

Diversidade do gene codificador da “sintase do fator de lacrimação” em seis espécies do gênero *Allium*.

Maria Esther de Noronha Fonseca¹, Carlos Antonio F. Santos²; Valter Rodrigues Oliveira¹; Leonardo S. Boiteux^{1,3}

¹Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970 Brasília-DF; ²Embrapa Semi-Árido. CP 23, 56302-970. Petrolina, PE. ³Bolsista CNPq; E-mail: boiteux@cnph.embrapa.br

RESUMO

Até recentemente o efeito de lacrimação da cebola era considerado como sendo decorrente da produção espontânea após catálise mediada pela enzima allinase. No entanto, uma nova enzima denominada como “lachrymatory factor synthase” (“sintase do fator de lacrimação” - SFL) foi identificada e o seu cDNA isolado (GenBank AB089203). Esta descoberta abriu a possibilidade dos programas de melhoramento desenvolverem cultivares sem lacrimação, porém preservando compostos sulfurados de valor nutracêutico. Outra característica do gene SFL é o fato dele existir no genoma de cebola como uma única cópia. Este fato possibilita o uso da informação do gene SFL para gerar ferramentas de caracterização e/ou na estimativa de relacionamento genético entre espécies e acessos dentro do gênero *Allium*. Os principais objetivos deste trabalho foram: (1) verificar a possibilidade de amplificar alelos do gene SFL em outras espécies de *Allium* via uma estratégia de PCR heterólogo usando “primers” desenhados para o gene isolado em cebola e (2) analisar a diversidade das seqüências gênicas obtidas. Amplicons de segmentos análogos ao gene SFL de cebola foram obtidos em todas as espécies com todos os “primers”. Amplicons polimórficos foram observados entre espécies e acessos de *A. cepa* e *A. fistulosum*. A análise de seqüência revelou diversos SNPs nos alelos do gene SFL. A análise de seqüência permitiu agrupar as espécies de *Allium* de acordo com o atual sistema de classificação para o gênero.

Palavras-chave: cebola, lacrimação, nutracêuticos, diversidade genética.

ABSTRACT - Diversity of the lachrymatory factor synthase gene in six *Allium* species.

Recently, the lachrymatory compounds released after mechanical damage of onion (*Allium cepa* L.) bulbs were thought to be result of the spontaneous

production of sulfur-containing compounds after reaction catalyzed by the enzyme allinase. However, a new enzyme named as “lachrymatory factor synthase” (LFS) was discovered and its corresponding cDNA was isolated and cloned (GenBank AB089203). This discovery opened new vistas for the onion breeding programs since it could allow the development of “no-crying” cultivars with good levels of nutraceutical sulfur-containing compounds. Another interesting characteristic of the LFS gene is its presence in the onion genome as a single copy and not as a gene family. This fact could allow the use of the SFL gene information as a tool in fingerprinting cultivars and/or in estimating the genetic distance among species and/or accessions of a given species of the genus *Allium*. The main objectives of the present work were: (1) test the possibility of amplifying SFL analog genes in distinct *Allium* species via heterologous PCR assays using primers designed to anneal to segments from the onion SFL allele and (2) to analyze the sequence diversity of this gene in six species of the genus *Allium*. PCR amplification products of the SFL allele were obtained for all species with all primers. Polymorphic amplicons were observed among all species and among *A. cepa* and *A. fistulosum* accessions. The sequence analysis revealed several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the SFL gene. *Allium* species were grouped in close accordance with the current classification system for this genus.

Keywords: onion, lachrymatory effects, nutraceuticals, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

A pungência da cebola é ocasionada pela ruptura mecânica das células que induz a hidrólise de compostos precursores sulfóxidos [S-alk(en)il-L-cisteína] (WHITAKER, 1976). A reação de hidrólise é catalisada pela enzima allinase, que em presença de água, resulta na síntese dos compostos tiopropanal; ácido pirúvico e amônia bem como diversos compostos voláteis contendo enxofre (WHITAKER, 1976). Até recentemente o efeito de lacrimejação da cebola era considerado como sendo decorrente da produção espontânea após a ação da allinase (ou seja, esta seria a única enzima envolvida). No entanto, IMAI *et al.* (2002) demonstraram que a lacrimejação é controlada por uma nova enzima ainda não caracterizada, que foi denominada como “lachrymatory factor synthase” (“sintase do fator de lacrimejação” - SFL). Esta descoberta abre a possibilidade dos programas de melhoramento desenvolverem cultivares sem

