=0; 0,19; 0,19; 0,06; 0; 0,20$) (Tabela 4). Por outro lado, como era de se esperar, as gerações estudadas sobre os *backgrounds* ‘GR x IP-1’ e ‘IP-2 x IP-3’ (todos com baixo grau de endogamia), apresentaram os maiores valores de heterozigosidade ($H=0,20; 0,22; 0,33; 0,15; 0,27$ e $0,43$). Esses resultados demonstram que as autofecundações iniciais (duas e três) feitas no primeiro grupo de *backgrounds* (‘GR x GR’ e ‘IP-1’) contribuíram para reduzir a variabilidade genética, independentemente da geração em estudo (A_1, B_2 e C_3). Os resultados permitem ainda comparar a eficácia destes marcadores SSR na predição de variabilidade genética em cebola.

Analisando-se conjuntamente todas as quatro gerações de A_1, B_2 e C_3 - cujas médias de heterozigosidade (H) encontram-se ao final da tabela 4- $0,08; 0,14$ e $0,23$, respectivamente; constatou-se que a autofecundação, em geral, proporcionou menor heterozigosidade, que cresce à medida que se adicionou mais plantas aos cruzamentos. Este princípio é muito conhecido, mas cabe ressaltar que pode haver grande vantagem sob o ponto de vista que ocorra uma menor depressão por endogamia, quando se realiza os ‘*sibs*’ entre três plantas, e ainda assim, prevaleça um bom nível de uniformidade nessas populações, o que foi verificado para uma série de características agrônômicas (dados não apresentados).

O padrão alélico e as estimativas de pares de bases para os alelos encontrados em seis locos SSR neste trabalho são um primeiro passo, envolvendo marcadores SSR em estudos de efeito endogâmico, podendo auxiliar futuras pesquisas e programas de melhoramento genético que visam produção de híbridos de cebola no Brasil.

Evidências sugerem que a alta aptidão dos heterozigotos em comparação com homozigotos (sobredominância) não ocorre em um único loco, devido à limitação dos QTLs, que permitem identificar somente regiões do genoma responsáveis pela expressão de caracteres fenotípicos, a identificação de um único gene é raramente possível neste tipo de mapeamento (e ainda não foi alcançado para tais situações de multilocus como ocorre no efeito endogâmico). O desafio então está na elucidação da ação dos genes responsáveis e como o fenômeno de sobredominância contribui para o aumento das mutações deletérias.

Este trabalho é o primeiro estudo em cebola que visa discutir os efeitos causados pela endogamia na obtenção de linhagens e posterior obtenção de híbridos. A proposta de inter cruzar poucas plantas em contrapartida ao tradicional método onde se realiza sucessivas autofecundações, foi satisfatória no sentido de gerar informações preliminares e levantar questões sobre o fenômeno genético. Os resultados fenotípicos deste estudo evidenciaram diferenças entre os métodos de condução, demonstrando que inter cruzar poucas plantas pode ser aplicado na prática para obtenção de linhagens de cebola.

No entanto para relacionar tais informações com o efeito endogâmico observado seria necessário informações dos parentais e elucidação do mapa genético em cebola. Houve maior frequência de heterozigotos quando realizou-se inter cruzamento de indivíduos em F_2 , presumindo uma maior frequência de heterozigotos com menor efeito endogâmico, conclui-se que os inter cruzamentos devem iniciar desde os primeiros ciclos de autofecundação, ou seja, em populações com nível baixo de endogamia.

Tabela 4: Padrão alélico em pares de bases estimado para 12 populações de cebola (2n) com três indivíduos cada em três diferentes gerações genéticas, genotipadas com oito marcadores SSR.

	ACM101	ACM146	ACM240	ACM255	ACM138	ACM322	ACM134	ACM235	H	
GRxGR (A ₁)	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	205/205	N/N	0	MODERADO GRAU DE ENDOGAMIA
	235/235	231/231	209/209	N/N	241/241	268/268	205/205	N/N		
	235/235	231/231	209/209	N/N	N/N	268/268	205/205	N/N		
GRxGR (B ₂)	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/205	N/N	0,19	
	235/235	231/231	209/209	N/N	241/241	268/268	N/N	N/N		
	235/235	231/234	209/209	N/N	241/241	268/268	203/205	N/N		
GRxGR (C ₃)	235/235	231/231	209/209	176/176	N/N	268/268	203/205	N/N	0,19	
	N/N	231/231	209/209	N/N	241/241	268/268	203/205	N/N		
	234/234	231/234	209/209	N/N	241/241	268/268	N/N	N/N		
IP-1 (A ₁)	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	205/205	N/N	0,06	
	234/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	205/205	N/N		
	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	205/205	N/N		
IP-1 (B ₂)	235/235	232/232	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N	0	
	235/235	232/232	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N		
	235/235	232/232	N/N	176/176	241/241	268/268	N/N	N/N		
IP-1 (C ₃)	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/205	N/N	0,20	
	230/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N		
	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N		
GRxIP-1 (A ₁)	232/232	231/235	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N	0,20	
	232/232	231/235	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N		
	232/232	231/235	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N		
GRxIP-1 (B ₂)	230/235	231/235	N/N	N/N	241/241	268/268	N/N	N/N	0,22	
	230/235	231/235	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N		
	235/235	231/235	N/N	N/N	241/241	N/N	N/N	N/N		
GRxIP-1 (C ₃)	235/235	231/235	N/N	N/N	241/241	N/N	203/203	N/N	0,33	
	230/235	231/235	N/N	N/N	241/241	N/N	203/203	N/N		
	235/235	231/235	N/N	N/N	241/241	268/268	N/N	N/N		
IP-2xIP-3 (A ₁)	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/205	N/N	0,15	
	N/N	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/205	N/N		
	N/N	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	203/203	N/N		
IP-2xIP-3 (B ₂)	235/235	231/231	205/209	N/N	241/241	268/269	203/205	N/N	0,27	
	N/N	231/231	205/209	N/N	241/241	268/269	203/205	N/N		
	235/235	231/231	N/N	N/N	241/241	268/268	N/N	N/N		
IP-2xIP-3 (C ₃)	235/235	231/231	N/N	N/N	241/245	N/N	N/N	N/N	0,43	
	N/N	231/231	N/N	N/N	241/245	N/N	N/N	N/N		
	N/N	231/231	N/N	N/N	241/245	N/N	N/N	N/N		
Média (H):	A ₁ -----0,08	B ₂ -----0,14	C ₃ -----0,23							