lacrimejação, porém preservando compostos sulfurados de valor nutracêutico, que são controlados por outro sistema enzimático. Do ponto de vista de análise de diversidade e filogenia, o fato de o gene codificador da “sintase fator de lacrimejação” existir apenas como uma cópia (IMAI *et al.* 2002) abre a possibilidade de utilizá-lo como ferramenta na caracterização e na estimativa de distância genética entre espécies e de acessos dentro das espécies do gênero *Allium*. Os principais objetivos deste trabalho foram: (1) verificar a possibilidade de amplificar alelos deste gene em outras espécies do gênero *Allium* via uma estratégia de PCR heterólogo usando “primers” desenhados para o gene isolado em cebola e (2) analisar a diversidade das seqüências gênicas obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA genômico foi extraído método CTAB 2x de acessos das seguintes espécies do gênero *Allium*: (*A. cepa*; *A. chinense*; *A. fistulosum*; *A. sativum* e *A. ampeloprasum*). Dois pares de “primers” (LF 300 e LF 600) foram sintetizados a partir de informações do cDNA do gene SFL (IMAI *et al.*, 2002). As reações e o ajuste dos ciclos do PCR foram as padronizadas, tendo as temperaturas das etapas de anelamento ajustadas para o T_m de cada par de “primers”. Os amplicons foram sequenciados diretamente usando o protocolo BigDye® version 3 em um aparelho “Applied Biosystems 3100”. Seqüências foram analisadas usando o programa LaserGene (DNAS_tar, Madison, WI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produtos de amplificação segmentos análogos ao gene SFL de cebola foram obtidos para todas as espécies avaliadas com os dois pares de “primers” (Figura 1). Amplicons polimórficos foram observados entre espécies e entre acessos de *A. cepa* e *A. fistulosum*. Existe variabilidade natural de pungência entre acessos presente de cebola. Os resultados apresentados sugerem que os mais óbvios genes candidatos para o fenótipo ausência de lacrimejação em cebola seriam alelos mutantes (defectivos) do gene SFL. A identificação de marcadores moleculares associados a este fenótipo poderia facilitar a seleção de cebolas isentas do desagradável fator “choro”. A análise de seqüência revelou diversos SNPs nos alelos do gene SFL (Figura 2). Um interessante resultado foi que esta análise permitiu agrupar as espécies de *Allium* em estreito acordo com o atual sistema de classificação para o gênero.

LITERATURA CITADA

IMAI S; TSUGE N; TOMOTAKE M; NAGATOME Y; SAWADA H; NAGATA T; KUMAGAI H. 2002. An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, v. 419, p.685.
 WHITAKER J. 1976. Development of flavor, odor, and pungency in onion and garlic. *Advanced Food Research*, v. 22, p.73-133.

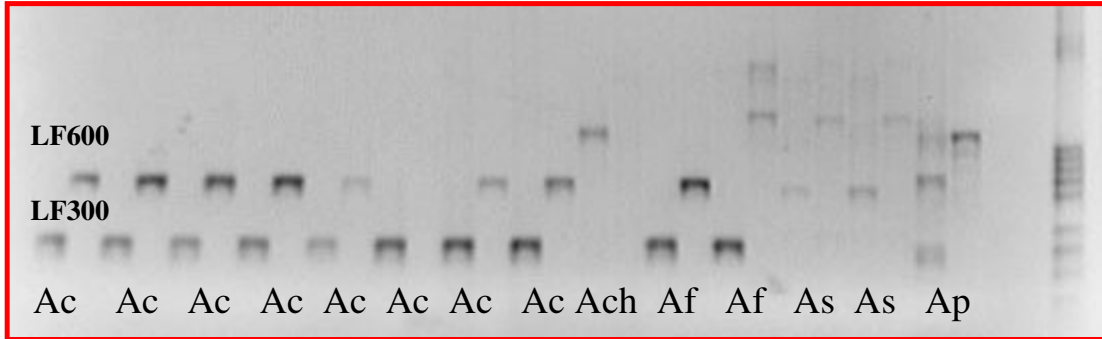


Figura 1. Amplificação de segmentos do gene da “sintase do fator de lacrimejação” em diferentes espécies do gênero *Allium* (Ac = *A. cepa*; Ach = *A. chinense*; Af= *A. fistulosum*, As= *A. sativum* e Ap = *A. ampeloprasum*).

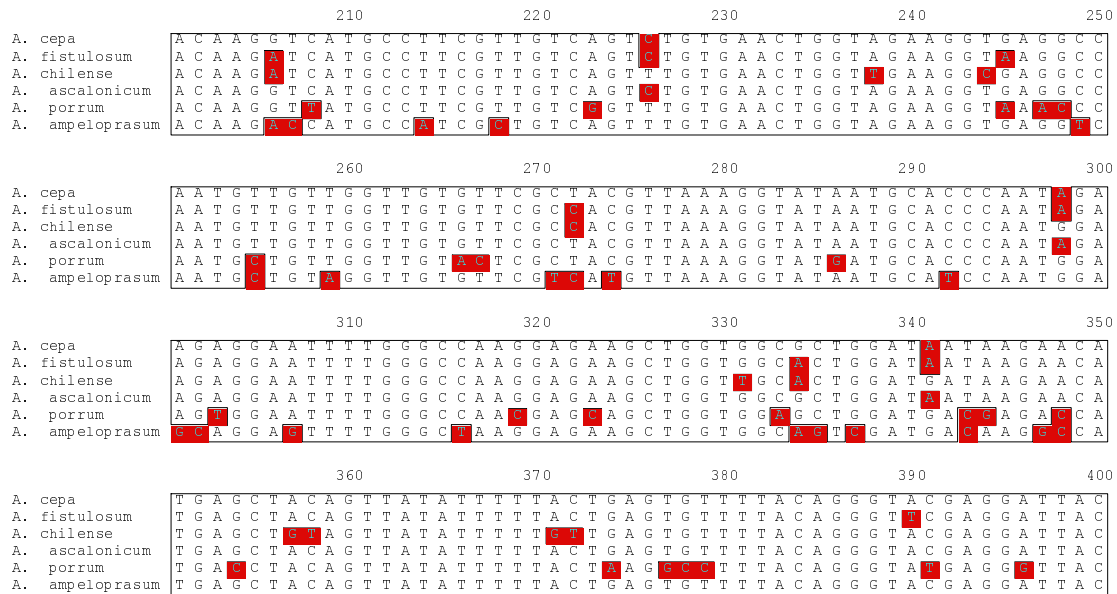


Figura 2. Alinhamento das seqüências do gene da “sintase do fator de lacrimejação” em diferentes espécies do gênero *Allium*. O alinhamento foi feito com o programa Clustal. Em vermelho destacados os polimorfismos do tipo SNPs.