*H= Heterozigosidade N/N= Não conclusivo para os dois alelos

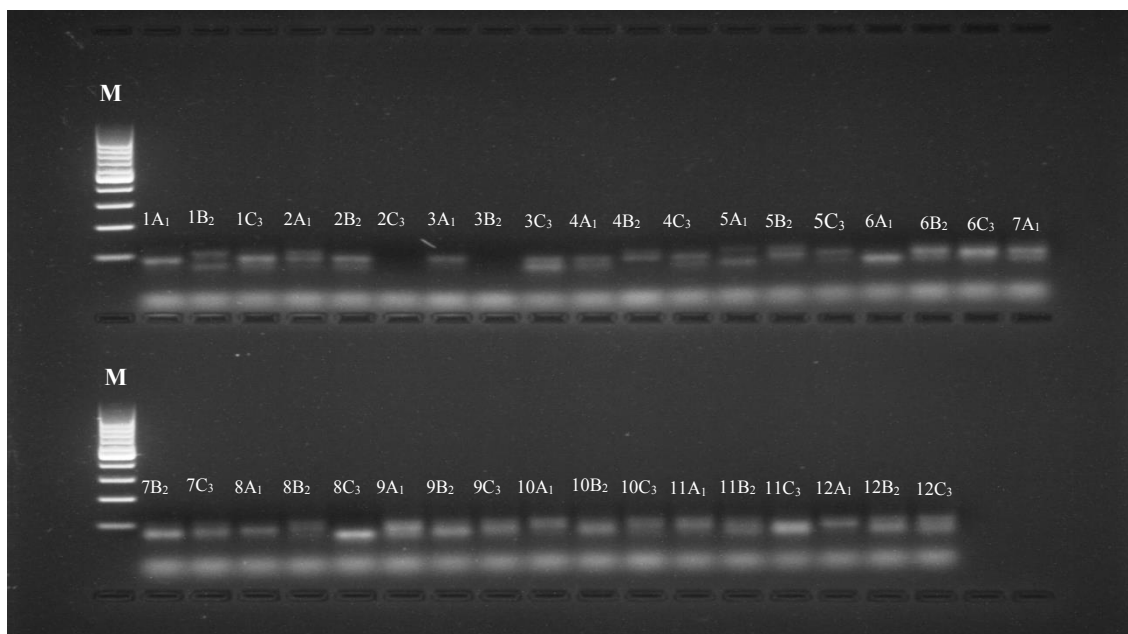


Figura 1. Eletroferograma de gel de agarose 2% corado com GelRed™ (Biotium) utilizando o *primer* ACM235 mostrando o polimorfismo do DNA extraído de 12 linhagens endogâmicas obtidas de três diferentes formas de condução (A₁, B₂ e C₃). **M:** Escala de peso molecular 100pb.

6.5 Conclusões

A depressão por endogamia não pode ser prontamente interpretada como somente devida a efeitos de homozigoticidade para mutações deletérias;

Os resultados demonstraram que os SSR's usados podem ser úteis para detectar variabilidade no germoplasma brasileiro de cebola;

A autofecundação, em geral, proporcionou menor heterozigidade, que cresce à medida que se adicionou mais plantas aos cruzamentos.

Sugere-se que os intercruzamentos entre plantas de cebola devem iniciar em populações com nível baixo de endogamia para maior proveito do método.

6.6 Referências

BALDWIN, S. et al. Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations. **Molecular Breeding**, [S.I], v. 30, p. 1401-1411, 2012.

BHARGAVA, M.; SHARMA, A. DNA barcoding in plants: Evolution and applications of in silico approaches and resources. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S.I], v. 67. p. 631-641, 2013.

BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant population. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (ed.). **Isozymes in plants genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. (1990). **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus 12: 13-15.

FISCHER, D.; BACHMANN, K. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.I], v. 101, p. 153–164, 2000.

JAKSE, J. et al. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 130, p. 912-917, 2005.

KHAR, A.; LAWANDE, K. E.; NEGI, K. S. Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium spp*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [S.I], v. 58, p. 741–752, 2011.

KISHA, T. J.; CRAMER, C. S. Determining redundancy of short-day onion accessions in a germplasm collection using microsatellite and targeted region amplified polymorphic markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 136, p. 129–134, 2011.

MALLOR, C.; ARNEDO-ANDRÉS, M. S.; GARCÉS-CLAVER, A. Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 170, p. 24–31, 2014.

MASUZAKI et al. Chromosomal Locations of Microsatellites in Onion. **HortScience**, Alexandria, v. 41, n. 2, p. 315-318, 2006.

MCCALLUM, J. et al. Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.I], v. 112, p. 958–967, 2006.

MCCALLUM, J. et al. Genetic diversity analysis and single-nucleotide polymorphism marker development in cultivated bulb onion based on expressed sequence tag—simple sequence repeat markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 133, n. 6, p. 810–818, 2008.

RIVERA, A. et al. Assessing the genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) landraces from northwest Spain and comparison with the European variability. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, [S.I], v. 44, n. 2, 2016.

SANTOS, C. A. F et al. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 49-55, 2010.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 233–234, 2000.

SILVA, H. C.; GOMES, L. A. A.; FREITAS, J. A. Produção de sementes de cebola. In: SOUZA, R.J. ; ASSIS, R. P.,; ARAÚJO, J. C. **Cultura da cebola- Tecnologias de produção e comercialização**, p. 205-231, 2015.

SHUKLA, S. M. A. et al. The Onion Genomic Resource: A genomics and bioinformatics driven resource for onion breeding. **Plant Gene**, Amsterdam, v. 8, p. 9–15, 2016.

TRIFONOVA, A. A.; KOCHIEVA, Z.; KUDRYAVTSEV, A. M. Analysis of microsatellite loci variability in rare and endemic species *Allium regelianum*. **Genetika**, Beograd, v. 53, n. 2, p. 192–200, 2017.

XANTHOPOULOU, A. et al. Microsatellite high-resolution melting (SSR-HRM) analysis for genotyping and molecular characterization of an *Olea europaea* germplasm collection. **Plant Genetic Resources**, Rome, v. 12, n. 3, p. 273-277, 2014.

WILLIS, J. H. Genetic analysis of inbreeding depression caused by chlorophyll-deficient lethals in *Mimulus guttatus*. **Heredity**, London, v. 69, p. 562–572, 1992.

YUN, L.; AGRAWAL, A. F. Variation in the strength of inbreeding depression across environments: effects of stress and density dependence. **Evolution**, Durham, v. 68, p. 3599–3606, 2014.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos genéticos em cebola são os que mais demandam tempo dentre as hortaliças. Embora a associação de métodos clássicos e biotecnológicos contribuam para reduzir este tempo, ainda são poucos os que se dedicam à esta tarefa. Todavia, o aprendizado é promissor e os resultados relevantes. No presente estudo (cujas populações foram iniciadas em 2012) não foi diferente.

A caracterização fenotípica e molecular nas populações provenientes de uma planta autofecundada e duas e três plantas intercruzadas, permitiu a realização de contrastes bilaterais e associação entre resultados, que comprovaram a hipótese de haver pronunciado efeito de depressão por endogamia em cebola, notadamente para peso médio e produção de bulbos, e em menor escala para vigor de haste. O modo de condução das populações (*sibs* de duas e três plantas), resultou em maior produção de sementes naquelas populações com baixo grau de endogamia, permitiu ainda, constatar maior divergência genética entre os genótipos estudados quando foi realizado os intercruzamentos, em comparação à planta autofecundada. Como a maior divergência genética é um dos indícios que denota uma menor depressão endogâmica, os resultados se corroboram neste sentido.

A despeito das correlações genotípicas terem sido em sua grande maioria, superiores às correlações fenotípicas e ambientais, averiguou-se a confiabilidade dos dados genéticos, ainda que sem o conhecimento das variâncias de aditividade para os mesmos. De tal forma, os contrastes ortogonais realizados com os dados fenotípicos para atender possíveis efeitos de depressão endogâmica, são bastante confiáveis para inferir sobre os efeitos genéticos. Ademais, correlações de interesse foram reveladas, a exemplo da alta e positiva correlação genética entre nota para pegamento de sementes versus produção de sementes em gramas por umbela, o que permite a seleção indireta desta última, pela primeira.

Fica por fim evidente, que realizar *sibs* entre poucas plantas (duas ou três neste estudo) apresenta-se como uma alternativa interessante na obtenção de linhagens superiores para produção de híbridos de cebola. O presente estudo abriu ainda, novas hipóteses a serem consideradas em estudos genéticos sobre depressão por endogamia, quando pode-se aliar as abordagens convencionais e biotecnológicas visando otimizar processos nos programas de melhoramento genético.